

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 20135146 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **20135146**

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

A61K 41/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 25/30 (2006.01)

A61P 25/34 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **15.07.2011**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **15.02.2013**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **15.02.2013**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **15.07.2011 PCT/IB2011/002404**
Internationell ansökan - International
application

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

15.07.2010 RU 2010129289 P 21.07.2010 RU 2010130350 P
02.06.2011 RU 2011122407 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • EPSHTEIN, Oleg, Iliich, 4 Samotyochny Per., D. 3, kv. 72, 127473 MOSCOW, VENÄJÄN FEDERAATIO, (RU)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • EPSHTEIN, Oleg, Iliich, MOSCOW, VENÄJÄN FEDERAATIO, (RU)

2 • SERGEEVA, Svetlana, Alexandrovna, MOSCOW, VENÄJÄN FEDERAATIO, (RU)

3 • DOLGOVYH, Liudmila, Fyodorovna, CHELYABINSK, VENÄJÄN FEDERAATIO, (RU)

4 • KHEYFETS, Irina Anatolievna, MOSKOVSKAYA OBL., VENÄJÄN FEDERAATIO, (RU)

5 • DUGINA, Julia Leonidovna, MOSCOW, VENÄJÄN FEDERAATIO, (RU)

6 • ZABOLOTNEVA, Julia Alexandrovna, MOSCOW, VENÄJÄN FEDERAATIO, (RU)

7 • TARASOV, Sergey Alexandrovich, ODINTSOVSKY R-N, VENÄJÄN FEDERAATIO, (RU)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

FARMASEUTTISET KOOSTUMUKSET JA HOITOMENETELMÄT

Farmaceutiska kompositioner och behandlingsförfaranden

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND METHODS OF TREATMENT

(57) Tiivistelmä - Sammandrag - Abstract

Esillä oleva keksintö tarjoaa käyttöön farmaseuttiset koostumukset, jotka käsittävät ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua- potensoitua muotoa, käytettäväksi lihavuuden ja siihen liittyvien aineenvaihduntahäiriöiden hoitoon. Esillä oleva keksintö tarjoaa lisäksi käyttöön farmaseuttiset koostumukset, jotka käsittävät ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa ja S-100-proteiinia vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa, käytettäväksi psykoaktiivisten aineiden riippuvuuden hoitoon. Esillä oleva keksintö alkaansaa menetelmät lihavuuden ja siihen liittyvien aineenvaihduntahäiriöiden sekä aineiden väärinkäytön hoitoon.

Föreliggande uppfinning erbjuder för användning farmaceutiska kompositioner, vilka omfattar en aktiverad-potentierad form av en antikropp riktad mot en human kannabinoidreceptor, att användas för behandling av fetma och ämnesomsättningsstörningar i anslutning därtill. Föreliggande uppfinning erbjuder dessutom för användning farmaceutiska kompositioner, vilka omfattar en aktiverad-potentierad form av en antikropp riktad mot en human kannabinoidreceptor och en aktiverad-potentierad form av en antikropp riktad mot S-100-protein, att användas för behandling av beroende av psykoaktiva ämnen. Föreliggande uppfinning åstadkommer förfaranden för behandling av fetma och ämnesomsättningsstörningar i anslutning därtill samt missbruk av ämnen.

FARMASEUTTISET KOOSTUMUKSET JA HOITOMENETELMÄT

KEKSINNÖN ALA

Esillä oleva keksintö koskee farmaseuttisia koostumuksia, joita voidaan
5 käyttää lihavuuden ja siihen liittyvien aineenvaihduntahäiriöiden hoitoon sekä psykoaktiivisten aineiden, erityisesti nikotiinin, riippuvuuden hoitoon.

KEKSINNÖN TAUSTA

Lihavuus tunnustetaan nykyään krooniseksi sairaudeksi, joka edellyttää
hoitoa siihen liittyvien terveysvaarojen vähentämiseksi. Lihavuuden lisääntyminen
10 on huolestuttavaa lihavuuteen liittyvien terveysvaarojen, esimerkiksi sepelvaltimotaudin, aivohalvausten, verenpainetaudin, tyypin 2 diabeteksen, dyslipidemian, uniapnean, nivelrikon, sappirakkosairauden, masennuksen ja syövän tiettyjen muotojen (esim. endometrium-, rinta-, eturauhas- ja koolonsyöpä), vuoksi. Lihavuuden negatiiviset terveysseuraukset tekevät siitä toiseksi tärkeimmän ehkäistävissä olevien kuolemien syyn Yhdysvalloissa. Katso julkaisu McGinnis M, Foege W H., "Actual Causes of Death in the United States", JAMA, 270, 2207 12 (1993).

Uskotaan, että ruumiinpainon 5 - 10 %:n pieneneminen voi olennaisesti parantaa aineenvaihdunnallisia arvoja, kuten verensokeria, verenpainetta ja lipidipitoisuuksia.

20 Tällä hetkellä saatavilla olevat reseptilääkkeet lihavuuden hoitoon pienentävät yleensä painoa kylläisyyttä aiheuttamalla tai ruokavalion rasvan imeytymistä vähentämällä. Kylläisyys saavutetaan lisäämällä noradrenaliinin, serotoniniin tai molempien tasoa. Esimerkiksi serotoniinireseptorin alatyypit 1B, 1D ja 2C sekä 1- ja 2-adrenergiset reseptorit vähentävät ruuan sisäänottoa kylläisyyttä säätelemällä. Katso julkaisu Bray G A, "The New Era of Drug Treatment. Pharmacologic Treatment of Obesity: Symposium Overview," Obes. Res., 3 (suppl 4),
25 (1995). Adrenergiset aineet (esimerkiksi dietyylipropioni, bentsfetamiini, fendimetratsiini, matsindoli ja fentermiini) vaikuttavat muutamalla keskeisiä noradrenaliini- ja dopaminireseptoreita katekoliamiinin vapauttamisen kautta. Voimakkaasti dopamiinireitteihin kytkeytyviä vanhempia adrenergisia laihdutuslääkkeitä (esimerkiksi amfetamiini, metamfetamiini ja fenmetratsiini) ei enää suositella
30 niiden väärinkäyttövaaran takia. Fenfluramiinia ja deksfenfluramiinia, jotka mo-

lemmat olivat ruokahalun säätelyyn käytettäviä serotonergisia aineita, ei enää ole saatavilla käytettäväksi.

Näiden psykoaktiivisten aineiden käytöstä aiheutuvien osoitettujen sivuvaikutusten ja riippuvuuden kehittymisen takia ei ole vielä kukaan saatavilla tehokasta ja turvallista keskeisesti vaikuttavaa lääkettä. Siten on vieläkin olemassa
5 tarve tehokkaammalle ja turvallisemmalle terapeuttiselle hoidolle lihavuuden ja siihen liittyvien aineenvaihduntahäiriöiden vähentämiseksi tai ehkäisemiseksi.

Lihavuuden hoidon lisäksi on tarvetta myös päihderiippuvuuden hoitoon.

10 Riippuvuus tupakasta edustaa tärkeintä ehkäistävissä olevaa sairauden ja kuoleman syytä yhteiskunnassamme, vastaten tuhansista kuolemista joka vuosi. Puolet kaikista tupakoitsijoista kuolee tupakointiin suoraan liittyviin sairauksiin, ja monilla tupakoitsijoilla esiintyy huomattavaa sairastuvuutta. Noin 15 miljoonaa tupakoitsijaa yrittää lopettaa, mutta vain yksi miljoona näistä onnistuu tupakoinnin lopettamisessa vuosittain.
15

Tupakansavu sisältää suuren määrän erittäin monimutkaisia aineita, joista tärkein on nikotiini, joka on aine, johon tupakoitsijoilla kehittyy riippuvuus. Lukuisat farmakoterapiat ovat osoittautuneet tehokkaiksi tupakkariippuvuuden hoidossa. Näihin kuuluvat nikotiinikorvaushoidot purukumin, laastarin, nenäsumutteen ja inhalaattorin muodossa. Nikotiiniriippuvuuden hoitomenetelmäksi on kehitetty muuhun kuin nikotiiniin perustuvia farmakologisia hoitoja. Mahdollisia reagensseja ovat nikotiinin salpausterapia, serotonergiseen hermovälitykseen vaikuttavat aineet, masennuslääkkeet, anksiolyytit, klonidiini ja hengitysteiden sensorinen korvaus (Rose, 1996; ja Cinciripini et al., 1998 Oncology 12: 249 - 256). Nikotiinin salpausterapiassa (kutsutaan myös nimellä nikotiinireseptorin antagonistit)
20 käytetään yhdisteitä, jotka täyttävät nikotiinireseptorit ja heikentävät siten siten tupakoinnista saatavaa palkintoa (Clarke, 1991 Br. J. Addict. 86: 501 - 505). On kuitenkin olemassa tarve tupakointiriippuvuuden tehokkaampaan hoitoon.
25

Kannabinoidireseptorit ovat solukalvon G-proteiineihin kytkeytyneiden reseptorien superperheen yksi luokka. Kolme ligandien pääryhmää aktivoi kannabinoidireseptoreja, (a) endokannabinoidit (joita nisäkkään keho tuottaa), (b) kasvien kannabinoidit (kuten kannabiskasvin tuottama THC) ja (c) synteettiset kannabinoidit (kuten HU-210, joka syntetisoitiin ensi kerran 1988 (1R,5S)-myrtenolista). Nämä kannabinoidit vaikuttavat solukalvolla sijaitseviin kannabinoidireseptoreihin
30

sitoutumalla. Endokannabinoidien on osoitettu liittyvän moniin erilaisiin fysiologisiin ja patofysiologisiin prosesseihin. Tähän mennessä useimmat lääkkeet, joiden käyttötarkoituksena on vuorovaikutus endokannabinoidireseptorien kanssa, on johdettu kannabiksesta. Cannabis on saanut eniten suosiota sellaisten tuotteiden
 5 kuten marihuanan ja hashiksen raakamateriaalina, ja sen säännöllinen käyttö voi johtaa riippuvuuden kehittymiseen.

Kaksi kannabinoidireseptoria on karakterisoitu: kannabinoidireseptori-1 (CB1), joka on keskeinen, nisäkkäiden aivoissa ja ääreiskudoksissa esiintyvä reseptori, ja kannabinoidireseptori-2 (CB2), ääreisreseptori, jota esiintyy vain ääreiskudoksissa. CB1-reseptori ilmentyy pääasiassa useilla aivojen alueilla, esimerkiksi limbisessä järjestelmässä (mantelitumake, hippokampus), hypothalamuksessa, aivokuoressa, pikkuaivoissa ja tyvitumakkeissa. Jommankumman tai molempien näiden reseptorien agonisteina tai antagonisteina toimivien yhdisteiden on osoitettu aikaansaavan monia erilaisia farmakologisia vaikutuksia. Katso esimerkiksi julkaisut Pertwee, R.G., *Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors*, Pharmacol. Ther., (1997) 74:129 - 180, ja Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., DePetrocellis, L., *Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action*, Trends Neurosci. (1998) 21:521 - 528.
 10
 15

Esillä olevan patenttihakemuksen keksijä, tri Oleg I. Epshtein, on havainnut vasta-aineiden homeopatiateknologialla potensoidun, erittäin paljon laimennetun (tai ultrapienen pitoisuuden) muodon (aktivoitu-potensoituu muoto) terapeuttisen vaikutuksen. US-patentissa nro 7 582 294 esitetään lääke eturauhasen hyvänlaatuisen hyperplasian tai eturauhastulehduksen hoitamiseksi antamalla prostataspesifistä antigeeniä (PSA) vastaan kohdistuvien vasta-aineiden homeopaattisesti aktivoitua muotoa.
 20
 25

S-100-proteiini on hapan sytoplasminen proteiini, joka ilmentyy hermostossa. On ehdotettu, että S-100-proteiinilla on merkitystä ahdistuneisuudessa. Katso julkaisut Ackermann et al., *S100A1-deficient male mice exhibit increased exploratory activity and reduced anxiety-related response*, Biochim. Biophys. Acta. 2006, 63(11):1 307 - 1 319, Diehl et al., *Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats*, 2007, 144:107 - 116, joihin molempiin tässä viitataan.
 30

S-100-proteiinia vastaan kohdistuvien vasta-aineiden ultrapienillä annoksilla on osoitettu olevan anksiolyyttistä, asteniaa estävää, aggressiivisuutta estävää, stressiltä suojaavaa, hypoksiaa estävää, anti-iskeemistä, neuroprotektiivista ja nootrooppista aktiivisuutta. Katso julkaisut Castagne V. et al., *Antibodies to S100 proteins have anxiolytic-like activity at ultra-low doses in the adult rat*, 2008, 60(3):309 - 316; Epshtein O. I., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2009, 94(1):37 - 42; Voronina T.A. et al., kappale 8, *Antibodies to S-100 protein in anxiety-depressive disorders in experimental and clinical conditions*, teoksessa *Animal models in biological psychiatry*, toim. Kalueff A.V. N-Y, Nova Science Publishers, Inc., 2006, s. 137 - 152, joihin kaikkiin tässä viitataan.

On olemassa jatkuva tarve uusille lääkeainetuotteille, joilla on haluttu terapeuttinen vaikutus, liiallisen ruumiinpainon tai lihavuuden ja päihderiippuvuuden hoitamiseksi.

YHTEENVETO

Tämän keksinnön yhdessä aspektissa tarjotaan käyttöön farmaseuttinen koostumus, joka käsittää ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa. Ihmisen kannabinoidireseptori on edullisesti kannabinoidireseptori-1 (CB1). Tämän keksinnön tämän aspektin mukaisen vasta-aineen aktivoitun-potensoidun muodon katsotaan olevan suunnattu ihmisen koko kannabinoidireseptori-1:tä vastaan. Erityisesti otetaan huomioon tämän keksinnön yksityiskohtaisessa kuvauksessa annetut nimenomaiset sekvenssit. Odotetaan, että vasta-aineen aktivoitu-potensoituu muoto kohdistuu ihmisen kannabinoidireseptorin-1 polypeptidifragmenttiin. Vasta-aineen aktivoitu-potensoituu muoto on homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seoksen muodossa. Erityisen edullisessa muunnelmassa vasta-aineen aktivoitu-potensoituu muoto on homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seoksen muodossa, jotka on kyllästetty kiinteään kantajaan. Ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitun-potensoidun muodon katsotaan olevan monoklonaalinen, polyklonaalinen tai luonnossa esiintyvä vasta-aine. Ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitu-potensoituu muoto on edullisesti polyklonaalinen vasta-aine. Ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnattu vasta-aine voidaan valmistaa peräkkäisillä sadasosaisilla laimennoksilla kunkin laimennoksen ravistukseen yhdistettynä.

Tämän keksinnön toisessa aspektissa saadaan aikaan menetelmä lihavuuden ja siihen liittyvien aineenvaihduntahäiriöiden hoitoon, joka mainittu menetelmä käsittää tämän keksinnön tämän aspektin mukaisen farmaseuttisen koostumuksen minkä tahansa muunnelman tai suoritusmuodon mukaisen farmaseuttisen koostumuksen antamisen. Farmaseuttinen koostumus voidaan antaa potilaalle yhtenä tai kahtena yksikköannosmuotona yhdestä neljään kertaa päivässä. Kahdesti päivässä antaminen otetaan erityisesti huomioon.

Vielä yhdessä tämän keksinnön aspektissa saadaan aikaan menetelmä nikotiiniriippuvuuden hoitoon, joka mainittu menetelmä käsittää tämän keksinnön tämän aspektin mukaisen farmaseuttisen koostumuksen minkä tahansa muunnelman tai suoritusmuodon mukaisen farmaseuttisen koostumuksen antamisen. Farmaseuttinen koostumus voidaan antaa potilaalle yhtenä tai kahtena yksikköannosmuotona yhdestä neljään kertaa päivässä. Kahdesti päivässä antaminen otetaan erityisesti huomioon.

Vielä yhdessä tämän keksinnön aspektissa saadaan aikaan menetelmä antropometristen parametrien muuttamiseksi nisäkkäässä, jonka odotetaan saavan etua tällaisesta muuttamisesta, joka mainittu menetelmä käsittää tämän keksinnön tämän aspektin mukaisen farmaseuttisen koostumuksen minkä tahansa muunnelman tai suoritusmuodon mukaisen farmaseuttisen koostumuksen antamisen. Yhdessä suoritusmuodossa antropometrinen parametri on vyötärön ympärys. Yhdessä suoritusmuodossa antropometrinen parametri on vyötärön ja pituuden suhde. Vielä yhdessä suoritusmuodossa antropometrinen parametri on vyötärön ja lantion suhde. Useita muunnelmia annetaan.

Vielä yhdessä tämän keksinnön aspektissa saadaan aikaan menetelmä nisäkkään ruumiinpainon pienentämiseksi, joka mainittu menetelmä käsittää tämän keksinnön tämän aspektin mukaisen farmaseuttisen koostumuksen minkä tahansa muunnelman tai suoritusmuodon mukaisen farmaseuttisen koostumuksen antamisen. Yhdessä muunnelmassa ruumiinpaino pienenee vähintään 5 %:lla. Toisessa muunnelmassa ruumiinpaino pienenee vähintään 10 %:lla. ruumiinpaino pienenee vähintään 15 %:lla. Vielä yhdessä muunnelmassa ruumiinpaino pienenee alle 15 %:lla.

Vielä yhdessä tämän keksinnön aspektissa saadaan aikaan menetelmä nisäkkään ruumiinpainon nousun pienentämiseksi, joka mainittu menetelmä käsittää tämän keksinnön tämän aspektin mukaisen farmaseuttisen koostumuksen

minkä tahansa muunnelman tai suoritusmuodon mukaisen farmaseuttisen koostumuksen antamisen. Yhdessä muunnelmassa ruumiinpainon nousu pienenee vähintään 10 %:lla. Toisessa muunnelmassa ruumiinpainon nousu pienenee vähintään 30 %:lla.

5 Vielä yhdessä tämän keksinnön aspektissa saadaan aikaan menetelmä ruuan kulutuksen vähentämiseksi nisäkkäässä, jonka odotetaan saavan etua tällaisesta vähentämisestä, joka mainittu menetelmä käsittää tämän keksinnön tämän aspektin mukaisen farmaseuttisen koostumuksen minkä tahansa muunnelman tai suoritusmuodon mukaisen farmaseuttisen koostumuksen antamisen.

10 Vielä yhdessä tämän keksinnön aspektissa tarjotaan käyttöön farmaseuttinen koostumus, joka käsittää ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa sekä S-100-proteiinia vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa. Yhdessä muunnelmassa S-100-proteiinia vastaan suunnattu vasta-aine on vasta-aine koko S-100-proteiinia vastaan. S-100-proteiinin sekvenssit annetaan tässä patenttiselityksessä. S-100-proteiinia vastaan suunnattu vasta-aine on edullisesti homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seoksen muodossa, jotka on kyllästetty kiinteään kantajaan. Tämän keksinnön tämän aspektin mukainen farmaseuttinen koostumus voi sisältää S-100 proteiinia vastaan suunnattua vasta-ainetta, joka on monoklonaalinen, polyklonaalinen tai luonnossa esiintyvä vasta-aine. S-100-proteiinia vastaan suunnattu vasta-aine on edullisesti polyklonaalinen vasta-aine. S-100-proteiinia vastaan suunnattu vasta-aine voidaan valmistaa peräkkäisillä sadasosaisilla laimennoksilla kunkin laimennoksen ravistukseen yhdistettynä.

25 Vielä yhdessä tämän keksinnön aspektissa saadaan aikaan menetelmä psykoaktiivisen aineen riippuvuutta sairastavan potilaan hoitamiseksi, joka mainittu menetelmä käsittää ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa sekä S-100-proteiinia vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa käsittävän farmaseuttisen koostumuksen antamisen. Psykoaktiivinen aine on edullisesti nikotiini. Mainitun yhdistelmän antaminen johtaa edullisesti tupakoinnin lopettamisen sietämiskyvyn tilastollisesti merkitsevään paranemiseen MPSS-testin tulosanalyysillä mitattuna. Mainitun yhdistelmän antaminen johtaa edullisesti tupakoinnin tilastollisesti merkitsevään vähenemiseen potilailla, joilla on kohtuullinen nikotiiniriippuvuus Fagerströmin nikotiiniriippuvuustestillä mitattuna. Mainitun yhdistelmän antaminen johtaa

edullisesti tupakoinnin tilastollisesti merkitsevään vähenemiseen potilailla, joilla on voimakas nikotiiniriippuvuus Fagerströmin nikotiiniriippuvuustestillä mitattuna.

Vielä yhdessä tämän keksinnön aspektissa tarjotaan käyttöön farmaseuttinen koostumus käytettäväksi psykoaktiivisen aineen riippuvuutta sairastavan potilaan hoidossa, joka mainittu koostumus on saatu saamalla aikaan a) ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen potensoitu liuos ja b) S-100-proteiinia vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoidun-potensoidun muodon potensoitu liuos, ja kumpikin on valmistettu peräkkäisellä toistetulla laimentamisella ja kunkin saadun liuoksen useilla pystysuuntaisilla ravituksilla homeopaattisen teknologian mukaisesti, ja sitten joko yhdistämällä potensoidut liuokset sekoittamalla ne tai vaihtoehtoisesti kyllästämällä kantajamassa mainitulla yhdistetyllä liuoksella tai liuoksilla erikseen.

Vielä yhdessä tämän keksinnön aspektissa tarjotaan käyttöön farmaseuttinen koostumus käytettäväksi lihavuuden ja siihen liittyvien aineenvaihduntahäiriöiden hoidossa, joka mainittu koostumus on saatu aikaansaamalla ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen potensoitu liuos, joka on valmistettu peräkkäisellä toistetulla laimentamisella ja kunkin saadun liuoksen useilla pystysuuntaisilla ravituksilla homeopaattisen teknologian mukaisesti, ja sitten mahdollisesti kyllästämällä kantajamassa mainitulla liuoksella.

20 PIIRUSTUSTEN LYHYT KUVAUS

Kuvio 1 – esittää ULD anti-CB1:n ja sibutramiinin vaikutusta ruumiinpainon nousuun ja rehunkulutukseen.

Kuvio 2 – esittää ruumiinpainon pienenemistä ULD anti-CB1:n antamisen jälkeen.

25 Kuvio 3 – esittää potilaiden vähintään 5-prosenttista painon pienenemistä.

YKSITYISKOHTAINEN KUVAUS

Oheen liitetyt patenttivaatimukset määrittävät tämän keksinnön. Mitä tulee patenttivaatimuksiin, seuraava sanasto antaa asianmukaiset määritelmät.

30 Tässä käytettynä käsite ”vasta-aine” tarkoittaa immunoglobuliinia, joka sitoutuu spesifisesti, ja joka siten määritellään sen kanssa komplementaariseksi, toisen molekyylin tiettyyn spatiaaliseen ja polaariseen järjestykseen. Patenttivaa-

timuksissa selostetut vasta-aineet voivat sisältää kokonaisen immunoglobuliinin tai sen fragmentin, voivat olla luonnossa esiintyviä, polyklonaalisia tai monoklonaalisia, ja ne voivat sisältää erilaisia luokkia ja isotyyppejä, kuten IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b ja IgG3, IgM, jne. Niiden fragmentteihin voivat sisältyä Fab, Fv ja F(ab')₂, Fab' ja vastaavat. Yksikkömuotoinen "vasta-aine" sisältää monikko-

muodon "vasta-aineet."

Käsitettä "aktivoitu-potensoitu muoto" tai vastaavasti "potensoitu muoto" käytetään tässä selostettujen vasta-aineiden yhteydessä tarkoittamaan vasta-aineiden minkä tahansa ensimmäisen liuoksen homeopaattisen potensoinnin tuotetta. "Homeopaattinen potensointi" tarkoittaa homeopatian menetelmien käyttämistä homeopaattisen potenssin välittämiseen asianmukaisen aineen ensimmäiseen liuokseen. Vaikka tämä ei olekaan rajoittavaa, "homeopaattinen potensointi" voi käsittää esimerkiksi toistettua peräkkäistä laimentamista, jotka on yhdistetty ulkoiseen käsittelyyn, erityisesti (mekaaniseen) ravistukseen. Toisin sanoen vasta-

aineen ensimmäinen liuos altistetaan peräkkäiselle toistetulle laimentamiselle ja kunkin saadun liuoksen useille pystysuuntaisille ravistuksille homeopaattisen tek-

nologian mukaisesti. Vasta-aineen ensimmäisen liuoksen pitoisuus liuottimessa, edullisesti vedessä tai vesi-etyyialkoholi-seoksessa, on noin 0,5 - noin 5,0 mg/ml. Edullinen menetelmä kunkin komponentin, so. vasta-aineliuoksen, valmistami-

seen on käyttää vasta-aineiden ensimmäisen väliaineliuoksen (emotinktuuran) kolmen vesipitoisen tai vesi-alkoholipitoisen laimennoksen seosta, jossa vasta-

aineet ovat vastaavasti 100¹²-, 100³⁰- ja 100²⁰⁰-kertaisesti laimentuneita, mikä vastaa homeopaattisten liuosten sadasosittaisia C12-, C30- ja C200-laimenksia. Homeopaattisen potensoinnin esimerkkejä kuvataan US-patenteissa nrot

7 572 441 ja 7 582 294, joihin tässä viitataan ilmaistussa tarkoituksessa. Samaan aikaan kuin käsitettä "aktivoitu-potensoitu muoto" käytetään patenttivaatimuksis-

sa, käsitettä "ultrapienet annokset" käytetään esimerkeissä. Käsitteestä "ultrapie-

net annokset" tuli alaan kuuluva käsite alalla, jonka aineen homeopaattisesti lai-

mennetun ja potensoidun muodon tutkimus ja käyttö loivat. Käsitteen "ultrapieni annos" tai "ultrapienet annokset" on tarkoitus olla patenttivaatimuksissa käytettyä

käsitettä "aktivoitu-potensoitu" täysin tukeva ja ensisijaisesti sen kanssa synonyyminen.

Toisin sanoen vasta-aine on "aktivoitu-potensoitu" tai "potensoidussa" muodossa, kun kolme tekijää esiintyy. Ensinnäkin vasta-aineen "aktivoitu-

potensoitu” muoto on homeopaattisella alalla täysin hyväksytyn valmistusprosessin tuote. Toiseksi vasta-aineen ”aktivoitua-potensoidulla” muodolla täytyy olla biologista aktiivisuutta, joka on määritelty menetelmillä, jotka ovat nykyaikaisen farmakologian täysin hyväksymiä. Ja kolmanneksi vasta-aineen ”aktivoitua-potensoidun” muodon biologista aktiivisuutta ei voida selittää vasta-aineen molekyyli-

muodon läsnäololla homeopaattisen prosessin lopputuotteessa.

Vasta-aineiden aktivoitua-potensoitua muotoa voidaan valmistaa esimerkiksi altistamalla ensimmäisen, eristetyn vasta-aineen molekyyli-

muoto peräkkäisille useille laimennoksille ulkoiseen vaikutukseen, kuten mekaaniseen ravistukseen, yhdistettynä. Ulkoinen käsittely pitoisuuden pienentämisen aikana voidaan toteuttaa myös esimerkiksi ultraäänelle tai sähkömagneettisille tai muille fy-

sikaalisille tekijöille altistamalla. Julkaisut V. Schwabe ”Homeopathic medicines”, M., 1967, US-patentit nro 7 229 648 ja 4 311 897, joihin tässä viitataan ilmaistussa tarkoituksessa, kuvaavat tällaisia menetelmiä, jotka ovat homeopaattisella alalla täysin hyväksytyjä homeopaattisen potensoinnin menetelmiä. Tällä menettelyllä saadaan aikaan vasta-aineen ensimmäisen molekyyli-

muodon pitoisuuden tasainen pieneneminen. Tätä menetelmää toistetaan, kunnes haluttu homeopaattinen potenssi saavutetaan. Yksittäisen vasta-aineen kohdalla tarvittava homeopaattinen potenssi voidaan määrittää altistamalla välilaimennokset biologiseen testaukseen halutussa farmakologisessa mallissa. Vaikka tämä ei olekaan rajoittavaa, ”homeopaattinen potensointi” voi käsittää esimerkiksi toistet-

tuja peräkkäisiä laimentamisia ulkoiseen käsittelyyn, erityisesti pystysuuntaiseen (mekaaniseen) ravistukseen, yhdistettynä. Toisin sanoen vasta-aineen ensimmäinen liuos altistetaan peräkkäiselle toistetulle laimentamiselle ja kunkin saadun liu-

oksen usealle pystysuuntaiselle ravistukselle homeopaattisen teknologian mukaisesti. Vasta-aineen ensimmäisen liuoksen edullinen pitoisuus liuottimessa, edullisesti vedessä tai vesi-etyylialkoholi-seoksessa, on noin 0,5 - 5,0 mg/ml. Kunkin osan, so. vasta-aineliuoksen, edullinen valmistusmenetelmä on käyttää vasta-

aineiden ensimmäisen väliaineliuoksen (emotinktuurin) kolmen vesipohjaisen tai vesi-alkoholi-pohjaisen laimennoksen seosta, jossa vasta-aineet ovat vastaavasti 100¹²-, 100³⁰- ja 100²⁰⁰-kertaisesti laimentuneita, mikä vastaa sadasosittaisia homeopaattisia C12-, C30- ja C200-laimennoksia. Esimerkkejä siitä, miten haluttu potenssi myös saavutetaan, esitetään esimerkiksi US-patenteissa nro 7 229 648 ja 4 311 897, joihin tässä viitataan ilmaistussa tarkoituksessa. Tässä julkaisussa

kuvataan jäljempänä yksityisohtaisemmin vasta-aineiden "aktivoituun-potensoituun" muotoon sovellettavissa oleva menettely.

Ihmisten homeopaattisesta hoitamisesta on käyty huomattavaa väitte-
lyä. Vaikka esillä oleva keksintö luottaa hyväksytyihin homeopaattisiin menetel-
miin vasta-aineiden "aktivoitun-potensoitun" muodon saamiseksi, esillä oleva
5 keksintö ei ole riippuvainen pelkästään ihmisiin kohdistuvasta homeopatiasta ak-
tiivisuuden osoittamisesta. Esillä olevan patenttihakemuksen keksijä on yllättäen
havainnut ja myös monissa hyväksytyissä farmakologisissa malleissa osoittanut,
että liuottimella, joka lopulta saatiin vasta-aineen molekulaarisen lähtömuodon
10 useista peräkkäisistä laimentamisista, on selvää aktiivisuutta, joka ei liity vasta-
aineen molekyylihuodon vähäisiin jäämiin kohdelaimennoksessa. Tässä julkai-
sussa käyttöön tarjotun vasta-aineen "aktivoitun-potensoitun" muodon biologinen
aktiivisuus testataan täysin hyväksytyissä aktiivisuuden farmakologisissa malleis-
sa, joko asianmukaisilla *in vitro* -kokeilla tai *in vivo* sopivissa eläinmalleissa. Jäl-
15 jempänä annetut kokeet osoittavat biologisen aktiivisuuden tällaisissa malleissa.
Kliiniset ihmistutkimukset, jotka myös annetaan tässä jäljempänä, osoittavat muun
muassa, että eläinmallissa havaittu aktiivisuus soveltuu hyvin ihmisterapiaan. Ih-
mistutkimuksesta saatiin myös näyttöä tässä kuvattujen "aktivoitujen-potensoi-
tujen" muotojen käytettävyydestä tiettyjen ihmissairauksien tai -häiriöiden hoitoon,
20 jotka on täysin hyväksytty patologiseksi tiloiksi lääketieteessä.

Lisäksi patenttivaatimusten mukainen vasta-aineen "aktivoitu-poten-
soitu" muoto sisältää vain liuokset tai kiinteät valmisteet, joiden biologista aktiivi-
suutta ei voida selittää vasta-aineen molekyylihuodolla, joka on jäänyt jäljelle en-
simmäisestä lähtöliuoksesta. Toisin sanoen, samalla kun otetaan huomioon, että
25 vasta-aineen "aktivoitu-potensoitu" muoto saattaa sisältää vasta-aineen ensim-
mäisen molekyylihuodon vähäisiä jäämiä, alan ammattilainen ei voisi pitää hy-
väksytyissä farmakologisissa malleissa havaittua biologista aktiivisuutta miten-
kään uskottavasti vasta-aineen jäljelle jääneen molekyylihuodon aiheuttamana,
koska peräkkäisten laimentamisten jälkeen jäljelle jäävän vasta-aineen molekyy-
30 lihuodon pitoisuudet ovat äärimmäisen pieniä. Vaikka tämä keksintö ei ole min-
kään tietyn teorian rajoittama, esillä olevan keksinnön mukaisen vasta-aineden
"aktivoitun-potensoitun" muodon biologista aktiivisuutta ei voida pitää vasta-
aineen ensimmäisen molekyylihuodon ominaisuutena. Edullinen on vasta-aineen
"aktivoitu-potensoitu" muoto nestemäisessä tai kiinteässä muodossa, jossa vasta-

aineen molekyylimuodon pitoisuus on hyväksyttyjen analyyttisten tekniikoiden, kuten kapillaarielektroforeesin ja suuren erotuskyvyn nestekromatografian, havaitsemisrajan alapuolella. Erityisen edullinen on vasta-aineen "aktivoitu-potensoitu" muoto nestemäisessä tai kiinteässä muodossa, jossa vasta-aineen molekyyli-

5 muodon pitoisuus on pienempi kuin Avogadron vakio. Terapeuttisten aineiden molekyyli-
muotojen farmakologiassa on tavallinen käytäntö, että luodaan annos-
vaste-käyrä, jolle farmakologinen vaste piirretään henkilölle annetun aktiivisen ai-
neen pitoisuutta vastaan tai joka testataan *in vitro*. Lääkeaineen vähimmäismäärä,
joka tuottaa minkään havaittavan vasteen, tunnetaan nimellä kynnsannos. Ote-

10 taan erityisesti huomioon ja on edullista, että vasta-aineiden "aktivoitu-potensoitu"
muoto sisältää molekulaarista vasta-ainetta, jos lainkaan, pitoisuutena, joka on
pienempi kuin vasta-aineen molekyyli-
muodon kynnsannos tietyssä biologisessa
mallissa.

Käsitteellä "CB1-reseptori" on alalla yleinen merkitys, ja se voi sisältää

15 luonnossa esiintyvän CB1-reseptorin ja -variantit sekä niiden muutetut muodot.
CB1-reseptori voi olla mistä tahansa lähteestä, mutta on tyypillisesti nisäkkäistä
peräisin.

Käsite "lihavuus" tarkoittaa painorajoja, jotka ovat suurempia kuin mitä
yleisesti pidetään terveellisenä tietylle pituudelle. Lihavuusrajat määritetään käyt-

20 tämällä painoa ja pituutta "painoindeksiin" (BMI) nimellä tunnetun luvun laskemi-
seen. Aikuista, jonka BMI on 25 - 29,9, pidetään ylipainoisena. Aikuista, jonka BMI
on vähintään 30, pidetään lihavana. BMI-kaava on seuraava:

$$\text{paino} - (\text{pituus tuumina})^2 \times 703 = \text{BMI}.$$

BMI ei aina osoita tarkasti lihavuuden astetta. Lisääntyvä määrä julkai-

25 suja osoittaa, että keskivartalorasvan määrän (keskivartalolihavuuden) jakautumi-
nen voi olla aineenvaihduntariskeihin läheisemmin sidoksissa kuin BMI. Näyttää
siltä, että keskivartalorasvan jakautumisasteen mittaaminen on tärkeää myöhempien
terveysvaarojen varhaiselle havaitsemiselle, jopa normaalipainoisten yksilöiden
joukossa. S D Hsieh, H Yoshinaga ja T Muto, International Journal of Obesity

30 (2003) 27, 610 - 616. Katso myös julkaisu Price GM, Uauy R, Breeze E, Bulpitt
CJ, Fletcher AE (elokuu 2006). "Weight, shape, and mortality risk in older per-
sons: elevated waist-hip ratio, not high body mass index, is associated with a
greater risk of death" Am. J. Clin. Nutr. 84 (2): 449 - 460. Keskivartalolihavuutta
edustavina mittoina on käytetty vyötärön ympärystä ja vyötärön ympäryksestä joh-

dettuja indeksejä, kuten vyötärön ja lantion suhdetta ja vyötärön ja pituuden suhdetta. Sung et. al., *Waist circumference and waist-to-height ratio of Hong Kong Chinese children*, BMC Public Health 2008, **8**:324. Siten antropometristen parametrien, esimerkiksi vyötärön ympäryksen, vyötärön ja lantion suhteen ja vyötärön ja pituuden suhteen, uskotaan olevan lihavuuden asteen indikaattori.

Käsite "vyötärön ja lantion suhde" on vyötärön ympäryksen suhde lantion ympärykseen. Vyötärön ja lantion suhde vastaa vyötärön ympärystä jaettuna lantion ympäryksellä. Vyötärön ja lantion suhde, joka on naisilla suurempi kuin 0,9 ja miehillä suurempi kuin 1,0, liittyy sydän- ja verisuonitautien suurentuneeseen riskiin ja on lihavuuden hoidonaihe. Naisilla vyötärön ja lantion suhde on ihanteellisesti enintään 0,8, ja miehillä vyötärön ja lantion suhde saa olla enintään 0,95.

Käsite kohteen "vyötärön ja pituuden suhde" määritellään kohteen vyötärön ympäryksenä kohteen pituudella jaettuna. Alle 40-vuotiailla vyötärön ja pituuden suhde, joka on yli 0,5, on vaarallinen; 40 - 50:n ikäryhmässä vaarallinen arvo on 0,5:n ja 0,6:n välillä, ja yli 50-vuotiailla vaaralliset arvot alkavat 0,6:sta.

Käsite "lihavuuteen liittyvät aineenvaihduntahäiriöt" tarkoittaa kroonisia sairauksia, jotka edellyttävät hoitoa lihavuuteen liittyvien runsaiden terveysvaarojen vähentämiseksi, ja esimerkkisairauksia ovat tyypin 2 diabetes, sydän- ja verisuonisairaudet ja verenpaineauti, hyperlipidemiat ja fibrinolyttiset poikkeamat.

Käsite "Fagerströmin testi" viittaa nikotiiniriippuvuuden standarditestiin, joka on nikotiiniriippuvuuden intensiteetin arviointiin tarkoitettu testi. Katso julkaisu Heatherton, T.F., Kozlowski, L.T., Frecker, R.C., Fagerström, K.O. The Fagerström test for Nicotine Dependence: A revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire. Br J Addict 1991; 86:1 119 - 1 227. Testi koostuu lyhyestä itseraportoidusta kyselylomakkeesta, joka mittaa nikotiiniriippuvuutta asteikolla 0 - 10, jossa 10 on riippuvuuden suurin taso.

Käsite "mielialan ja fyysisten oireiden asteikko" (Mood and Physical Symptoms Scale, MPSS) viittaa asteikkoon, joka kehitettiin varhain 1980-luvulla ja jota käytetään tupakoinnin vieroitusoireiden arviointiin (West R, Hajek P: Evaluation of the mood and physical symptoms scale (MPSS) to assess cigarette withdrawal. *Psychopharmacology* 2004, 177 (1-2):195 - 199). MPSS:n ydinosa ovat masentuneen mielialan, ärtyisyyden, levottomuuden, keskittymisvaikeuksien ja näläntunteen 5-pisteinen luokitus sekä tupakanhimon voimakkuuden ja tämän himon kestoajan 6-pisteinen luokitus.

Käsite "sairaala-ahdistuksen ja -masennuksen asteikko" (Hospital Anxiety and Depression Scale, HADS) tarkoittaa ahdistuksen ja masennuksen merkien seulonnan subjektiivista asteikkoa sairaala- ja avohoitopotilailla. Katso julkaisu Zigmund, A. S., Snaith, R.P., *The Hospital Anxiety and Depression scale*, Acta Psychiatr. Scand., 1983, vol. 67, sivut 361 - 370.

Esillä oleva keksintö tarjoaa käyttöön farmaseuttisen koostumuksen sen tarpeessa olevalle potilaalle annettavaksi, joka farmaseuttinen koostumus käsittää ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa.

Esillä oleva keksintö tarjoaa lisäksi käyttöön farmaseuttisen koostumuksen sen tarpeessa olevalle potilaalle annettavaksi, joka farmaseuttinen koostumus käsittää ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa ja b) S-100-proteiinia vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa.

Tämän keksinnön tämän aspektin mukainen farmaseuttinen koostumus voi olla nestemäisessä muodossa tai kiinteässä muodossa. Kukin farmaseuttiseen koostumukseen sisältyvistä vasta-aineiden aktivoituista-potensoiduista muodoista valmistetaan vasta-aineen ensimmäisestä molekyylimuodosta prosessilla, joka on homeopaattisella alalla hyväksytty. Lähtövasta-aineet voivat olla monoklonaalisia tai polyklonaalisia vasta-aineita, jotka on valmistettu tunnettujen menetelmien mukaisesti, jotka kuvataan esimerkiksi teoksissa *Immunotechniques*, G. Frimel, M., "Medityna", 1987, s. 9 - 33; ja "Hum. Antibodies. Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after", Laffly E., Sodoyer R., 2005, vol. 14, nro 1 - 2, sivut 33-55, joihin molempiin tässä viitataan.

Ajatellaan, että farmaseuttinen yhdistelmä lihavuuden ja nikotiiniriippuvuuden hoitoon annetaan 6 - 8 tabletin määränä päivittäin. Yhdessä muunnelmassa antomuoto sisältää 2 tablettia kolme kertaa päivässä. Toisessa muunnelmassa antomuoto sisältää 3 tablettia kahdesti päivässä. Vielä yhdessä muunnelmassa antomuoto sisältää 4 tablettia kahdesti päivässä. Vielä yhdessä muunnelmassa antomuoto sisältää 1 tabletin kuusi kertaa päivässä. Vielä yhdessä muunnelmassa antomuoto sisältää 2 tablettia neljä kertaa päivässä.

Monoklonaalisia vasta-aineita voidaan saada esimerkiksi hybridoomateknologian kautta. Menetelmän alkuvaihe sisältää immunisoinnin, joka perustuu jo polyklonaalisen antiseerumin valmistuksessa kehitettyihin periaatteisiin. Työn

muihin vaiheisiin kuuluu samanlaisen spesifiteetin omaavia vasta-aineklooneja tuottavien hybridisolujen tuottaminen. Niiden erillinen eristys tehdään samoilla menetelmillä kuin polyklonaalisen antiseerumin valmistuksen tapauksessa.

Polyklonaalisia vasta-aineita voidaan saada eläinten aktiivisen immunisoinnin kautta. Tätä tarkoitusta varten esimerkiksi sopivat eläimet (esim. kaniinit) saavat asianmukaista antigeeniä, joko ihmisen kannabinoidireseptoria tai S-100-proteiinia, sisältävien ruiskeiden sarjan. Eläinten immuunijärjestelmä tuottaa vastaavia vasta-aineita, jotka kerätään eläimiltä tunnetulla tavalla. Tämän menetelyn avulla voidaan valmistaa monospesifistä vasta-ainetta runsaasti sisältävä seerumi.

Vasta-aineita sisältävä seerumi voidaan haluttaessa puhdistaa esimerkiksi affiniteettikromatografialla, suolasaostuksella fraktioimalla tai ioninvaihtokromatografialla. Saatua puhdistettua vasta-ainerikastettua seerumia voidaan käyttää lähtömateriaalina vasta-aineiden aktivoidun-potensoidun muodon valmistuksessa. Vasta-aineen saadun ensimmäisen liuoksen edullinen pitoisuus liuottimessa, edullisesti vedessä tai vesi-etyylialkoholiseoksessa, on noin 0,5 - noin 5,0 mg/ml.

Edullinen menetelmä esillä olevan keksinnön mukaisen vasta-aineiden aktivoidun-potensoidun muodon tai esillä olevan keksinnön mukaisen vasta-aineiden yhdistelmän valmistamiseksi on käyttää vasta-aineiden ensimmäisen väliaineliuoksen kolmen vesi-alkoholipohjaisen laimennoksen seosta, jossa vasta-aineet ovat vastaavasti 100^{12} -, 100^{30} - ja 100^{200} -kertaisesti laimentuneita, mikä vastaa sadasosaisia homeopaattisia C12-, C30- ja C200-laimennoksia. Kiinteän annosmuodon valmistamiseksi kiinteää kantajaa käsitellään halutulla liuoksella, joka on saatu homeopaattisen prosessin kautta. Tämän keksinnön mukaisen yhdistelmän kiinteän yksikköannosmuodon saamiseksi kantajamassa kyllästetään kullakin liuoksella. Kyllästyksen kummatkin järjestykset ovat sopivia halutun yhdistelmäannosmuodon valmistamiseen.

Edullisessa suoritustavassa tämän keksinnön muodostavan aktivoidun-potensoidun muodon valmisteen lähtömateriaali on polyklonaalinen, eläimessä tuotettu vasta-aine vastaavaa antigeeniä vastaan, nimittäin ihmisen kannabinoidireseptoria ja/tai S-100-proteiinia vastaan.

Ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnattujen vasta-aineiden aktivoidun-potensoidun muodon saamiseksi haluttua antigeeniä voidaan ruiskuttaa immunogeeninä laboratorioeläimeen, edullisesti kaniineihin. Ihmisen kannabi-

noidireseptoria vastaan suunnattujen polyklonaalisten vasta-aineiden saamiseksi on mahdollista käyttää ihmisen kannabinoidireseptorin koko molekyyliä. Seuraava ihmisen kannabinoidireseptorin sekvenssi (sekvenssi nro 1) on katsotaan erityisesti sopivaksi antigeeniksi:

5 SEKVENSSI NRO 1, IHMISEN CB1-RESEPTORI

Met	Lys	Ser	Ile	Leu	Asp	Gly	Leu	Ala	Asp	Thr	Thr	Phe	Arg	Thr
1				5					10					15
Ile	Thr	Thr	Asp	Leu	Leu	Tyr	Val	Gly	Ser	Asn	Asp	Ile	Gln	Tyr
16				20					25					30
Glu	Asp	Ile	Lys	Gly	Asp	Met	Ala	Ser	Lys	Leu	Gly	Tyr	Phe	Pro
31				35					40					45
Gln	Lys	Phe	Pro	Leu	Thr	Ser	Phe	Arg	Gly	Ser	Pro	Phe	Gln	Glu
46				50					55					60
Lys	Met	Thr	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Gln	Leu	Val	Pro	Ala	Asp	Gln
61				65					70					75
Val	Asn	Ile	Thr	Glu	Phe	Tyr	Asn	Lys	Ser	Leu	Ser	Ser	Phe	Lys
76				80					85					90
Glu	Asn	Glu	Glu	Asn	Ile	Gln	Cys	Gly	Glu	Asn	Phe	Met	Asp	Ile
91				95					100					105
Glu	Cys	Phe	Met	Val	Leu	Asn	Pro	Ser	Gln	Gln	Leu	Ala	Ile	Ala
106				110					115					120
Val	Leu	Ser	Leu	Thr	Leu	Gly	Thr	Phe	Thr	Val	Leu	Glu	Asn	Leu
121				125					130					135
Leu	Val	Leu	Cys	Val	Ile	Leu	His	Ser	Arg	Ser	Leu	Arg	Cys	Arg
136				140					145					150
Pro	Ser	Tyr	His	Phe	Ile	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Leu
151				155					160					165
Gly	Ser	Val	Ile	Phe	Val	Tyr	Ser	Phe	Ile	Asp	Phe	His	Val	Phe
166				170					175					180
His	Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Asn	Val	Phe	Leu	Phe	Lys	Leu	Gly	Gly
181				185					190					195
Val	Thr	Ala	Ser	Phe	Thr	Ala	Ser	Val	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Thr
196				200					205					210
Ala	Ile	Asp	Arg	Tyr	Ile	Ser	Ile	His	Arg	Pro	Leu	Ala	Tyr	Lys
211				215					220					225
Arg	Ile	Val	Thr	Arg	Pro	Lys	Ala	Val	Val	Ala	Phe	Cys	Leu	Met
226				230					235					240
Trp	Thr	Ile	Ala	Ile	Val	Ile	Ala	Val	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	Trp
241				245					250					255
Asn	Cys	Glu	Lys	Leu	Gln	Ser	Val	Cys	Ser	Asp	Ile	Phe	Pro	His
256				260					265					270

Ile	Asp	Glu	Thr	Tyr	Leu	Met	Phe	Trp	Ile	Gly	Val	Thr	Ser	Val
271				275					280					285
Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Val	Tyr	Ala	Tyr	Met	Tyr	Ile	Leu	Trp	Lys
286				290					295					300
Ala	His	Ser	His	Ala	Val	Arg	Met	Ile	Gln	Arg	Gly	Thr	Gln	Lys
301				305					310					315
Ser	Ile	Ile	Ile	His	Thr	Ser	Glu	Asp	Gly	Lys	Val	Gln	Val	Thr
316				320					325					330
Arg	Pro	Asp	Gln	Ala	Arg	Met	Asp	Ile	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Leu
331				335					340					345
Val	Leu	Ile	Leu	Val	Val	Leu	Ile	Ile	Cys	Trp	Gly	Pro	Leu	Leu
346				350					355					360
Ala	Ile	Met	Val	Tyr	Asp	Val	Phe	Gly	Lys	Met	Asn	Lys	Leu	Ile
361				360					370					375
Lys	Thr	Val	Phe	Ala	Phe	Cys	Ser	Met	Leu	Cys	Leu	Leu	Asn	Ser
376				375					385					390
Thr	Val	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Ala	Leu	Arg	Ser	Lys	Asp	Leu	Arg
391				395					400					405
His	Ala	Phe	Arg	Ser	Met	Phe	Pro	Ser	Cys	Glu	Gly	Thr	Ala	Gln
406				410					415					420
Pro	Leu	Asp	Asn	Ser	Met	Gly	Asp	Ser	Asp	Cys	Leu	His	Lys	His
421				425					430					435
Ala	Asn	Asn	Ala	Ala	Ser	Val	His	Arg	Ala	Ala	Glu	Ser	Cys	Ile
436				440					445					450
Lys	Ser	Thr	Val	Lys	Ile	Ala	Lys	Val	Thr	Met	Ser	Val	Ser	Thr
451				455					460					465
Asp	Thr	Ser	Ala	Glu	Ala	Leu								
466				470		472								

SEKVENSSI NRO 2, IHMISEN CB2-RESEPTORI

Met	Glu	Glu	Cys	Trp	Val	Thr	Glu	Ile	Ala	Asn	Gly	Ser	Lys	Asp
1				5					10					15
Gly	Leu	Asp	Ser	Asn	Pro	Met	Lys	Asp	Tyr	Met	Ile	Leu	Ser	Gly
16				20					25					30
Pro	Gln	Lys	Thr	Ala	Val	Ala	Val	Leu	Cys	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu
31				35					40					45
Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Asn	Val	Ala	Val	Leu	Tyr	Leu	Ile	Leu	Ser
46				50					55					60
Ser	His	Gln	Leu	Arg	Arg	Lys	Pro	Ser	Tyr	Leu	Phe	Ile	Gly	Ser
61				65					70					75
Leu	Ala	Gly	Ala	Asp	Phe	Leu	Ala	Ser	Val	Val	Phe	Ala	Cys	Ser
76				80					85					90

Phe	Val	Asn	Phe	His	Val	Phe	His	Gly	Val	Asp	Ser	Lys	Ala	Val
91				95					100					105
Phe	Leu	Leu	Lys	Ile	Gly	Ser	Val	Thr	Met	Thr	Phe	Thr	Ala	Ser
106				110					115					120
Val	Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Ile	Asp	Arg	Tyr	Leu	Cys	Leu
121				125					130					135
Arg	Tyr	Pro	Pro	Ser	Tyr	Lys	Ala	Leu	Leu	Thr	Arg	Gly	Arg	Ala
136				140					145					150
Leu	Val	Thr	Leu	Gly	Ile	Met	Trp	Val	Leu	Ser	Ala	Leu	Val	Ser
151				155					160					165
Tyr	Leu	Pro	Leu	Met	Gly	Trp	Thr	Cys	Cys	Pro	Arg	Pro	Cys	Ser
166				170					175					180
Glu	Leu	Phe	Pro	Leu	Ile	Pro	Asn	Asp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Trp	Leu
181				185					190					195
Leu	Phe	Ile	Ala	Phe	Leu	Phe	Ser	Gly	Ile	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Gly
196				200					205					210
His	Val	Leu	Trp	Lys	Ala	His	Gln	His	Val	Ala	Ser	Leu	Ser	Gly
211				215					220					225
His	Gln	Asp	Arg	Gln	Val	Pro	Gly	Met	Ala	Arg	Met	Arg	Leu	Asp
226				230					235					240
Val	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Val	Leu	Leu
241				245					250					255
Ile	Cys	Trp	Phe	Pro	Val	Leu	Ala	Leu	Met	Ala	His	Ser	Leu	Ala
256				260					265					270
Thr	Thr	Leu	Ser	Asp	Gln	Val	Lys	Lys	Ala	Phe	Ala	Phe	Cys	Ser
271				275					280					285
Met	Leu	Cys	Leu	Ile	Asn	Ser	Met	Val	Asn	Pro	Val	Ile	Tyr	Ala
286				290					295					300
Leu	Arg	Ser	Gly	Glu	Ile	Arg	Ser	Ser	Ala	His	His	Cys	Leu	Ala
301				305					310					315
His	Trp	Lys	Lys	Cys	Val	Arg	Gly	Leu	Gly	Ser	Glu	Ala	Lys	Glu
316				320					325					330
Glu	Ala	Pro	Arg	Ser	Ser	Val	Thr	Glu	Thr	Glu	Ala	Asp	Gly	Lys
331				335					340					345
Ile	Thr	Pro	Trp	Pro	Asp	Ser	Arg	Asp	Leu	Asp	Leu	Ser	Asp	Cys
346				350					355					360

- 5 Kaniinien immunisoinnissa immunogeeninä (antigeeninä) käytetään edullisesti ihmisen kannabinoidireseptorin polypeptidifragmenttia. Polyklonaalisten, ihmisen kannabinoidireseptorin polypeptidifragmenttia vastaan suunnattujen vasta-aineiden saamiseksi immunogeeninä (antigeeninä) voidaan käyttää ihmisen kannabinoidireseptorin synteettistä peptidiä. Tällaiseen antigeeniin sopivia sekvenssejä (ihmisen CB1-reseptori) ovat seuraavat:

10

		Glu	Lys	Leu	Gln	Ser	Val	Cys	Ser	Asp	Ile	Phe	Pro	His
		258		260					265					270
Ile	Asp	Glu	Thr	Tyr	Leu									
271				275	276									

								Ile	Gln	Arg	Gly	Thr	Gln	Lys
								309	310					315
Ser	Ile	Ile	Ile	His	Thr	Ser	Glu	Asp	Gly	Lys	Val	Gln	Val	Thr
316				320					325					330
Arg	Pro	Asp	Gln	Ala	Arg	Met								
331				335		337								

														Lys
														300
Ala	His	Ser	His	Ala	Val	Arg	Met	Ile	Gln	Arg	Gly	Thr	Gln	Lys
301				305					310					315
Ser	Ile	Ile	Ile	His	Thr	Ser	Glu	Asp	Gly	Lys	Val	Gln	Val	Thr
316				320					325					330
Arg	Pro	Asp	Gln	Ala	Arg	Met	Asp	Ile	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	
331				335					340				344	

										Met	Ser	Val	Ser	Thr
										461				465
Asp	Thr	Ser	Ala	Glu	Ala	Leu								
466				470		472								

SEKVENSSI NRO 8

				Thr	Glu	Phe	Tyr	Asn	Lys	Ser	Leu	Ser	Ser	Phe	Lys
				79	80					85					90
Glu	Asn	Glu	Glu	Asn	Ile	Gln	Cys	Gly	Glu	Asn	Phe	Met	Asp	Ile	
91				95					100						105
Glu	Cys	Phe	Met	Val	Leu	Asn	Pro	Ser							
106				110				114							

SEKVENSSI NRO 9

															Gln
															420
Pro	Leu	Asp	Asn	Ser	Met	Gly	Asp	Ser	Asp	Cys	Leu	His	Lys	His	
421				425					430						435
Ala	Asn														
436	437														

5 SEKVENSSI NRO 10

												Gly	Thr	Gln	Lys
												312			315
Ser	Ile	Ile	Ile	His	Thr	Ser	Glu	Asp	Gly						
316				320					325						

SEKVENSSI NRO 11

				Met	Thr	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Gln	Leu	Val	Pro	Ala	Asp	Gln
				62			65					70					75
Val	Asn	Ile	Thr	Glu	Phe	Tyr	Asn	Lys	Ser	Leu	Ser	Ser	Phe	Lys			
76				80							85						90
Glu	Asn	Glu	Glu	Asn	Ile	Gln	Cys	Gly	Glu	Asn	Phe	Met	Asp	Ile			
91				95					100								105
Glu	Cys	Phe	Met	Val	Leu	Asn											
106				110		112											

SEKVENSSI NRO 12

												Val	Val	Ala	Phe	Cys	Leu	Met
												234	235					240
Trp	Thr	Ile	Ala	Ile	Val	Ile												
241				245		247												

SEKVENSSI NRO 13

				Glu	Phe	Tyr	Asn	Lys	Ser	Leu	Ser	Ser	Phe	Lys
				80					85					90
Glu	Asn	Glu	Glu	Asn	Ile	Gln	Cys	Gly	Glu	Asn	Phe	Met	Asp	Ile
91				95					100					105
Glu	Cys	Phe	Met	Val	Leu	Asn	Pro	Ser	Gln	Gln	Leu	Ala	Ile	Ala
106				110					115					120
Val	Leu	Ser	Leu	Thr	Leu									
121				125	126									

SEKVENSSI NRO 14

Asn	Glu	Glu	Asn	Ile	Gln	Cys	Gly	Glu
92			95					100

5 SEKVENSSI NRO 15

									Gly	Ser	Pro	Phe	Gln	Glu
									55					60
Lys	Met	Thr	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Gln	Leu	Val	Pro	Ala	Asp	Gln
61				65					70					75
Val	Asn	Ile	Thr	Glu	Phe	Tyr	Asn	Lys	Ser	Leu				
76				80					85	86				

SEKVENSSI NRO 16

												Ala	Tyr	Lys
												223		225
Arg	Ile	Val	Thr	Arg	Pro	Lys	Ala	Val	Val	Ala	Phe	Cys	Leu	Met
226				230					235					240
Trp	Thr	Ile	Ala	Ile	Val	Ile	Ala	Val	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	Trp
241				245					250					255
Asn														
256														

10

Ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnattujen polyklonaalisten lähtövasta-aineiden valmistamisen esimerkkimäistä menetelmää voidaan kuvata seuraavasti: kaniineihin ruiskutetaan 7. - 9. päivänä ennen verinäyttöön ottoa suoneen 1 - 3 kertaa haluttua antigeeniä, jotta kaniinin verenkierrassa olevien polyklonaalisten vasta-aineiden määrä suurenee. Immunisoinnin kuluessa otetaan

15

verinäytteitä vasta-ainemäärän testaamiseksi. Liukoisen vasta-aineen immuunireaktion enimmäistaso saavutetaan tyypillisesti 40 - 60 päivän sisällä antigeenin ensimmäisen ruiskuttamisen jälkeen. Ensimmäisen immunisointijakson päättyessä kaniineilla on 30 päivän palautumisjakso, jonka jälkeen immunisoidaan vielä uudelleen 1 - 3 suonensisäisellä ruiskeella.

Haluttuja vasta-aineita sisältävän antiseerumin saamiseksi immunisoidujen kaniinien veri kerätään kaniineista ja asetetaan 50 ml:n sentrifugointiputkeen. Putken sivuihin muodostuneet tuotehyttymät irrotetaan puulastaimella ja hyttymään asetetaan sauva putken keskelle. Veri asetetaan sitten jääkaappiin yhdeksi yöksi noin -40 °C:n lämpötilaan. Seuraavana päivänä lastaimessa oleva hyttymä poistetaan ja jäljelle jäänyttä nestettä sentrifugoidaan 10 minuuttia 13 000 kierrosta minuutissa. Supernatanttineste on kohdeantiseerumi. Saatua antiseerumi on tyypillisesti keltaista. Antiseerumiin lisätään 20-prosenttista NaN_3 :a (painopitoisuus) lopulliseen 0,02-prosenttiseen pitoisuuteen, ja antiseerumia säilytetään ennen käyttöä jäädytetyssä tilassa -20 °C:n lämpötilassa tai ilman NaN_3 :a -70 °C:n lämpötilassa. Seuraava kiinteän faasin absorbtiojärjestys sopii kannabinoidireseptoria vastaan suunnattujen kohdevasta-aineiden erottamiseen antiseerumista:

10 ml kaniinien antiseerumia laimennetaan kaksinkertaiseksi 0,15 M NaCl:lla, minkä jälkeen lisätään 6,26 g Na_2SO_4 :a, sekoitetaan ja inkuboidaan 12 - 16 tuntia 4 °C:ssa. Saostuma poistetaan sentrifugoimalla, laimennetaan 10 ml:aan fosfaattipuskuria ja dialysoidaan samaa puskuria vastaan yhden yön ajan huoneenlämmössä. Kun saostuma on poistunut, liuos siirretään DEAE-selluloosakoloniin, joka on tasapainotettu fosfaattipuskurilla. Vasta-ainefraktio määritetään mittaamalla eluaatin optinen tiheys 280 nm:ssä.

Eristetyt puhdistamattomat vasta-aineet puhdistetaan affiniteettikromatografiamenetelmällä kiinnittämällä saadut vasta-aineet kannabinoidireseptoriin, joka sijaitsee kromatografiaväliaineen liukenemattomassa matriisissa, ja eluoimalla sen jälkeen väkevillä vesipohjaisilla suolaliuoksilla.

Saatua puskuriliuosta käytetään homeopaattisen laimentamisprosessin ensimmäisenä liuksena, jota käytetään vasta-aineiden aktivoidun-potensoidun muodon valmistamiseen. Polyklonaalisten, kannabinoidireseptoria vastaan suunnattujen kaniinin vasta-aineiden ensimmäisen väliaineliuoksen edullinen pitoisuus on 0,5 - 5,0 mg/ml, edullisesti 2,0 - 3,0 mg/ml.

- Aivospesifinen S100-proteiini, joka ilmentyy neuroneissa ja gliasoluissa (astroosyyteissä ja oligodendrosyyteissä), aikaansaa suoraan tai epäsuorasti, muiden proteiinien kanssa vuorovaikutuksessa, erilaisia toimintoja keskushermostossa, jotka ovat suuntautuneet normaalien aivotointojen ylläpitämiseen, vaikutta-
- 5 en esimerkiksi oppimis- ja muistiprosesseihin, neuronien kasvuun ja elinkykyyn sekä metabolisten prosessien säätelyyn hermokudoksissa ja muissa kudoksissa. Aivospesifistä S100-proteiinia vastaan suunnattujen polyklonaalisten vasta-
- 10 aineiden saamiseksi käytetään aivospesifistä S-100-proteiinia, jonka fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia kuvataan artikkelissa M. V. Starostin, S. M. Sviridov, *Neurospecific Protein S-100, Progress of Modern Biology*, 1977, vol. 5, s. 170 - 178; kirjassa M. B. Shtark, *Brain-Specific Protein Antigens and Functions of Neuron*, Medicine, 1985; osa 12 - 14. Aivospesifinen S-100 uutetaan härän aivo-
- kudoksesta seuraavalla tekniikalla:
- nestemäisessä työssä jäädytetty härän aivokudos jauhetaan hie-

15 noksi erityismyllyllä

 - proteiinit uutetaan suhteessa 1:3 (paino/tilavuus) uuttopuskurilla ja homogenisoinnilla
 - homogenaattia kuumennetaan 10 minuuttia 60 °C:ssa ja jäädyte-

tään sitten 4 °C:seen jäähauteessa

20 – lämpölabiilit proteiinit poistetaan sentrifugoimalla

 - ammoniumsulfaattifraktiointi tehdään vaiheittain ja saostuneet proteiinit poistetaan saostuksen jälkeen
 - fraktio, joka sisältää S-100-proteiinin, saostetaan 100-prosentti-

sella kyllästetyllä ammoniumsulfaatilla; saostaminen toteutetaan pienentämällä

25 pH arvoon 4,0; haluttu fraktio kerätään sentrifugoimalla

 - sakka liuotetaan vähimmäistilavuuteen puskuria, joka sisältää ED-

TA:ta ja merkaptotaetanolia, sakka dialysoidaan deionisoidulla vedellä ja kylmä-

kuivataan

 - happamien proteiinien fraktiointia seuraa kromatografia ionivaihto-

30 väliaineella, DE-52-DEAE-selluloosalla ja sitten DEAE-Sephadex A-50:lla

 - kerätyt ja dialysoidut fraktiot, jotka sisältävän S-100-proteiinia, jae-

taan molekyylipainon mukaisesti geelisuodattamalla Sephadex G-100:lla

 - puhdistettu S-100-proteiini dialysoidaan ja kylmäkuivataan.

Puhdistetun aivospesifisen S-100-proteiinin molekyylipaino on 21 000 Da.

Koska aivospesifisessä S-100-proteiinissa on suuri pitoisuus asparagiini- ja glutamiinihappoa, aivospesifinen S-100-proteiini on erittäin hapan ja ottaa
5 äärimmäisen anodikohdan sähköendosmoosin aikana polyakryliamidigeelin epä-
jatkuvan puskurin järjestelmässä, mikä helpottaa proteiinin tunnistamista.

S-100-proteiinia vastaan suunnattuja polyklonaalisia vasta-aineita voidaan saada myös samanlaisella menetelmällä kuin kannabinoidireseptoreille kuvattu menetelmä adjuvanttia käyttäen. Koko S-100-proteiinia voidaan käyttää im-
10 munogeeninä (antigeeninä) kaniinien immunisointia varten:

SEKVENSSI NRO 17 – naudan S100B

Met	Ser	Glu	Leu	Glu	Lys	Ala	Val	Val	Ala	Leu	Ile	Asp	Val	Phe
1				5					10					15
His	Gln	Tyr	Ser	Gly	Arg	Glu	Gly	Asp	Lys	His	Lys	Leu	Lys	Lys
16				20					25					30
Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Asn	Asn	Glu	Leu	Ser	His	Phe	Leu
31				35					40					45
Glu	Glu	Ile	Lys	Glu	Gln	Glu	Val	Val	Asp	Lys	Val	Met	Glu	Thr
46				50					55					60
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Asp	Gly	Glu	Cys	Asp	Phe	Gln	Glu	Phe	Met
61				65					70					75
Ala	Phe	Val	Ala	Met	Ile	Thr	Thr	Ala	Cys	His	Glu	Phe	Phe	Glu
76				80					85					90
His	Glu													
91	92													

SEKVENSSI NRO 18 – ihmisen S100B

Met	Ser	Glu	Leu	Glu	Lys	Ala	Met	Val	Ala	Leu	Ile	Asp	Val	Phe
1				5					10					15
His	Gln	Tyr	Ser	Gly	Arg	Glu	Gly	Asp	Lys	His	Lys	Leu	Lys	Lys
16				20					25					30
Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Asn	Asn	Glu	Leu	Ser	His	Phe	Leu
31				35					40					45
Glu	Glu	Ile	Lys	Glu	Gln	Glu	Val	Val	Asp	Lys	Val	Met	Glu	Thr
46				50					55					60
Leu	Asp	Asn	Asp	Gly	Asp	Gly	Glu	Cys	Asp	Phe	Gln	Glu	Phe	Met
61				65					70					75
Ala	Phe	Val	Ala	Met	Val	Thr	Thr	Ala	Cys	His	Glu	Phe	Phe	Glu
76				80					85					90
His	Glu													
91	92													

SEKVENSSI NRO 19 – ihmisen S100A1

Met	Gly	Ser	Glu	Leu	Glu	Thr	Ala	Met	Glu	Thr	Leu	Ile	Asn	Val
1				5					10					15
Phe	His	Ala	His	Ser	Gly	Lys	Glu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Lys	Leu	Ser
16				20					25					30
Lys	Lys	Glu	Leu	Lys	Glu	Leu	Leu	Gln	Thr	Glu	Leu	Ser	Gly	Phe
31				35					40					45
Leu	Asp	Ala	Gln	Lys	Asp	Val	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Val	Met	Lys
46				50					55					60
Glu	Leu	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp	Gly	Glu	Val	Asp	Phe	Gln	Glu	Tyr
61				65					70					75
Val	Val	Leu	Val	Ala	Ala	Leu	Thr	Val	Ala	Cys	Asn	Asn	Phe	Phe
76				80					85					90
Trp	Glu	Asn	Ser											
91			94											

SEKVENSSI NRO 20 – naudan S100A1

Met	Gly	Ser	Glu	Leu	Glu	Thr	Ala	Met	Glu	Thr	Leu	Ile	Asn	Val
1				5					10					15
Phe	His	Ala	His	Ser	Gly	Lys	Glu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Lys	Leu	Ser
16				20					25					30
Lys	Lys	Glu	Leu	Lys	Glu	Leu	Leu	Gln	Thr	Glu	Leu	Ser	Gly	Phe
31				35					40					45
Leu	Asp	Ala	Gln	Lys	Asp	Ala	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Val	Met	Lys
46				50					55					60
Glu	Leu	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp	Gly	Glu	Val	Asp	Phe	Gln	Glu	Tyr
61				65					70					75
Val	Val	Leu	Val	Ala	Ala	Leu	Thr	Val	Ala	Cys	Asn	Asn	Phe	Phe
76				80					85					90
Trp	Glu	Asn	Ser											
91			94											

5

10

Antiseerumin saamiseksi valmistetaan aivospesifinen S-100-proteiini tai S-100-proteiinien (antigeenit) seos kompleksina metyloidun härän seerumialbumiinin kanssa, joka toimii kantajana Freundin täydellisen adjuvantin kanssa, ja lisätään uutettuun aivospesifiseen S-100-proteiiniin, joka ruiskutetaan laboratorieläimen ihon alle – kaniiniin selän alueelle, 1–2 ml:n määränä. Toistettu immuniisaatio tehdään 8. ja 15. päivänä. Verinäytteet otetaan (esimerkiksi korvan suones-
ta) 26. ja 28. päivänä.

Saatu antiseerumititteri on 1:500 - 1:1 000, antiseerumi muodostaa yhden presipitiinivöhykkeen hermokudosuutteen kanssa, mutta ei reagoi heterologisten kudosten uutteen kanssa ja muodostaa yhden presipitiinihiipun sekä puhtaan S-100-proteiinin että hermokudosuutteen kanssa, mikä viittaa siihen, että

5 saatu antiseerumi on monospesifinen.

Esillä olevan keksinnön mukainen vasta-aineiden aktivoitu-potensoitu muoto voidaan valmistaa ensimmäisestä liuoksesta homeopaattisella potensoinnilla, edullisesti käyttämällä pitoisuuden suhteellisen pienentämisen menetelmää laimentamalla sarjana 1 osa kutakin edeltävää liuosta (ensimmäisestä liuoksesta

10 lähtien) 9 osaan (kymmenysosaista laimentamista vasten) tai 99 osaan (sadasosaista laimentamista varten) tai 999 osaan (tuhannesosaista laimentamista varten) neutraalia liuotinta, aloittaen vasta-aineen ensimmäisen liuoksen pitoisuudesta liuottimessa, edullisesti vedessä tai vesi-etyylialkoholiseoksessa, joka on noin 0,5 - noin 5,0 mg/ml, ulkoiseen käsittelyyn yhdistettynä. Ulkoinen käsittely käsittää

15 edullisesti kunkin laimennoksen useita pystysuuntaisia ravistuksia (dynamisointi). Kuhunkin seuraavaan, haluttuun potenssitasoon tai laimennuskertoimeen laimentamiseen käytetään edullisesti erillisiä astioita. Tämä menetelmä on homeopaattisella alalla täysin hyväksytty. Katso esim. julkaisu V. Schwabe "Homeopathic medicines", M., 1967, s. 14 - 29, johon tässä viitataan ilmaistussa tarkoituksessa.

20 Esimerkiksi sadasosaisen 12-laimennoksen (merkitään C12) valmistamiseksi yksi osa ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnattujen vasta-aineiden ensimmäistä väliaineliuosta, jonka pitoisuus on 3,0 mg/ml, laimennetaan 99 osaan neutraalia vesipitoista tai vesi-alkoholi-liuotinta (edullisesti 15-prosenttinen etyylialkoholi) ja ravistellaan sitten pystysuuntaisesti useita kertoja

25 (vähintään 10) 1. sadasosaisen laimennoksen (merkitään C1) luomiseksi. Toinen sadasosainen laimennos (C2) valmistetaan 1. sadasosaisesta liuoksesta C1. Tämä menettely toistetaan 11 kertaa 12. sadasosaisen C12-laimennoksen aikaansaamiseksi. Siten 12. sadasosainen C12-laimennos edustaa liuosta, joka on saatu laimentamalla yksi osa ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnattujen

30 vasta-aineiden ensimmäistä väliaineliuosta, jonka pitoisuus on 3,0 mg/ml, 12 laimennoksen sarjana 99 osaan neutraalia liuotinta eri astioihin, mikä vastaa sadasosaista homeopaattista C12-laimennosta. C30- ja C200-laimennosten saamiseksi tehdään samanlaiset menettelyt asianmukaisella laimennuskertoimella. Väli-laimennokset voidaan testata halutussa biologisessa mallissa aktiivisuuden tarkis-

tamiseksi. Edulliset aktivoidut-potensoidut muodot vasta-aineille, jotka muodostavat tämän keksinnön, ovat C12-, C30- ja C200-laimennosten seos kullekin aktiivoidulle-potensoidulle muodolle. Kun käytetään aktiivisen aineen useiden homeopaattisten laimennosten (ensisijassa sadasosaisten) seosta biologisesti aktiivisena nestekomponenttina, koostumuksen kukin komponentti (esimerkiksi C12, C30, C200) valmistetaan erikseen edellä kuvatun menettelyn mukaisesti, kunnes saadaan toiseksi viimeinen laimennos (esimerkiksi vastaavasti laimennokseen C11, C29 ja C199 asti), ja sitten yksi osa kutakin komponenttia lisätään yhteen astiaan seoskoostumuksen mukaisesti ja sekoitetaan liuottimen tarvittavaan määrään (esimerkiksi 97 osaan sadasosaista laimennosta varten).

On mahdollista käyttää aktiivista ainetta erilaisten homeopaattisten laimennosten seoksena, esimerkiksi kymmenysosaisten ja/tai sadasosaisten (D20, C30, C100 tai C12, C30, C50 jne.) laimennosten seoksena, jonka tehokkuus määritetään kokeellisesti testaamalla laimennosta sopivassa biologisessa mallissa, esimerkiksi tämän julkaisun esimerkeissä kuvatuissa malleissa.

Potensoinnin ja pitoisuuden pienentämisen aikana pystysuuntainen ravistus voidaan korvata ulkoisella altistamisella ultraäänelle, sähkömagneettisille kentille tai vastaavalle ulkoiselle käsittelymenettelylle, joka on homeopaattisella alalla hyväksytty.

Tämän keksinnön mukainen farmaseuttinen koostumus voi edullisesti olla nestemäisessä tai kiinteässä yksikköannosmuodossa. Kun farmaseuttinen koostumus käsittää kahta vasta-ainetta, farmaseuttisen koostumuksen nestemäinen muoto käsittää kahden vasta-aineen seosta, edullisesti ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnattujen vasta-aineiden aktivoitua-potensoitua muotoa ja S-100-proteiinia vastaan suunnattujen vasta-aineiden aktivoitua-potensoitua muotoa, suhteessa 1:1. Edullinen nestemäinen kantaja on vesi tai vesi-etyylialkoholiseos.

Tämän keksinnön mukaisen farmaseuttisen koostumuksen kiinteä yksikköannosmuoto voidaan valmistaa kyllästämällä kiinteä, farmaseuttisesti hyväksyttävä kantaja aktiivisten komponenttien aktivoidun-potensoidun muodon vesiliuosten tai vesi-alkoholi-liuosten seoksella. Kun farmaseuttinen koostumus käsittää kahta vasta-ainetta, aktiiviset komponentit sekoitetaan, ensisijaisesti suhteessa 1:1, ja käytetään nestemäisenä annosmuotona. Kantaja voidaan vaihtoehtoisesti

kyllästää peräkkäin kullakin tarvittavalla laimennoksella. Molemmat kyllästämisyjärjestykset ovat hyväksyttäviä.

Kiinteän yksikköannosmuodon farmaseuttinen koostumus valmistetaan edullisesti farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan rakeista, joka kyllästettiin aiemmin vasta-aineiden aktivoitun-potensoidun muodon vesipitoisilla tai vesi-alkoholipitoisilla laimennoksilla. Kiinteä annosmuoto voi olla mikä tahansa farmaseuttisella alalla tunnettu kiinteä annosmuoto, esimerkiksi tabletti, kapseli, imeskelytabletti tai muu. Inaktiivisina farmaseuttisina aineosina voidaan käyttää glukoosia, sakkaroosia, maltoosia, tärkkelystä, isomaltoosia, isomaltia ja muita mono- oligo- ja polysakkarideja, joita käytetään farmaseuttisten aineiden valmistuksessa, sekä edellä mainittujen inaktiivisten farmaseuttisten aineosien teknologisia seoksia muiden farmaseuttisesti hyväksyttävien apuaineiden (esimerkiksi isomaltin, krospovidonin, natriumsyklamaatin, natriumsakkariinin, vedettömän sitruunahapon jne.) kanssa, joihin sisältyvät esimerkiksi liukuaineet, hajotusaineet, sideaineet ja väriaineet. Edullisia kantajia ovat laktoosi ja isomalti. Farmaseuttisen koostumuksen annosmuoto voi edelleen sisältää tavallisia farmaseuttisia täyteaineita, esimerkiksi mikrokiteistä selluloosaa ja magnesiumstearaattia.

Alla esitetään esimerkki kiinteän yksikköannosmuodon valmistamisesta. Kiinteän oraalisen muodon valmistamiseksi 100 - 300 µm laktoosirakeita kylästetään ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnattujen vasta-aineiden aktivoitun-potensoidun muodon ja/tai S-100:aa vastaan suunnattujen vasta-aineiden aktivoitun-potensoidun muodon vesi- tai vesi-alkoholi-liuoksilla suhteessa 1 kg vasta-aineliuosta / 5 tai 10 kg laktoosia (1:5 - 1:10). Kyllästämiskäsittelyä varten laktoosirakeet altistetaan kyllästyskastelulle kiehuvaan leijukerrossa kiehuvaan kattilalaitteessa (esimerkiksi Hüttlin Pilotlab, Hüttlin GmbH), jonka jälkeen rakeet kuivataan lämpimällä ilmavirtauksella alle 40 °C:n lämpötilassa. Arvioitu määrä kuivia rakeita (10 - 34 paino-osaa), jotka on kyllästetty vasta-aineiden aktivoitulla-potensoidulla muodolla, asetetaan sekoittimeen ja sekoitetaan 25 - 45 paino-osaan ”kyllästämätöntä” puhdasta laktoosia (käytetään kulujen pienentämiseksi ja teknologisen prosessin yksinkertaistamiseksi ja nopeuttamiseksi käsitellyn tehokkuutta vähentämättä) yhdessä 0,1 - 1 paino-osan magnesiumstearaattia ja 3 - 10 paino-osan mikrokiteistä selluloosaa kanssa. Saatu tablettimassa sekoitetaan tasaiseksi ja tabletoidaan suoraan kuivapuristamalla (esimerkiksi Korsch – XL 400 -tablettipuristimella) 150 - 500 mg:n, edullisesti 300 mg:n, pyöreiden pille-

rien muodostamiseksi. Taulukkotoinnin jälkeen saadaan 300 mg:n pillereitä, jotka on kyllästetty vasta-aineiden aktivoitun-potensoitun muodon yhdistelmän vesi-alkoholiliuoksella (3,0 - 6,0 mg/pilleri). Yhdistelmän jokainen komponentti, jota käytetään kantajan kyllästämiseen, on sadasosaisten homeopaattisten laimennosten, edullisesti C12:n, C30:n ja C200:n, seoksen muodossa.

Samalla kun tämä keksintö ei ole mihinkään tiettyyn teoriaan rajoittunut, uskotaan, että tässä julkaisussa kuvattu vasta-aineiden aktivoitu-potensoitu muoto ei sisällä vasta-aineen molekyyli muotoa määränä, joka on riittävä siihen biologiseen aktiivisuuteen, joka liittyy tällaiseen molekyyli muotoon. Tämän keksinnön mukaisen farmaseuttisen koostumuksen ja tämän keksinnön mukaisen farmaseuttisen yhdistelmäkoostumuksen biologinen aktiivisuus osoitetaan laajasti oheisissa esimerkeissä.

Ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa käsittävää farmaseuttista koostumusta voidaan käyttää sellaisille potilaille antamiseen, joilla esiintyy lihavuutta ja siihen liittyviä aineenvaihduntahäiriöitä.

Kuten oheisissa esimerkeissä osoitetaan, esillä olevan keksinnön mukaisen vasta-aineen aktivoitun-potensoitun antaminen aiheuttaa ruumiinpainon pienenemistä, ruumiinpainon nousun vähenemistä ja keskivartalolihavuuden vähenemistä sekä helpottaa ruuankulutuksen vähentämistä.

Yhdessä suoritusmuodossa esillä oleva keksintö tarjoaa käyttöön menetelmän lihavuuden ja siihen liittyvien aineenvaihduntahäiriöiden hoitamiseksi antamalla farmaseuttista koostumusta, joka käsittää ihmisen kannabinoidireseptoria, edullisesti kannabinoidireseptori-1:tä, vastaan suuntautuvan vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa.

Toisessa suoritusmuodossa esillä oleva keksintö tarjoaa käyttöön menetelmän ruuankulutuksen vähentämisen helpottamiseksi potilaalla, jonka odotetaan saavan etua tällaisesta vähentämisestä, antamalla farmaseuttista koostumusta, joka käsittää ihmisen kannabinoidireseptoria, edullisesti kannabinoidireseptori-1:tä, vastaan suuntautuvan vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa.

Yhdessä suoritusmuodossa saadaan aikaan menetelmät antropometristen parametrien, esimerkiksi vyötärönympäryksen, vyötärön ja lantion suhteen ja vyötärön ja pituuden suhteen, muuttamiseksi. Yhdessä suoritusmuodossa saadaan aikaan menetelmät kohteen vyötärönympäryksen pienentämiseksi, jolloin

menetelmä käsittää ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-
 aineen aktivoitua-potensoitua muotoa käsittävien farmaseuttisten koostumusten
 antamisen tämän tarpeessa olevalle kohteelle riittävänä määränä, joka on teho-
 kas kohteen vyötärönympäryksen pienentämiseen. Yhdessä suoritusmuodossa
 5 ihmisen kannabinoidireseptori on ihmisen kannabinoidireseptori-1. Yhdessä suori-
 tusmuodossa kohteen vyötärönympäryys pienenee vähintään noin 1 %:lla. Muissa
 suoritusmuodoissa kohteen vyötärönympäryys pienenee vähintään noin 1,5 %:lla,
 2 %:lla, 2,5 %:lla, 3 %:lla tai 3,5 %:lla verrattuna kohteeseen ennen ihmisen kan-
 nabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muo-
 10 toa käsittävien farmaseuttisten koostumusten antamista. Yhdessä suoritusmuo-
 dossa kohteen vyötärönympäryys pienenee vähintään noin 1 cm:llä. Toisissa suori-
 tusmuodoissa kohteen vyötärönympäryys pienenee vähintään noin 2 cm:llä, 3
 cm:llä tai 4 cm:llä verrattuna kohteeseen ennen ihmisen kannabinoidireseptoria
 vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa käsittävien far-
 15 maseuttisten koostumusten antamista.

Vielä yhdessä suoritusmuodossa esillä oleva keksintö tarjoaa käyttöön
 menetelmät kohteen ruumiinpainon pienentämiseksi, jolloin menetelmä käsittää
 ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-
 potensoitua muotoa käsittävien farmaseuttisten koostumusten antamisen tämän
 20 tarpeessa olevalle kohteelle riittävänä määränä, joka on tehokas kohteen ruu-
 miinpainon pienentämiseen. Yhdessä suoritusmuodossa ihmisen kannabinoidi-
 reseptori on ihmisen kannabinoidireseptori-1. Yhdessä suoritusmuodossa kohteen
 ruumiinpaino pienenee vähintään noin 15 %:lla. Muissa suoritusmuodoissa koh-
 teen ruumiinpaino pienenee vähintään noin 5 %:lla, 10 %:lla tai 15 %:lla verrattu-
 25 na kohteeseen ennen ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-
 aineen aktivoitua-potensoitua muotoa käsittävien farmaseuttisten koostumusten
 antamista.

Vielä yhdessä suoritusmuodossa esillä oleva keksintö tarjoaa käyttöön
 menetelmät kohteen ruumiinpainon nousun pienentämiseksi, jolloin menetelmä
 30 käsittää ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoi-
 tua-potensoitua muotoa käsittävien farmaseuttisten koostumusten antamisen tä-
 män tarpeessa olevalle kohteelle riittävänä määränä, joka on tehokas kohteen
 ruumiinpainon nousun pienentämiseksi. Yhdessä suoritusmuodossa ihmisen kan-
 nabinoidireseptori on ihmisen kannabinoidireseptori-1. Yhdessä suoritusmuodos-

sa kohteen ruumiinpainon nousu pienenee vähintään noin 60 %:lla. Muissa suori-
tusmuodoissa kohteen ruumiinpainon nousu pienenee vähintään noin 10 %:lla,
25 %:lla, 30 %:lla, 50 %:lla tai 60 %:lla verrattuna kohteeseen ennen ihmisen
kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua
5 muotoa käsittävien farmaseuttisten koostumusten antamista.

Ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen akti-
voitua-potensoitua muotoa ja S-100-proteiinia vastaan suunnatun vasta-aineen
aktivoitua-potensoitua muotoa käsittävää farmaseuttista koostumusta voidaan
käyttää sellaisille potilaille antamiseen, joilla esiintyy psykoaktiivisten aineiden,
10 edullisesti nikotiinin, riippuvuutta.

Tämän patenttihakemuksen tekijä havaitsi yllättävästi, että ihmisen
kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoidun-potensoidun
muodon ja S-100-proteiinia vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoidun-
potensoidun muodon yhdistelmä on käyttökelpoinen aineiden väärinkäytön hoi-
15 dossa.

Yhdessä suoritusmuodossa ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan
suunnatun vasta-aineen aktivoidun-potensoidun muodon ja S-100-proteiinia vas-
taan suunnatun vasta-aineen aktivoidun-potensoidun muodon yhdistelmä on käyt-
tökelpoinen nikotiiniriippuvuuden hoidossa.

Ihmisen kannabinoidireseptori-1:tä vastaan suunnatun vasta-aineen
aktivoidun-potensoidun muodon ja S-100-proteiinia vastaan suunnatun vasta-
aineen aktivoidun-potensoidun muodon yhdistelmää käsittävän farmaseuttisen
koostumuksen antaminen sellaisten potilaiden hoitamiseksi, joilla on nikotiiniriip-
puvuus, parantaa elämänlaadun parametreja, joita arvioidaan sellaisilla kriteereillä
25 kuten masennus ja ahdistuneisuus.

Kokeellisesti on osoitettu, että ihmisen kannabinoidireseptori 1:tä vas-
taan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa ja S-100-proteiinia
vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa käsittävän far-
maseuttisen koostumuksen antaminen potilaiden hoitamiseksi, joilla on niko-
tiiniriippuvuus, parantaa kykyä sietää tupakoinnin lopettaminen helpommin ja tus-
30 kattomammin MPSS-testin tulosten analyysillä mitattuna.

Kokeellisesti on osoitettu, että yhdistelmän antaminen potilaile, joilla on
Fagerströmin nikotiiniriippuvuuden testillä mitattuna ei-vaikea nikotiiniriippuvuus,
joka on > 4, johtaa tupakoinnin vähintään 23 %:n vähenemiseen 4 viikon kulues-

sa, vähintään 36 %:n vähenemiseen 8 viikon kuluessa ja vähintään 41 %:n vähenemiseen 12 viikon kuluessa. Kokeellisesti on myös osoitettu, että yhdistelmän antaminen potilaille, joilla on ei-vaikkea nikotiiniriippuvuus, johtaa Fagerströmin testin ensimmäisen keskiarvolukupisteen tilastollisesti merkitsevään pienenemiseen, joka on vähintään $1,34 \pm 0,14$.

Kokeellisesti on osoitettu, että yhdistelmän antaminen potilaile, joilla on Fagerströmin nikotiiniriippuvuuden testillä mitattuna vaikea nikotiiniriippuvuus, joka on ≥ 7 , johtaa tupakoinnin vähintään 11 %:n vähenemiseen 4 viikon kuluessa, vähintään 22 %:n vähenemiseen 8 viikon kuluessa ja vähintään 30 %:n vähenemiseen 12 viikon kuluessa. Kokeellisesti on myös osoitettu, että yhdistelmän antaminen potilaille, joilla on ei-vaikkea nikotiiniriippuvuus, johtaa Fagerströmin testin ensimmäisen keskiarvolukupisteen tilastollisesti merkitsevään pienenemiseen, joka on vähintään $4,42 \pm 0,30$.

Yhdessä suoritusmuodossa otetaan huomioon kahden toisistaan riippumattomasti valmistetun yksikköannosmuodon, joista kumpikin sisältää vasta-aineiden yhdistelmän yhtä aktivoitua-potensoitua muotoa, erillinen antaminen.

Tätä keksintöä havainnollistaa vielä viittaus oheisiin ei-rajoittaviin esimerkkeihin.

ESIMERKIT

ESIMERKKI 1.

Ihmisen kannabinoidireseptorin tyyppi 1:tä (ULD Anti-CB1) vastaan suunnattujen polyklonaalisten kaniinin vasta-aineiden, jotka oli puhdistettu anti-geenilla ja saatu ensimmäisen väliaineliuoksen hyperlaimentamisella 100^{12} -, 100^{30} - ja 100^{200} -kertaisesti (sadasosaisten homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seos), ultrapienten annosten vaikutusta kannabinoidireseptorin tyyppi 1:n toimintaan testattiin *in vitro* 2 menettelyssä: agonistimenettelyssä ja antagonistimenettelyssä.

Agonistimenettely:

Ennen kuin solut lisättiin maljan kuoppiin (96 kuopan malja, kuopan tilavuus 250 μ l), solut suspendoitiin HBSS-puskuriin (Invitrogen), joka sisälsi 20 mM HEPES-puskuria (pH=7,4). Soluja esi-inkuboitiin 10 minuuttia huoneenlämmössä 20 μ l:n ULD anti-CB1 -valmistetta kanssa. Esi-inkubaation jälkeen lisättiin

adenylaattisyklaasin NKH477-aktivaattoria. Soluja inkuboitin 10 minuuttia 37 °C:ssa ja hajotettiin. Kuoppiin lisättiin fluoresenssin vastaanottajaa (cAMF, leimattu D2) ja fluoresenssin luovuttajaa (cAMF-vasta-aineet, leimattu europium-kryptaatilla).

- 5 Peruskontrollina solususpensiota esi-inkuboitin ULD anti-CB1:n sijasta HBSS-puskurin (20 µl) läsnäollessa. Stimuloituna kontrollina solususpensiota esi-inkuboitin ULD anti-CB1:n sijasta CP 55940 -referenssiagonistin (20 µl) läsnäollessa.

- 10 Toiminnallinen aktiivisuus (cAMF-pitoisuus) arvioitiin homogeenisen fluoresenssin ja aikaresoluution menetelmällä (HTRF). Peruskontrollin fluoresenssin intensiteettiä pidettiin taustana, ja sen arvo vähennettiin kokeellisten tulosten (ULD anti-CB1) ja kontrollin (CP 55940) fluoresenssin intensiteeteistä.

- 15 Solun mitattu spesifinen vaste ULD anti-CB1:n lisäämiseen laskettiin seuraavan kaavan mukaan: fluoresenssin intensiteetti kokeessa (ULD anti-CB1) – fluoresenssin intensiteetti peruskontrollissa.

Solun mitattu spesifinen vaste referenssiagonistin (CP 55940) lisäämiseen laskettiin seuraavan kaavan mukaan: fluoresenssin intensiteetti kontrollissa (CP 55940) – fluoresenssin intensiteetti peruskontrollissa.

- 20 Tulokset ilmaistiin solun spesifisen vasteen prosenttiosuuksina referenssiagonistin lisäämisestä stimuloituun kontrolliin:

Referenssiagonistin vasteen prosenttiosuus = ((mitattu spesifinen vaste / spesifinen vaste referenssiagonistin lisäämiseen kontrollissa) x 100 %).

Antagonistimenettely:

- 25 Ennen kuin solut lisättiin maljan kuoppiin (96 kuopan malja, kuopan tilavuus 250 µl), solut suspendoitiin HBSS-puskuriin (Invitrogen), joka sisälsi 20 mM HEPES-puskuria (pH=7,4). Soluja esi-inkuboitin 5 minuuttia huoneenlämmössä 20 µl:n ULD anti-CB1:tä kanssa. Kun kuoppiin oli lisätty CP 55940 -referenssiagonistia, soluja inkuboitin 10 minuuttia huoneenlämmössä. Kuoppiin lisättiin adenylaattisyklaasin NKH477-aktivaattoria. Soluja inkuboitin 10 minuuttia 30 37 °C:ssa ja hajotettiin. Kuoppiin lisättiin fluoresenssin vastaanottajaa (cAMF, leimattu D2) ja fluoresenssin luovuttajaa (cAMF-vasta-aineet, leimattu europium-kryptaatilla).

Peruskontrollina solususpensiota esi-inkuboitiin ULD anti-CB1:n sijasta AM 281 -referenssiantagonistin (20 µl) läsnäollessa. CP 55940 –referenssiagonistia ei lisätty kuoppiin peruskontrollissa. Stimuloituna kontrollina solususpensiota esi-inkuboitiin HBSS-puskurin läsnäollessa, joka sisälsi 20 mM HEPES-puskuria (pH=7,4) ja CP 55940 -referenssiagonistia (20 µl).

Toiminnallinen aktiivisuus (cAMF-pitoisuus) arvioitiin homogeenisen fluoresenssin ja aikaresoluution menetelmällä (HTRF). Peruskontrollin fluoresenssin intensiteettiä pidettiin taustana, ja sen arvo vähennettiin kokeellisten tulosten (ULD anti-Cb1) ja kontrollin (CP 55940) fluoresenssin intensiteeteistä.

Solun mitattu spesifinen vaste ULD anti-CB1:n lisäämiseen laskettiin seuraavan kaavan mukaan: fluoresenssin intensiteetti kokeessa (ULD anti-CB1) – fluoresenssin intensiteetti peruskontrollissa.

Solun mitattu spesifinen vaste referenssiagonistin (CP 55940) lisäämiseen laskettiin seuraavan kaavan mukaan: fluoresenssin intensiteetti kontrollissa (CP 55940) – fluoresenssin intensiteetti peruskontrollissa.

Tulokset ilmaistiin solun spesifisen vasteen estymisen prosenttiosuuk-sina referenssiagonistin lisäämisestä kontrolliin:

Referenssiagonistin vasteen estymisen prosenttiosuus = $100 - ((\text{mitattu spesifinen vaste} / \text{spesifinen vaste referenssiagonistin lisäämiseen kontrollissa}) \times 100 \%)$.

Tutkimuksen tuloksena osoitettiin (katso taulukko 1), että ULD anti-CB1 muuttaa kannabinoidireseptorin tyyppin 1 toiminnallista aktiivisuutta cAMF:n solun-sisäisellä pitoisuudella mitattuna.

Koeaineella (kannabinoidireseptorin tyyppiä 1 vastaan suunnattujen vasta-aineiden ultrapienet annokset (homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seos)) oli kannabinoidireseptorin tyyppin 1 agonistiaktiivisuutta. Agonistivaikutuksen suuruusluokka 21 % tavallisen CP 55940 -agonistin vaikutukseen verrattuna (tavallista agonistivaikutusta pidetään 100 %:na).

Taulukko 1

Reseptori	Koeaine	ULD anti-CB1:n sisältö kuopassa (tilavuus, %) (kuopan kokonaistilavuus oli 200 mikrolitraa)	Agonistimenettely		Antagonistimenettely		Selitys
			Vaste ULD anti-CB1:een %	Tavallinen agonisti	Inhibitio % antagonistista	Tavallinen antagonisti	
CB1-reseptori	ULD anti-CB1	10 %	21	CP 55940	0	AM 281	ULD anti-CB1:llä on agonisti-vaikutus, jonka suuruusluokka on 21 % tavallisen agonistin vaikutukseen verrattuna

ESIMERKKI 2

Koeaine oli ihmisen kannabinoidireseptorin tyyppi 1:tä vastaan suunnattujen polyklonaalisten kaniinin vasta-aineiden (ULD Anti-CB1), jotka oli puhdistettu antigeenilla ja saatu ensimmäisen väliaineliuoksen hyperlaimentamisella 100¹²-, 100³⁰- ja 100²⁰⁰-kertaisesti (sadasosaisten homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seos), ultrapienten annosten vesiliuoksen muodossa.

Tutkimuksessa käytettiin C57B1-linjan 40:tä uroshiirtä (paino tutkimuksen alkaessa: 13,5 - 15,5 g). Kymmenen hiirtä sai tavallista vakiorehua (normaali ruokavalio), 30 hiirtä sai vakiorehua, jossa oli runsaskalorisia lisiä (runsaskalorinen ruokavalio) ja samanaikaisesti joko tislattua vettä (verrokki, 0,4 ml/hiiri) tai sibutramiinia (Meridia, 10 mg:n kapselit, *Abbott GmbH*, Saksa) (10 mg/kg) tai ULD anti-CB1:tä (0,4 ml/hiiri). Kaikkia valmisteita annettiin mahalaukuun kerran päivässä 5 kuukauden ajan. Hiirten rehunkulutus mitattiin, ennen kuin koeaineet lisättiin. Hiirten rehunkulutus mitattiin myös joka viikko sen jälkeen. Rehunkulutusta arvioitiin ruuan keskimääränä (grammoissa), jonka hiiri kulutti tutkimuksen 1 ja 2

kuukauden jälkeen, sekä rehun keskimääränä hiiren ruumiinpainon 10:tä grammaa kohden.

Koko tarkkailujakson aikana pienikaloisen ruokavalion hiiret kuluttivat keskimäärin 15 % vähemmän rehua kuin runsaskaloisen ruokavalion hiiret (taulukko 2). Sekä sibutramiini että ULD anti-CB1 pienensivät rehunkulutusta. Sibutramiinin vaikutus ilmeni jonkin verran suurempana: rehunkulutus väheni viikossa 19,3 %:lla ($p < 0,05$), kun taas ULD anti-CB1 vähensi rehunkulutusta 9,3 % verrokkiin verrattuna ($p > 0,05$). Taulukko 2 esittää tutkimuksen tulokset, erityisesti ULD anti-CB1:n ja sibutramiinin vaikutuksen C57B1-hiirten rehunkulutukseen (keskimääräiset arvot 5 tarkkailukuukauden aikana), $M \pm m$.

Taulukko 2

Valmiste	Rehunkulutus (g/hiiri) päivässä	Rehunkulutus (g / ruumiinpainon 10 g) päivässä
Normaali ruokavalio	$2,95 \pm 1,42$	$1,35 \pm 0,05$
Runsaskalorinen ruokavalio + tislattu vesi	$3,4 \pm 1,64\#$	$1,54 \pm 0,05\#$
Runsaskalorinen ruokavalio + sibutramiini	$2,75 \pm 1,36^{**}$	$1,28 \pm 0,05^{**}$
Runsaskalorinen ruokavalio + ULD anti-CB1	$3,10 \pm 2,02$	$1,44 \pm 0,08$

** – erot verrokkiin nähden ovat tilastollisesti merkitseviä ja p-arvo $< 0,01$

– erot normaaliin ruokavalioon nähden ovat merkitseviä ja p-arvo $< 0,05$.

15

Kokeen kahdennellakymmenellä viikolla runsasrasvaisen ruokavalion hiiret, jotka saivat ULD anti-CB1:tä, kuluttivat enemmän rehua kokeen ensimmäiseen viikkoon verrattuna, mikä esitetään kuviossa 1. Kuvio 1 esittää ULD anti-CB1:n ja sibutramiinin vaikutuksen C57B1-hiirten ruumiinpainon lisääntymiseen ja ruuankulutukseen painon 10:tä grammaa kohden kokeen viimeisen 20. viikon jälkeen.

20

Hiirillä, jotka saivat ULD anti-CB1:tä, havaittiin ruumiinpainon nousun 51,2 %:n väheneminen verrokkeihin verrattuna. Kokeen viimeisellä, kahdennella-

kymmenennellä viikolla sibutramiini pienensi ruumiinpainoa 51,5 %:lla verrokki-ryhmään verrattuna.

ESIMERKKI 3

Koeaine oli ihmisen kannabinoidireseptorin tyyppi 1:tä vastaan suunnattujen polyklonaalisten kaniinin vasta-aineiden (ULD Anti-CB1), jotka oli puhdistettu antigeenilla ja saatu ensimmäisen väliaineliuksen hyperlaimentamisella 100^{12} -, 100^{30} - ja 100^{200} -kertaisesti (sadasosaisten homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seos), ultrapienten annosten vesiliuoksen muodossa.

Tutkimuksessa käytettiin C57B1-linjan 33:a uroshiirtä (paino tutkimuksen alkaessa: $13,09 \pm 0,738$ g). Hiiret saivat muunneltua ruokavaliota, jossa oli suuri rasvapitoisuus (45 %), ja samanaikaisesti joko tislattua vettä (verrokki, 0,2 ml/hiiri) tai sibutramiinia (10 mg/kg) tai ULD anti-CB1:tä (0,2 ml/hiiri). Kaikki ULD anti-CB1 -valmisteet annettiin mahalaukkuun kerran päivässä 2 kuukauden ajan. Hiirten paino mitattiin Philips Cucina HR 239016 (Unkari) -sähkövaaoilla, kunnes valmisteita alettiin lisätä (alku) ja myös joka viikko niiden lisäyksen jälkeen. Hiirten ruumiinpainon suureneminen arvioitiin prosenttiosuutena alkupainosta.

Ensimmäiset 6 viikkoa lisäämisestä ULD anti-CB1 pienensi ruumiinpainon nousua hiirillä, jotka pysyivät runsasrasvaisella ruokavaliolla. Taulukko 3 esittää keskimääräistä viikottaista painoa (grammat) niiltä C57B16-hiiriltä, jotka saivat runsasrasvaista ruokavaliota ja ULD anti-CB1:tä (0,2 ml/hiiri) tai sibutramiinia (10 mg/kg) ($M \pm m$). Taulukko 3 esittää hiiren ruumiinpainon suurenemisen.

Taulukko 3

Ryhmä	Ruumiinpaino (grammoina), tutkimusviikot								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Tislattu vesi	12,18 $\pm 0,501$	15,27 $\pm 0,982$	15,27 $\pm 0,488$	16,00 $\pm 0,972$	18,18 $\pm 0,569$	17,27 $\pm 0,557$	20,18 $\pm 0,501$	20,55 $\pm 0,608$	21,45 $\pm 0,857$
Δ alkuun nähden		25,4	25,4	31,3	49,3	41,8	65,7	68,7	76,1
Sibutramiini	13,82 $\pm 1,094$	13,45 $\pm 0,474$	16,73 $\pm 0,407$ *	19,82 $\pm 0,501$ **	20,18 $\pm 0,784$	20,91 $\pm 0,563$ **	22,36 $\pm 0,927$	23,64 $\pm 1,343$	22,91 $\pm 1,091$

Δ alkuun nähdn		-2,6	21,1	43,4	46,1	51,3	61,8	71,1	65,8
ULD anti- CB1	13,27 ±0,619	16,18 ±0,182	17,45 ±0,282 **	19,64 ±0,453 **	20,18 ±0,423 *	20,18 ±0,423 **	19,82 ±0,501	21,64 ±0,364	22,00 ±0,467
Δ alkuun nähdn		21,9	31,4	47,9	52,1	52,1	49,43	63,0	65,8

Huomautus: * – $p < 0,05$ verrokkiryhmään verrattuna

** – $p < 0,001$ verrokkiryhmään verrattuna

- Kuten esitetään, ULD anti-CB1 pienentää runsasrasvaisen ruokavalion
5 hiirten ruumiinpainon nousua, vähentää ruuankulutusta eikä ole teholtaan huonompi kuin tunnettu, laajasti käytetty ruumiinpainon pienentämiseen tarkoitettu yhdiste, sibutramiini.

ESIMERKKI 4.

- 300 mg:n tabletit, jotka oli kyllästetty vesi-alkoholiliuoksella (6
10 mg/tabletti), joka sisälsi ihmisen kannabinoidireseptorin tyyppi 1:tä vastaan suunnattujen polyklonaalisten kaniinin vasta-aineiden, jotka oli puhdistettu antigeenilla ja saatu ensimmäisen väliaineliuoksen hyperlaimentamisella 100^{12} -, 100^{30} - ja 100^{200} -kertaisesti (sadasosaisten homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seos), aktivoitua-potensoitua muotoa ultrapienenä annoksena (ULD
15 anti-CB1).

- Tutkimukseen osallistui 80 henkilöä (20 miestä ja 60 naista), jotka olivat 20 - 69-vuotiaita (keski-ikä oli $40,2 \pm 1,26$ vuotta), joista 68,7 %:lla oli liiallinen ruumiinpaino tai lihavuus (aste I - III). Tutkittaville annettiin 1 tabletti 2 kertaa päivässä. Taulukko 4 esittää tutkimukseen sisältyneiden potilaiden väestölliset ja antropometriset indikaattorit. Turvallisuusanalyysiin sisällytettiin kaikkien tutkimukseen osallistuneiden henkilöiden tiedot ($n=80$). Koko osallistujien tarkkailujakson ajan havaittiin hyvä sietokyky valmisteelle. Haittavaikutuksia ei esiintynyt. Tutkittavien ryhmien kaikki osallistujat päättivät hoidon tutkimusprotokollassa esitetyissä aikarajoissa; yhtään potilasta ei poistettu tutkimuksesta aikaisin. Kun arvioitiin
25 ULD anti-CB1:n vaikutusta tutkittavien ruumiinpainon muutokseen, paljastui, että

valmisteen käyttö pienensi ruumiinpainoa 56:lla (70 %:lla) potilaista. 24:llä (30 %) potilaalla paino pysyi muuttumattomana tai suureni ei-merkityksellisesti. On kuitenkin huomattava, että näiden potilaiden joukosta 14:llä (17,5 %:lla) oli alussa normaali ruumiinpaino ($BMI < 25 \text{ kg/m}^2$).

5

Taulukko 4

Parametri		Arvo	
Ikä (vuotta)	M±m	40,2 ± 1,26	
Pituus (senttimetrejä)	M±m	167,1 ± 0,89	
Paino (kg)	M±m	80,3 ± 1,85	
Sukupuoli	mies	20 henkilöä (25 %)	
	nainen	60 henkilöä (75 %)	
BMI, kg/m ²	M ± m	28,7 ± 0,6	
BMI, kg/m ²	Alle 25	25 henkilöä (31,3 %)	Normaali ruumiinpaino
	25 – 29,99	28 henkilöä (35 %)	Liiallinen ruumiinpaino (esilihavuus)
	30 – 34,99	20 henkilöä (25 %)	I asteen lihavuus
	35 – 39,99	5 henkilöä (6,2 %)	II asteen lihavuus
	40 tai enemmän	2 henkilöä (2,5 %)	III asteen lihavuus

10 Mitä tulee niihin potilaisiin, jotka antoivat vasteen hoidolle, havaittiin tilastollisesti merkitsevä ruumiinpainon pieneneminen ($p < 0,001$). ULD anti-CB1:n vain 15 päivän antamisen jälkeen ruumiinpainon pieneneminen oli 1,1 kg (1,3 %), ja 1 kuukaudessa se saavutti 1,9 kg (2,2 %) alkuperäisestä arvosta (kuvio 2).

Mitä tulee niihin potilaisiin, jotka antoivat vasteen hoidolle, havaittiin tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,001$) vyötärön- ja reidenympäryksen pieneneminen vain yksi (1) viikko ULD anti-CB1:n antamisen aloittamisen jälkeen, ja hoidon lo-

pussa tämä saavutti vastaavasti arvot 2,3 % ja 2,7 %. Taulukossa 5 esitetään vyötärön- ja reidenympäryksen muutoksen dynamiikka.

Taulukko 5

	Päivä 1 (alku)	Päivä 7	Päivä 14	Päivä 15	Päivä 16	Päivä 22	Päivä 30	Päivä 29
vyötärön ympäryys, cm								
M±m. cm	96.3 ± 1.97	95.2 ± 2.07 **	93.7 ± 1.82 ***	94.2 ± 1.96 ***	95.1 ± 2.16 ***	94.5 ± 2.16 ***	94.3 ± 2.10 ***	94.1 ± 2.07 ***
Δ alkuun nähdessä, %		-1.1%	-2.7%	-2.2%	-1.2%	-1.9%	-2.1%	-2.3%
reiden ympäryys, cm								
M±m. cm	110.8 ± 1.52	110.8 ± 1.66 ***	109.3 ± 1.37 **	109.9 ± 1.50 ***	108.7 ± 1.60 ***	108.3 ± 1.56 ***	108.1 ± 1.58 ***	107.8 ± 1.69 ***
Δ alkuun nähdessä, %		0.0%	-1.4%	-0.8%	-1.9%	-2.3%	-2.4%	-2.7%

5 ** p < 0,01 alkuarvoon verrattuna, *** – p < 0,001 alkuarvoon verrattuna

Kun potilaiden näläntunnetta arvioitiin visuaalisen analogia-asteikolla (VAS), näläntunteen suurin intensiteetti havaittiin illan tunteina. ULD anti-CB1:n antamisen aloittamisen jälkeen 1 kuukauden lopussa näläntunne illan tunteina oli
10 merkitsevästi vähentynyt (p:n ollessa <0,001) 49,4 ± 3,75 pisteestä 42,0 ± 4,32 pisteeseen. Lisäksi havaittiin aamulla ja päivällä suuntaus näläntunteiden vähenemiseen (20,5 ± 3,23 pisteestä 13,6 ± 1,78 pisteeseen aamun tunteina, 44,7 ± 3,45 pisteestä 27,3 ± 3,72 pisteeseen päivällä). Vaikka aamunälkään liittyvät tulokset eivät saavuttaneet tilastollisesti merkitseviä arvoja hoidon lopussa, mikä
15 havainto saattaa liittyä kohtuullisiin alkuarvoihin, dynamiikkaa ei voida jättää huomiotta.

Tehty ULD anti-CB1:n kliininen tutkimus varmisti siten suuren sietokyvyn valmisteelle; koevalmisteen ottamisen aikana ei esiintynyt haittavaikutuksia.

ESIMERKKI 5. Fagerströmin testi nikotiiniriippuvuudelle

20 Tässä esimerkissä esitetään itse testi. Asianmukaiset tulokset annetaan tässä julkaisussa jäljempänä. Fagerströmin testi nikotiiniriippuvuudelle on testi, jolla arvioidaan nikotiiniriippuvuuden intensiteettiä. Katso julkaisu Heatherton, T.F., Kozlowski, L.T., Frecker, R.C., Fagerström, K.O. The Fagerström test for Nicotine Dependence: A revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire. Br J

- Addict 1991; 86:1 119 - 1 127, johon tässä viitataan. Tässä jäljempänä kuvatuissa tutkimuksissa potilaat vastasivat kaikkiin kysymyksiin. Nikotiiniriippuvuuden aste saadaan kokonaispisteistä. Nikotiiniriippuvuuden aste arvioidaan pisteiden summasta seuraavasti: alle 4 – heikko riippuvuus, 4 - 6 – keskimääräinen riippuvuus ja 7 - 10 – voimakas riippuvuus.

Taulukko 6

1. Kuinka pian heräämisen jälkeen poltat ensimmäisen savukkeesi?	
Yli 60 minuuttia	0
31–60 minuuttia	1
6–30 minuuttia	2
Alle 5 minuuttia	3
2. Onko sinun vaikea olla polttamatta paikoissa, joissa tupakointi on kielletty, esimerkiksi kokouksissa, lentokoneessa, elokuvissa jne.?	
Ei	0
Kyllä	1
3. Mistä savukkeesta sinun on vaikeinta luopua?	
Aamun ensimmäinen	1
Mistä muusta tahansa	0
4. Kuinka monta savuketta poltat päivittäin?	
Alle 10	0
11–20	1
21–30	2
31 tai useampia	3
5. Poltatko aamun ensimmäisten tuntien aikana enemmän kuin muulloin päivän aikana?	
Ei	0
Kyllä	1
6. Poltatko, vaikka olet sairaana ja sinun täytyy pysyä vuoteessa suurimman osan päivästä?	
Ei	0
Kyllä	1

ESIMERKKI 6. Mielialan ja fyysisten oireiden asteikkotesti (MPSS).

- Tässä esimerkissä esitetään itse testi. Asianmukaiset tulokset annetaan tässä julkaisussa erikseen jäljempänä. Tässä jäljempänä kuvatuissa tutkimuksissa potilaat, jotka olivat lopettaneet tupakoinnin, vastasivat 12 kysymykseen (pisteet annettiin 1 - 5 pisteen asteikolla kuhunkin kysymykseen), jotka arvioivat tuntemuksia viimeisten 24 tunnin aikana (kysymykset 1 - 7), tupakointihalua (kysymykset 8 - 9) ja fyysisten oireiden esiintymistä (kysymykset 10 - 12). Potilaat ympyröivät vain yhden numeron jokaista kysymystä kohden. Tulosten yhteenveto voidaan jakaa kolmeen osaan (M – kysymykset 1 - 7, C – kysymykset 8 - 9 ja P – kysymykset 10 - 12) tai kokonaispisteisiin, jotka voivat vaihdella vähimmäisarvosta (12 pistettä) enimmäisarvoon (60 pistettä) ja heijastavat nikotiinin vieroitusoireiden määrää.

Taulukko 7

- Merkitse kuhunkin kysymykseen, miltä sinusta on tuntunut viimeisten 24 tunnin aikana (*ympyröi vain yksi numero jokaista kysymystä kohden*)

	En ollut	Lievästi	Melko paljon	Hyvin paljon	Erittäin paljon
1. Masentunut	1	2	3	4	5
2. Ahdistunut	1	2	3	4	5
3. Ärtynyt	1	2	3	4	5
4. Huolestunut	1	2	3	4	5
5. Nälän tunne	1	2	3	4	5
6. Huono keskittyminen	1	2	3	4	5
7. Unihäiriö	1	2	3	4	5

8. Kuinka pitkään tunsit haluavasi tupakoida viimeisten 24 tunnin aikana? (*ympyröi vain yksi numero*)

Ei kertaakaan	Ei kovin pitkään	Pienemmän osan päivää	Suurimman osan päivää	Melkein koko ajan	Jatkuvasti
0	1	2	3	4	5

9. Kuinka voimakas halu tupakoida oli? (*ympyröi vain yksi numero*)

Ei ollut	Lievä	Kohtalainen	Voimakas	Hyvin voimakas	Erittäin voimakas
0	1	2	3	4	5

Oliko sinulla mitään oireita viimeisten 24 tunnin aikana? (ympyröi vain yksi numero)

	Ei	Lievä	Kohtalainen	Voimakas	Hyvin voimakas
10. Suukipu	1	2	3	4	5
11. Ummetus	1	2	3	4	5
12. Yskä/kurkkukipu	1	2	3	4	5

West, R., Hajek, P. Evaluation of the mood and physical symptoms scale (MPSS) to assess cigarette withdrawal, *Psychopharmacology*, 2004, volume 177, numerot 1 - 2, 195 - 199, johon tässä viitataan.

ESIMERKKI 7. Sairaala-ahdistuksen ja masennuksen asteikko (HADS).

Tässä esimerkissä esitetään itse testi. Asianmukaiset tulokset annetaan tässä julkaisussa erikseen jäljempänä. Sairaala-ahdistuksen ja masennuksen asteikko (HADS) on subjektiivinen asteikko ja tarkoitettu ahdistus- ja masennusoireiden seulomiseen sairaala- ja avohoitopotilailta. Katso julkaisu Zigmond, A. S., Snaith, R.P. The Hospital Anxiety and Depression scale // *Acta Psychiatr. Scand.* 1983, vol. 67, s. 361 - 370, johon tässä viitataan.

Sovellusmenetelmä: asteikkolomake annetaan potilaalle täytettäväksi, ja kaavakkeeseen liittyvät seuraavat ohjeet:

”Tutkijat uskovat, että tunteilla on voimakas merkitys useimpien sairauksien puhkeamisessa. Jos lääkärisi tietää enemmän kokemuksistasi, hän voi paremmin auttaa sinua. Tämä kyselylomake on suunniteltu auttamaan lääkäriäsi ymmärtämään tunteesi. Sinun ei tarvitse kiinnittää huomiota kyselylomakkeen vasemmalla puolella oleviin numeroihin ja kirjaimiin. Lue jokainen väite huolellisesti ja merkitse vasemmalla olevaan tyhjään tilaan ”X” sen vastauksen viereen, joka parhaiten vastaa sitä, miltä sinusta on viime viikolla tuntunut. Älä ajattele liikaa kutakin väitettä. Ensimmäinen reaktiosi on aina paras.”

Asteikossa on 14 väitettä, jotka on jaettu 2 ala-asteikkoon: ”ahdistus” (parittomien numeroiden kysymykset – 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13) ja ”masennus” (parillisten numeroiden kysymykset – 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14). Kussakin väitteessä on 4

mahdollista vastausta, jotka heijastavat tuntemuksen tai tunteen suuruusluokkaa sekä kuvaavat kasvavasti oireen vakavuutta 0:sta (puuttuu) 3:een (maksimi).

- Kun tuloksia tulkitaan, kunkin ala-asteikon kokonaisindikaattori otetaan huomioon 3 arvoväliin jaettuna: 0–7, joka osoittaa ”normaalia” (luotettavasti ilmaistujen ahdistus- ja masennusoireiden puuttuminen); 8–10, joka osoittaa ”subkliinistä ahdistusta/masennusta” sekä 11 ja enemmän, joka osoittaa ”kliinistä ahdistusta/masennusta.”

Taulukko 8

1	Olen jännittynyt, en ole oma itseni --- aina --- usein --- silloin tällöin, joskus --- en koe tätä lainkaan	3 2 1 0
2	Se mikä aiemmin antoi minulle suurta tyydytystä, ei enää anna minulle samaa tunnetta --- ehdottomasti niin --- luultavasti niin --- vain vähäisessä määrin --- ei lainkaan niin	0 1 2 3
3	Pelkään, että jotakin pahaa tulee tapahtumaan --- ehdottomasti niin, ja pelko on hyvin voimakas --- kyllä, näin on, mutta pelko ei ole kovin voimakas --- joskus, mutta se ei huolestuta minua --- en koe tätä lainkaan	3 2 1 0
4	Pystyn nauramaan ja näkemään jotain hauskaa jossakin tapahtumassa --- ehdottomasti niin --- luultavasti niin --- vain vähäisessä määrin --- en kykene tähän lainkaan	0 1 2 3
5	Levottomat ajatukset täyttävät mieleni --- jatkuvasti --- suurimman osan aikaa	3 2

	--- silloin tällöin	1
	--- vain joskus	0
6	Olen hyvällä tuulella	
	--- ei lainkaan	3
	--- hyvin harvoin	2
	--- joskus	1
	--- käytännössä katsoen aina	0
7	Minun on helppo istua paikalleni ja rauhoittua	
	--- ehdottomasti niin	0
	--- luultavasti niin	1
	--- vain harvoin	2
	--- en voi tehdä niin lainkaan	3
8	Minusta tuntuu, että olen alkanut tehdä kaiken hitaasti	
	--- käytännössä katsoen aina	3
	--- usein	2
	--- joskus	1
	--- ei lainkaan	0
9	Tunnen sisäistä levottomuutta tai hermostuneisuutta	
	--- en koe tätä lainkaan	0
	--- joskus	1
	--- usein	2
	--- hyvin usein	3
1 0	En huolehdi ulkonäöstäni	
	--- ehdottomasti niin	3
	--- en käytä niin paljon aikaa tähän kuin minun pitäisi	2
	--- ehkä, olen alkanut huomioida sitä vähemmän	1
	--- huolehdin itsestäni samalla tavoin kuin ennenkin	0
1 1	Tunnen levottomuutta, aivan kuin minun tarvitsisi koko ajan liikkua	
	--- ehdottomasti niin	3
	--- luultavasti niin	2
	--- vain vähäisessä määrin	1
	--- en tunne näin lainkaan	0
1	Tunnen, että asiani (toimintani, kiinnostukseni) voivat antaa minulle	

2	tyytytyksen tunteen	0
	--- samalla tavoin kuin ennenkin	1
	--- kyllä, mutta ei niin paljon kuin ennen	2
	--- huomattavasti vähemmän kuin tavallisesti	3
	--- en tunne siten lainkaan	
1	Minulla on äkillisiä paniikkitunteita	
3	--- hyvin usein	3
	--- melko usein	2
	--- ei kovin usein	1
	--- ei tapahdu lainkaan	0
1	Saan tyydytystä hyvästä kirjasta, radio- tai televisio-ohjelmasta	
4	--- usein	0
	--- joskus	1
	--- harvoin	2
	--- hyvin harvoin	3

Zigmond, A. S., Snaith, R.P. The Hospital Anxiety and Depression scale, Acta Psychiatr. Scand. 1983, vol. 67, s. 361 - 370, johon tässä viitataan.

- ESIMERKKI 8. Vertaileva, kaksoissokkoutettu, lumekontrolloitu kliininen tutkimus
- 5 S-100-proteiinia vastaan suunnattujen vasta-aineiden ultrapienien annosten ja CB1-reseptoria vastaan suunnattujen vasta-aineiden ultrapienien annosten yhdistelmän sekä CB1-reseptoria vastaan suunnattujen vasta-aineiden ultrapienien annosten arvioimiseksi kohtalaisen nikotiiniriippuvuuden ja lihavuuden hoidossa.

- Tässä tutkimuksessa käytettiin 300 mg:n tabletteja, jotka oli kyllästetty
- 10 vesi-alkoholiliuoksella (6 mg/tabletti), joka sisälsi aivospesifistä S-100-proteiinia vastaan suunnattujen polyklonaalisten kaniinin vasta-aineiden (ULD anti-S100) ja kannabinoidireseptorin tyyppi 1:tä vastaan suunnattujen polyklonaalisten kaniinin vasta-aineiden (ULD anti-CB1), jotka oli kumpikin saatu ensimmäisen väliaineliuoksen hyperlaimentamisella 100¹²-, 100³⁰- ja 100²⁰⁰-kertaisesti (sadasosaisten
- 15 homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seos), ultrapieniä annoksia (ULD anti-S100 + ULD anti-CB1). Lisäksi tässä tutkimuksessa käytettiin 300 mg:n tabletteja, jotka oli kyllästetty vesi-alkoholiliuoksella (6 mg/tabletti), joka sisälsi

kannabinoidireseptorin tyyppi 1:tä vastaan suunnattujen polyklonaalisten kaniinin vasta-aineiden (ULD anti-CB1), jotka oli saatu ensimmäisen väliaineliuksen hyperlaimentamisella 100^{12} -, 100^{30} - ja 100^{200} -kertaisesti (sadasosaisten homeopaat-tisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seos), ultrapieniä annoksia.

5 Vertailevaa, kaksoissokkoutettuun, lumekontrolloituun tutkimukseen, jossa arvioitiin ULD anti-S100 + ULD anti-CB1 -yhdistelmän ja anti-CB1:n tehoa nikotiiniriippuvuuden hoidossa, sisältyi 59 potilasta, jotka halusivat lopettaa tupa-
koinnin. Aktiivisen valmisteen ryhmään sisältyi 22 potilasta, joille annettiin ULD
10 anti-S100 + ULD anti-CB1:tä 1 tabletti 3 kertaa päivässä. Vertailuvalmisteen ryh-
mään sisältyi 17 potilasta, ja heille annettiin ULD anti-Cb1:tä 1 tabletti 3 kertaa
päivässä. Lumeryhmään sisältyi 20 potilasta, ja heille annettiin 1 tabletti 3 kertaa
päivässä (tabletti, jossa oli rakeistettua laktoosia ja täyteaineita ilman mitään aktii-
visia aineosia). Hoito kesti 12 viikkoa. Kaikki kolme potilasryhmää olivat vertailu-
kelpoisia alun väestöllisiin, antropometrisiin ja kliinisen laboratorion indikaattorei-
15 hin nähden. Kaikilla potilailla oli Fagerströmin testin mukaan vähäisemmän asteen
nikotiiniriippuvuus (alle 4 pistettä), he olivat tupakoineet yli yhden vuoden ajan, ja
heillä oli asteen yksi (1) lihavuus (painoindeksi [BMI] = $30,0 - 34,9 \text{ kg/m}^2$). Kaikki
tutkimuksen potilaat päättivät hoidon tutkimusprotokollan edellyttämässä aikajak-
soissa; yhtään potilasta ei poistettu tutkimuksesta aikaisin.

20 Tulosanalyysi osoitti, että tupakoinnin lopettavien potilaiden määrä suu-
reni niiden potilaiden joukossa, jotka saivat ULD anti-S100+ULD anti-CB1:tä ja
ULD anti-CB1:tä (taulukko 9). ULD anti-S100+ULD-ryhmässä se osa potilaita, jot-
ka lopettivat tupakoinnin hoidon 4 viikon aikana, oli 23 %; 8 viikon aikana 36 %, ja
12 viikon lopussa määrä saavutti 41 %. ULD anti-CB1 -ryhmässä vastaavat indi-
25 kaattorit olivat 12 %, 24 % ja 29 % (verrattuna lumeryhmän vastaaviin lukuihin
5 %, 5 % ja 10 %). Hoidon tehon ero tärkeimmän tehokkuusparametrin mukaisesti
lumehoitoon verrattuna oli 31 % (ULD anti-S100+ULD -ryhmälle) ja 19 % (ULD
anti-CB1 -ryhmälle), ja ero oli tilastollisesti merkitsevä.

30 ULD anti-S100+ULD anti-CB1:n vaikutuksen arviointi osoitti huomatta-
vaa pienenemistä nikotiiniriippuvuudessa sekä ryhmällä kokonaisuudessaan että
potilaiden sillä alaryhmällä, jotka eivät kyenneet lopettamaan tupakointia. Fager-
strömin testin ensimmäiset keskimääräiset kokonaispisteet olivat $2,67 \pm 0,14$. Kah-
dentoista viikon hoidon aikana luku pieneni arvoon $1,33 \pm 0,14$; lisäksi pienenemi-
nen oli tilastollisesti merkitsevää, ei ainoastaan alun indikaattorien suhteen, vaan

myös lumeryhmään verrattuna. Potilaat, jotka saivat ULD anti-CB1:tä ja jotka eivät lopettaneet tupakointia, osoittivat myös positiivista dynamiikkaa, mitä tulee heidän nikotiiniriippuvuutensa ilmentymiin, jotka olivat hoidon 3 kuukauden jälkeen merkittävästi pienempiä alkutasoihin ja lumelääkkeeseen nähden.

- 5 Mielialan ja fyysikaalisten oireiden asteikon (MPSS) tulosanalyysi osoitti, että nikotiinin vieroitusoireet vähenivät asteittain niiden potilaiden joukossa, jotka lopettivat tupakoinnin, saavuttaen vähimmäisarvonsa 12 viikkoa hoidon aloittamisen jälkeen sekä ULD anti-S100+ULD anti-CB1:llä että ULD anti-CB1:llä (taulukko 9). Pienin kokonaisarvo rekisteröitiin ULD anti-S100+ULD anti-CB1 -ryhmässä,
- 10 mikä osoittaa, että ULD anti-S100+ULD anti-CB1- ja ULD anti-CB1 -yhdistelmä mahdollisti tupakoinnin lopettamisen kestämissä helpommin ja tuskattomammin, myös pelkkään ULD anti-CB1:een verrattuna.

Taulukko 9

Perusindikaattorien dynamiikka hoitomuodon mukaisesti

Ajanjakso	ULD anti-S100+ULD anti-CB1 (M±SE)	ULD anti-CB1 (M±SE)	Lumeet (M±SE)
Fagerström-testi, pisteet (n – tupakoitsijoiden määrä)			
Alku	2,64±0,10 (n=22)	2,65±0,12 (n=17)	2,65±0,11 (n=20)
Alku	2,67±0,14 (n=12)	2,58±0,14 (n=12)	2,66±0,11 (n=18)
12 viikkoa	1,33±0,14* # (n=12)	1,25±0,13* (n=12)	2,39±0,26 (n=18)
Osuus potilaita, jotka lopettivat tupakoinnin, %			
4 viikkoa	23% (n=5)	12% (n=2)	5% (n=1)
8 viikkoa	36% (n=8)	24% (n=4)	5% (n=1)
12 viikkoa	41% (n=10)	29% (n=5)	10% (n=2)
Oireasteikko (MPSS) pienentynyt, pisteet (n – tupakoinnin lopettavien määrä)			
4 viikkoa	33,4±1,25 (n=5)	33,00±2,00 (n=2)	36 (n=1)
8 viikkoa	28,12±1,02 (n=8)	25,50±2,22 (n=4)	34 (n=1)
12 viikkoa	14,85± 2,41* ** (n=10)	20,80±1,62* (n=5)	32,50±0,50 (n=2)
Sairaala-ahdistuksen ja -masennuksen asteikko (HADS), pisteet (n – tutkittujen potilaiden määrä)			

Alku	11,73±0,36 (n=22)	11,41±0,50 (n=17)	11,4±0,44 (n=20)
4 viikkoa	10,32±0,32 (n=22)	10,47±0,30 (n=17)	11,95±0,45 (n=20)
8 viikkoa	8,59±0,33 (n=22)	9,88±0,32 (n=17)	12,55±0,35 (n=20)
12 viikkoa	7,68± 0,46* # (n=22)	9,41±0,35 (n=17)	12,05±0,18 (n=20)

Huomautus: * eron tilastollinen merkitsevyys lumeryhmään nähden, $p<0,05$

** erojen tilastollinen merkitsevyys ULD anti-S100+ULD anti-CB1- ja

ULD anti-CB1 -ryhmien välillä, $p<0,05$

erojen tilastollinen merkitsevyys alkuarvoihin nähden

- 5 Kaikissa tutkimukseen sisältyneissä potilasryhmissä oli potilaita, joilla esiintyi ensimmäisen asteen lihavuutta. Tutkimuksen kaikkien ryhmien potilailta mitattiin painoindeksi (BMI) säännöllisin väliajoin. Tutkimuksen tulokset esitetään taulukossa 10.

Taulukko 10

- 10 Keskimääräiset erot alkupainon ja nykyisen painon (kg) välillä kullakin käynnillä

Ajanjakso	ULD anti-S100+ULD anti-CB1 (n=22; M±SE)	ULD anti-CB1 (n=17; M±SE)	Lume (n=20; M±SE)
0	0±0,0	0±0,0	0±0,0
2 viikkoa	-1,2±0,5	-0,9±0,3	-0,4±0,2
4 viikkoa	-1,7±0,4	-1,5±0,5	-0,5±0,4
6 viikkoa	-2,5±0,4	-2,2±0,6	-1,3±0,4
8 viikkoa	-3,1±0,7*	-2,8±0,7*	-1,3±0,4
10 viikkoa	-3,8±0,6*	-3,4±0,8*	-1,8±0,5*
12 viikkoa	-4,2±0,9*	-3,8±1,0*	-1,8±0,6*

Huomautus: Muutoksen tilastollisen merkitsevyyden arviointiin käytettiin Studentin kaksitahoisia kriteereitä Dunnettin muunnelmassa kontrollikäynnin (käynti 0) painon vertaamiseksi kaikkiin sen jälkeisiin käynteihin.

Merkitsevät erot ($p<0,05$) on merkitty tähtimerkeillä.

- 15

Kahdentoista viikon hoitojakson tuloksena ruumiinpaino pieneni molemmissa testiryhmissä lumelääkkeeseen verrattuna. Kolmen kuukauden hoidon aikana noin puolella kahden testiryhmän potilaista (52 % ja 47 %) paino pieneni 5 % tai enemmän alkutilaan verrattuna (verrattuna lumeryhmän 15 %:iin potilaista; $p<0,05$) (kuvio 3).

- 20

Hoidon turvallisuuden arviointi, joka tehtiin hoitojakson aikaisten haitta-
 tapahtumien rekisterin sekä laboratorioindikaattorien seurantatutkimuksen perus-
 teella, osoitti hyvää sietokykyä sekä ULD anti-S100+ULD anti-CB1:lle että ULD
 anti-CB1:lle. Turvallisuusanalyysi sisälsi tiedot kaikista potilaista, jotka osallistuivat
 5 tutkimukseen (n=59). Mitään hoidon negatiivista vaikutusta keskushermostoon ei
 paljastunut; psykiatristen seurausten indikaattoreita ei esiintynyt. Indikaattorien
 seuranta sairaala-ahdistuksen ja -masennuksen asteikon avulla (HADS) varmisti
 tämän päätelmän (taulukko 9). ULD anti-S100+ULD anti-CB1 osoittivat positiivista
 vaikutusta ahdistuksen ja masennuksen oireisiin, jotka vähenivät huomattavasti
 10 hoidon loppua kohden sekä alkuarvoihin että lumelääkkeeseen verrattuna. Haitta-
 tapahtumia ei esiintynyt. Laboratorioindikaattorit, myös veren yleiset ja biokemial-
 liset analyysit sekä virtsan kliininen analyysi, eivät osoittaneet mitään merkittäviä
 poikkeamia normaaliarvoista.

Tutkimus osoitti siten ULD anti-S100+ULD anti-CB1 -yhdistelmän ja
 15 anti-CB1:n tehon ja turvallisuuden nikotiiniriippuvuuden hoidossa. Hoitojen vaiku-
 tukset olivat ilmeisiä niiden potilaiden suurista prosenttiosuuksista, jotka lopettivat
 tupakoinnin, vieroitusoireiden vähenemisestä hoidon aikana sekä nikotiiniriipu-
 vuuden vähenemisestä niillä potilailla, jotka eivät kyenneet lopettamaan tupakoin-
 tia. Kaikki havaitut vaikutukset olivat tilastollisesti merkitseviä lumeryhmään ver-
 20 rattuna. ULD anti-S100+ULD anti-CB1 -yhdistelmän teho ylitti pelkän ULD anti-
 CB1:n tehon. Turvallisuusprofiili oli erinomainen sekä ULD anti-S100+ULD anti-
 CB1 -yhdistelmälle että ULD anti-CB1:lle. Sekä ULD anti-S100+ULD anti-CB1 -
 yhdistelmä että ULD anti-CB1 eivät johtaneet kliinisesti näkyvään ahdistukseen
 ja/tai masennukseen. Lisäksi osoitettiin ruumiinpainon pieneneminen potilailla,
 25 joilla oli asteen 1 lihavuus.

ESIMERKKI 9. Vertaileva, kaksoissokkoitettu, lumekontrolloitu kliininen tutkimus
 S-100-proteiinia vastaan suunnattujen vasta-aineiden ultrapienten annosten ja
 CB1-reseptoria vastaan suunnattujen vasta-aineiden ultrapienten annosten yhdis-
 30 telmän sekä CB1-reseptoria vastaan suunnattujen vasta-aineiden ultrapienten
 annosten arvioimiseksi voimakkaan nikotiiniriippuvuuden hoidossa.

Tässä tutkimuksessa käytettiin 300 mg:n tabletteja, jotka oli kyllästetty
 vesi-alkoholiliuoksella (6 mg/tabletti), joka sisälsi aivospesifistä S-100-proteiinia

vastaan suunnattujen (ULD anti-S100) ja kannabinoidireseptorin tyyppi 1:tä vastaan suunnattujen (ULD anti-CB1) polyklonaalisten kaniinin vasta-aineiden, jotka oli kumpikin saatu ensimmäisen väliaineliuoksen hyperlaimentamisella 100¹²-, 100³⁰- ja 100²⁰⁰-kertaisesti (sadasosaisten homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seos), ultrapieniä annoksia (ULD anti-S100 + ULD anti-CB1). Lisäksi tässä tutkimuksessa käytettiin 300 mg:n tabletteja, jotka oli kyllästetty vesialkoholiliuoksella (6 mg/tabletti), joka sisälsi kannabinoidireseptorin tyyppi 1:tä vastaan suunnattujen polyklonaalisten kaniinin vasta-aineiden (ULD anti-CB1), jotka oli saatu ensimmäisen väliaineliuoksen hyperlaimentamisella 100¹²-, 100³⁰- ja 100²⁰⁰-kertaisesti (sadasosaisten homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seos), ultrapieniä annoksia.

ULD anti-S100 + ULD anti-CB1:n tehon arvioimiseksi voimakkaan nikotiiniriippuvuuden hoidossa tehtiin vertaileva, lumekontrolloitu kaksoissokkotutkimus, johon osallistui 61 potilasta, jotka satunnaisesti kolmeen ryhmään seuraavasti: 18 potilasta ensimmäiseen ryhmään (ULD anti-S100 + ULD anti-CB1, 1 tabletti 4 kertaa päivässä), 22 potilasta toiseen ryhmään (ULD anti-CB1, 1 tabletti 4 kertaa päivässä) ja 21 potilasta lumeryhmään (1 tabletti 4 kertaa päivässä) (tabletti, joka sisälsi rakeistettua laktoosia ja täyteaineita ilman mitään aktiivisia aineosia). Hoito kesti 12 viikkoa. Kolmen ryhmän potilaat olivat alkuindikaattoreiden mukaisesti vertailukelpoisia, väestölliset, fysikaaliset ja kliinisen laboratorion indikaattorit mukaan luettuina. Kaikilla osallistujilla oli Fagerströmin testin ensimmäisten tulosten mukaan voimakas nikotiiniriippuvuus (≥ 7 pistettä), ja he olivat tupakoineet yli kolme vuotta. Kuukausittaisten käyntien kuluessa potilaita seurattiin ja heille tehtiin lääkärintutkimukset ja laboratoriotutkimukset ja -testit (Fagerströmin testi, sairaala-ahdistuksen ja -masennuksen asteikkotesti [HADS]). Kaikki potilaat päättivät hoidon tutkimusprotokollan edellyttämässä aikajaksoissa; yhtään potilasta ei poistettu tutkimuksesta aikaisin.

Tutkimuksen tulokset esitetään taulukossa 11:

Taulukko 11. Perusindikaattorien dynamiikka hoitomuodon mukaisesti

Ajanjakso	ULD anti-S100 + ULD anti-CB1 (M±SE)	ULD anti-CB1 (M±SE)	Lume (M±SE)
Fagerströmin testi, pisteet (n – tupakoitsijoiden määrä)			
Alku	8,78±0,26 (n=18)	8,55±0,26 (n=22)	8,52±0,24 (n=21)
Alku	8,92±0,34 (n=12)	8,47±0,24 (n=17)	8,47±0,25 (n=20)
12 viikkoa	4,50±0,26* ** # (n=12)	6,11±0,26* (n=17)	8,73±0,23 (n=19)
Osuus potilaita, jotka lopettavat tupakoinnin, %			
4 viikkoa	11% (n=2)	9% (n=2)	5% (n=1)
8 viikkoa	22% (n=4)	14% (n=3)	5% (n=1)
12 viikkoa	30% (n=6)	23% (n=5)	10% (n=2)
Vieroitusoireiden asteikko (MPSS), pisteet (n – tupakoinnin lopettavien määrä)			
4 viikkoa	54,33±1,2 (n=2)	54,50±0,50 (n=2)	54 (n=1)
8 viikkoa	46,75±1,89 (n=4)	47,33±0,67 (n=3)	50 (n=1)
12 viikkoa	38,67± 0,88* ** (n=6)	45,22±1,11* (n=5)	53,00±1,00 (n=2)
Sairaala-ahdistuksen ja -masennuksen asteikko (HADS), pisteet (n – tutkittujen potilaiden määrä)			
Alku	12,61±0,36 (n=18)	12,50±0,29 (n=22)	11,81±0,38 (n=21)
4 viikkoa	11,17±0,31 (n=18)	11,95±0,25 (n=22)	13,05±0,47 (n=21)
8 viikkoa	9,56±0,30 (n=18)	10,86±0,22 (n=22)	13,24±0,39 (n=21)
12 viikkoa	7,72± 0,32* # (n=18)	9,50±0,19 (n=22)	12,67±0,23 (n=21)

Huomautus: * erot lumeryhmään nähden ovat tilastollisesti merkitseviä, p<0,05

** erot ULD anti-S100 + ULD anti-CB1- ja ULD anti-CB1 -ryhmien välillä ovat tilastollisesti merkitseviä, p<0,05

5 # erot alkuparametreihin nähden ovat tilastollisesti merkitseviä, p<0,05.

10 ULD anti-S100 + ULD anti-CB1 -ryhmässä osuus potilaita, jotka lopettivat tupakoinnin 4 hoitoviikon aikana, oli 11 %, 8 viikossa 22 %, ja viikon 12 lopulla luku saavutti arvon 30 %. ULD anti-CB1 -ryhmässä vastaavat indikaattorit olivat 9 %, 14 % ja 23 % (verrattuna lumeryhmän vastaaviin lukuihin 5 %, 5 % ja 10 %).

Nikotiiniriippuvuuden oireet vähenivät huomattavasti ULD anti-S100 + ULD anti-CB1:tä annettaessa sekä ryhmällä kokonaisuudessaan että sillä potilaiden alaryhmällä, jotka eivät kyenneet lopettamaan tupakointia (katso taulukko 11). Heidän keskimääräiset alkukokonaispisteensä Fagerströmin testissä olivat

5 8,92±0,34, jotka pienenevät 12 hoitoviikon aikana lähes puoleen, arvoon 4,50±0,26. Lisäksi pieneminen oli tilastollisesti merkitsevää ei ainoastaan alkuarvoihin verrattaessa, vaan myös ULD anti-CB1 -ryhmään ja lumeryhmään verrattaessa.

ULD anti-S100 + ULD anti-CB1 -yhdistelmää annettaessa potilaat

10 osoittivat myös tilastollisesti merkitsevää vieroitusoireiden vähenemistä sekä ULD anti-CB1:een ($p<0,05$) että lumeryhmään ($p<0,005$) verrattuna MPSS-asteikon tulosten perusteella, jolloin vähimmäisarvot saavutettiin 12 viikkoa hoidon aloittamisen jälkeen.

Tehtiin myös turvallisuusarviointi. Turvallisuusanalyysi sisältää tiedot

15 kaikista tutkimukseen osallistuneista potilaista ($n=61$), ja analyysi tehtiin haittatapahtumien rekisterin ja laboratorioindikaattorien seurantatutkimuksen perusteella. Tutkimuksen tulokset eivät osoittaneet ainoastaan hyvää sietokykyä ULD anti-S100 + ULD anti-CB1 -yhdistelmälle ja pelkälle anti-CB1:lle, vaan myös kaikkien lääkkeiden ottamiseen yhdistettyjen haittavaikutusten puuttumista. Mitään hoidon

20 negatiivista vaikutusta keskushermostoon ei paljastunut; psykiatristen seurausten indikaattoreita ei esiintynyt. Indikaattorien seuranta sairaala-ahdistuksen ja -masennuksen asteikon avulla (HADS) varmisti tämän päätelmän (taulukko 11). ULD anti-S100+ULD anti-CB1 osoitti positiivista vaikutusta ahdistuksen ja masennuksen oireisiin, jotka vähenivät huomattavasti hoidon loppua kohden sekä

25 alkuarvoihin että lumeeseen verrattuna. Haittatapahtumia ei esiintynyt. Laboratorioindikaattorit, myös veren yleiset ja biokemialliset analyysit sekä virtsan kliininen analyysi, eivät osoittaneet mitään merkittäviä poikkeamia normaaliarvoista.

Tutkimuksen tulokset osoittivat siten ULD anti-S100+ULD anti-CB1:n tehon ja turvallisuuden voimakkaan nikotiiniriippuvuuden hoidossa. Kahdentoista

30 viikon hoitajakson aikana lähes kolmannes tupakoitsijoista kykeni vapauttamaan itsensä nikotiiniriippuvuudestaan. Kuten taulukossa 11 esitetään, ULD anti-S100+ULD anti-CB1:n teho ylitti lumeen tehon tilastollisesti merkitsevällä tavalla. ULD anti-S100+ULD anti-CB1 paransi potilaiden kykyä kestää tupakoinnin lopettaminen helpommin ja tuskattomammin. Niiden potilaiden joukossa, jotka eivät

kyenneet lopettamaan tupakointia tarkkailujakson aikana, nikotiiniriippuvuuden oireet vähenivät ULD anti-S100+ULD anti-CB1:tä annettaessa sekä ULD anti-CB1:een että lumeeseen verrattuna.

5 Sekä ULD anti-S100+ULD anti-CB1:lle että ULD anti-CB1:lle ominaista oli erinomainen turvallisuusprofiili sekä keskushermostoon kohdistuvien haittavai-
kutusten puuttuminen.

ESIMERKKI 10.

Tutkittiin i) aivospesifistä S-100-proteiinia vastaan suunnattujen
polyklonaalisten kaniinin vasta-aineiden (ULD anti-S100) ultrapienten annosten ja
10 kannabinoidireseptorin tyyppi 1:tä vastaan suunnattujen vasta-aineiden (ULD anti-
CB1) ultrapienten annosten, jotka kumpikin oli saatu hyperlaimentamalla
ensimmäistä väliaineliuosta 100¹²-, 100³⁰- ja 100²⁰⁰-kertaisesti (sadasosaisten
homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seos), yhdistelmän (ULD anti-
S100 + ULD anti-CB1), ii) pelkän ULD anti-CB1:n sekä iii) pelkän ULD anti-
15 S100:n vaikutuksia hiirten motoriseen aktiivisuuteen näiden aineiden
antinikotiinisten ominaisuuksien arviointia varten.

Käytettiin 40:tä valkoista ulkosiittoista uroshiirtä (22 - 25 g, 1,5 kk).
Kymmeneen hiireen ei koskettu. Muille hiirille annettiin nikotiinia ihon alle 4 päivän
aikana annoksena 0,3 mg/kg. Nikotiinin antamista edelsi (1 tunti ennen) joko tislai-
20 tun veden (verrokki, 0,4 ml/hiiri) tai ULD anti-S100:n (0,4 ml/hiiri) tai ULD anti-
CB1:n (0,4 ml/hiiri) tai ULD anti-S100 + ULD anti-CB1:n (0,4 ml/hiiri) antaminen
mahalaukkuun. Kolmekymmentä minuuttia viimeisen nikotiiniannon jälkeen tehtiin
avokenttätesti. Eläimet asetettiin TruScan-valoanturilaitteen (Coulbourn, USA)
keskelle, jossa eläinten pysty- ja vaakasuuntainen lokomotorinen aktiivisuus rekis-
25 teröitiin automaattisesti kahden (2) minuutin ajan. Avokenttämällä voidaan
arvioida yhdisteiden eläinten lokomotoriseen aktiivisuuteen kohdistuvaa vaikutus-
ta (Gershenfield H.K., Neumann P.E., Mathis C., Crawley J.N., Li X., Paul S.M.
Mapping quantitative Trait Loci for Open-Field Behavior in Mice. Behavioral Gene-
tics, 1997, vol. 27, nro 3, s. 201 - 209, johon tässä viitataan ilmaistussa tarkoituk-
30 sessa). Laiteparametrit: koko 270 x 270 x 360 mm, jaettu 64 neliöön, 2,5 x 2,5,
joissa korokkeen lattialla sijaitsevat 25 mm:n aukot, valaistus 150 watin lamppu.

Nikotiini on Solanaceae-heimon kasveissa, pääasiassa tupakassa, esiintyvä alkaloidi, jolla on psykotrooppista aktiivisuutta. Nikotiinin vaikutuksen us-

kotaan olevan epäsuora perifeeristen ja keskushermoston N-koliinireseptorien kautta. Tämän alkaloidin vieminen kehoon voi annoksesta riippuen aiheuttaa ahdistus-masennus-oireiden kehittymistä, euforiaa, kiihottuneisuutta tai päinvastoin rauhallisuutta. Lisäksi nikotiinin pitkälinen käyttö johtaa riippuvuuteen. Tupakoin-

5 nin lopettamisen helpottamiseksi käytetyt valmisteet tähtäävät muunmuassa psykoemotionaalisen alueen patologisten muutosten poistamiseen, joka auttaa potilaiden vapautumista patologisesta mieltymyksestä tupakkaan.

Esillä olevassa tutkimuksessa nikotiinin antaminen johti hiirten motorisen aktiivisuuden lisääntymiseen: aktiivisuusaika piteni 8,2 %:lla ($p < 0,05$), liikuttu

10 välimatka piteni 5,1 %, tutkittujen aukkojen määrä suureni 78,2 %:lla ($p < 0,05$), tutkimuksen reaktioaika piteni 76,9 %:lla, kun taas liikkumattomuusaika päinvastoin lyheni 13,5 %:lla ($p < 0,05$) koskemattomiin eläimiin verrattuna.

Pelkällä ULD anti-S100:lla ei ollut merkitsevää vaikutusta verrokkiin nähden tutkittavien erityisparametrien suhteen. ULD anti-CB1 lyhensi hiirten

15 aktiivisuusaikaa ja liikuttua välimatkaa testiryhmässä koskemattomien hiirten tasoon nähden. ULD anti-CB1:llä ei kuitenkaan ollut vaikutusta liikkumattomuusaikaan, aukkojen määrään ja reaktioaikaan. Samaan aikaan ULD anti-CB1:n ja ULD anti-S100:n yhdistetty antaminen lyhensi aktiivisuusaikaa ja lisäsi vastaavasti liikkumattomuusaikaa koskemattomien eläinten tasoon asti, lyhensi

20 huomattavasti liikuttua välimatkaa (29,2 %:lla verrokkiin verrattuna ja 25,5 %:lla koskemattomiin eläimiin verrattuna) ja vähensi jonkin verran aktiivisuutta (aukkojen määrä pieneni 15,3 %:lla, reaktioaika lyheni 17,4 %:lla).

Siten ULD anti-CB1:n antaminen ja ULD anti-CB1:n ja ULD anti-S100:n yhdistetty antaminen vaikuttavat eläinten käytösmuutosten poistamiseen, jotka

25 nikotiinin antaminen aiheutti. ULD anti-CB1+ULD anti-S100 -yhdistelmän antaminen oli tehokkaampaa pelkän anti-CB1:n antamiseen verrattuna.

Taulukko 12. Valmisteiden vaikutus hiirten motoriseen aktiivisuuteen (avokenttä-testi), $M \pm m$

	Aktiivisuus- saika, s	Liikkumisen välimatka, cm	Liikkumat- to- muusaika, s	Tutkittujen aukkojen määrä	Tutkimuksen reaktioaika
Koskematon	74,1 $\pm$ 1,9	393,6 $\pm$ 19,6	46,0 $\pm$ 2,0	5,5 $\pm$ 1,0	2,6 $\pm$ 0,6
Verrokki	80,2 $\pm$ 1,3*	413,7 $\pm$ 15,4	39,8 $\pm$ 1,3*	9,8 $\pm$ 1,4*	4,6 $\pm$ 0,9#
ULD anti-S100	76,5 $\pm$ 1,4	434,4 $\pm$ 23,5	43,5 $\pm$ 1,4	10,0 $\pm$ 1,1 **	5,1 $\pm$ 1,0#
ULD anti-CB1	72,4 $\pm$ 1,4# #	366,3 $\pm$ 19,1	47,6 $\pm$ 1,4###	9,8 $\pm$ 0,8	5,6 $\pm$ 1,1*#
ULD anti-CB1+ULD anti-S100	74,5 $\pm$ 2,8	393,1 $\pm$ 28	45,5 $\pm$ 2,9	8,3 $\pm$ 1,5	3,8 $\pm$ 0,7

Erot koskemattomaan nähden ovat tilastollisesti merkitseviä: * – $p < 0,05$,
 ** – $p < 0,01$

5 Erot verrokkiin nähden ovat tilastollisesti merkitseviä: # – $p < 0,05$, – $p < 0,01$

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Farmaseuttinen koostumus, joka käsittää ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin
5 mainittu ihmisen kannabinoidireseptori on kannabinoidireseptori-1 (CB1).

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu vasta-aineen aktivoitu-potensoitunut muoto on suunnattu ihmisen koko kannabinoidireseptori-1:tä vastaan.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin
10 mainittu ihmisen koko kannabinoidireseptori-1 koostuu sekvenssin nro 1 mukaisesta sekvenssistä.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu vasta-aineen aktivoitu-potensoitunut muoto on suunnattu ihmisen kannabinoidireseptori-1:n polypeptidifragmenttia vastaan.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin
15 mainittu ihmisen kannabinoidireseptori-1:n polypeptidifragmentti valitaan ryhmästä, joka koostuu sekvenssien nro 3 - 16 mukaisista sekvensseistä.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu vasta-aineen aktivoitu-potensoitunut muoto on homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seoksen muodossa.
20

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu vasta-aineen aktivoitu-potensoitunut muoto on homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seoksen muodossa, jotka on kyllästetty kiinteään kantajaan.

9. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen farmaseuttinen koostumus käytettäväksi lihavuuden ja siihen liittyvien aineenvaihduntahäiriöiden hoitoon.
25

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu farmaseuttinen koostumus annetaan potilaalle yhtenä tai kahtena yksiköannosmuotona yhdestä neljään kertaa päivässä.
30

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu annosmuoto (-muodot) annetaan kahdesti päivässä.

12. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen farmaseuttinen koostumus käytettäväksi antropometristen parametrien muuttamiseen nisäkkäissä, jonka odotetaan saavan etua tällaisesta muuttamisesta.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu antropometrinen parametri on vyötärön ympärys.

14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu antropometrinen parametri on vyötärön ja pituuden suhde.

15. Patenttivaatimuksen 12 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu antropometrinen parametri on vyötärön ja lantion suhde.

16. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen farmaseuttinen koostumus käytettäväksi nisäkkään ruumiinpainon pienentämiseen.

17. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen farmaseuttinen koostumus käytettäväksi nisäkkään ruumiinpainon nousun pienentämiseen.

18. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen farmaseuttinen koostumus käytettäväksi nisäkkään ruuankulutuksen vähentämiseen nisäkkäissä, jonka odotetaan saavan etua tällaisesta vähentämisestä.

19. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen farmaseuttinen koostumus, joka käsittää lisäksi S-100-proteiinia vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoitua-potensoitua muotoa.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu S-100-proteiinia vastaan suunnattu vasta-aine on vasta-aine, joka on suunnattu koko S-100-proteiinia vastaan.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu koko S-100-proteiini koostuu sekvenssin nro 17 mukaisesta sekvenssistä.

22. Patenttivaatimuksen 19 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu S-100-proteiinia vastaan suunnattu vasta-aine on homeopaattisten C12-, C30- ja C200-laimennosten seos, jotka on kyllästetty kiinteään kantajaan.

23. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 8, 9 - 15 ja 18 - 22 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin kukin aktivoitu-potensoituu vasta-aine valmistetaan peräkkäisillä sadasosaisilla laimennoksilla, jotka yhdistetään kunkin laimennoksen ravistukseen.

24. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 19 - 22 mukainen farmaseuttinen koostumus käytettäväksi psykoaktiivisen aineen riippuvuudesta kärsivän poti-

laan hoitoon, mainitun menetelmän käsittäessä patenttivaatimuksen 19 mukaisen farmaseuttisen koostumuksen antamisen.

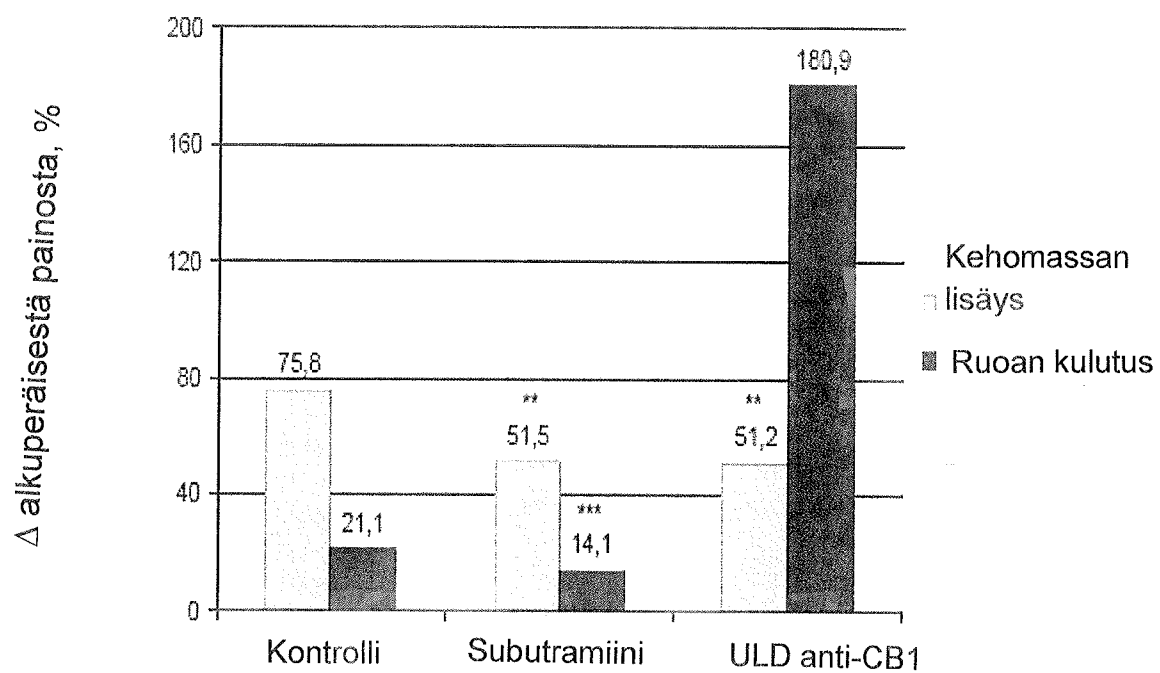
25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu psykoaktiivinen aine on nikotiini.

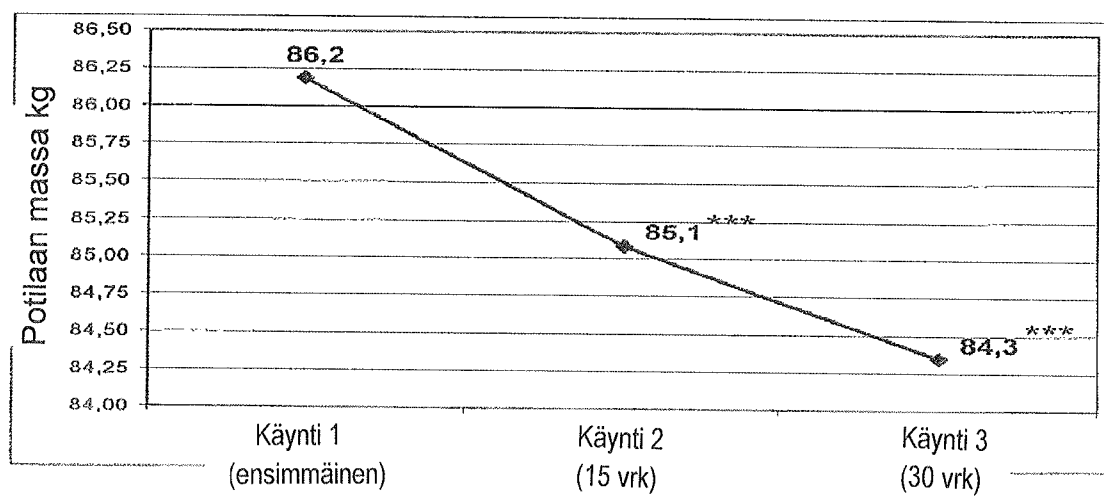
5 26. Patenttivaatimuksen 25 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu käyttö parantaa kykyä sietää tupakoinnin lopettaminen MPSS-testin tulosten analyysillä mitattuna.

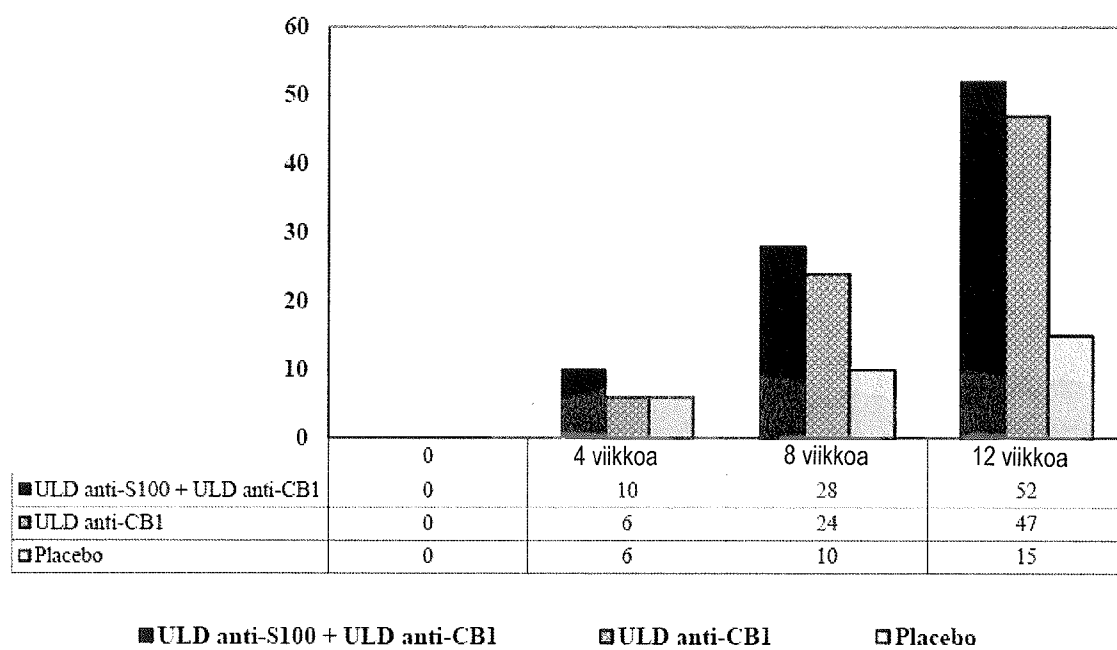
10 27. Patenttivaatimuksen 25 mukainen farmaseuttinen koostumus, jolloin mainittu käyttö vähentää tupakointia potilailla, joilla on kohtalainen nikotiiniriippuvuus Fagerströmin nikotiiniriippuvuuden testillä mitattuna.

15 28. Farmaseuttinen koostumus käytettäväksi psykoaktiivisen aineen riippuvuutta sairastavan potilaan hoitoon, jolloin mainittu koostumus on saatu saamalla aikaan a) ihmisen kannabinoidireseptoria vastaan suuntautuvan vasta-aineen potensoitu liuos ja b) S-100-proteiinia vastaan suunnatun vasta-aineen aktivoidun-potensoidun muodon potensoitu liuos, ja kumpikin on valmistettu peräkkäisellä toistetulla laimentamisella ja kunkin saadun liuoksen useilla pystysuuntaisilla ravistuksilla homeopaattisen teknologian mukaisesti, ja sitten joko yhdistämällä potensoidut liuokset sekoittamalla ne tai vaihtoehtoisesti kyllästetty kantajamassa mainitulla yhdistetyllä liuoksella tai liuoksilla erikseen.

20 29. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 15 mukainen farmaseuttinen koostumus, joka on valmistettu peräkkäisellä toistetulla laimentamisella ja kunkin saadun liuoksen useilla pystysuuntaisilla ravistuksilla homeopaattisen teknologian mukaisesti.







PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

Patentti- ja innovaatiolinja
PL1160
00101 Helsinki

TUTKIMUSRAPORTTI

PATENTTIHAKEMUS NRO		LUOKITUS	
20135146		Int.Cl. A61K 41/00 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) A61P 25/30 (2006.01) A61P 25/34 (2006.01)	CPC A61K 41/0004 C07K 16/18 C07K 16/28
TUTKITUT PATENTTILUOKAT (luokitusjärjestelmät ja luokkatiedot)			
IPC: A61K, C07K, A61P			
TUTKIMUKSESSA KÄYTETYT TIETOKANNAT			
EPO-Internal			

VIITEJULKAISUT		
Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot ja olennaiset kohdat	Koskee vaatimuksia
A	EP 2036574 A1 (EPSHTEIN OLEG ILICH [RU]) 18. maaliskuuta 2009 (18.03.2009) tiivistelmä; esimerkit 1-4; patenttivaatimukset 1-5	1-16
A	Pavlov, I. F. Effect of antibodies against S-100B antigen in ultralow doses on sucrose consumption during learning. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, kesäkuu 2007 (6.2007) Vol. 143, No. 6 koko julkaisu	1-16
A	WO 2008070305 A2 (LILLY CO ELI [US]) 12. kesäkuuta 2008 (12.06.2008) tiivistelmä; sivu 4, rivit 3-8; sivut 31-32	1-16
A	WO 2008122618 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]) 16. lokakuuta 2008 (16.10.2008) tiivistelmä; esimerkki 2; patenttivaatimukset 1-8	1-16
Jatkuu seuraavalla sivulla ☒		

*) X Julkaisu, jonka perusteella keksintö ei ole uusi tai ei eroa olennaisesti ennestään tunnetusta tekniikasta.
Y Julkaisu, jonka perusteella keksintö ei eroa olennaisesti ennestään tunnetusta tekniikasta, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu yhdessä.
A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu.

O Tullut julkiseksi esitelmän välityksellä, hyväksikäyttämällä tai muutoin muun kuin kirjoituksen avulla.
P Julkaistu ennen hakemuksen tekemispäivää mutta ei ennen aikaisinta etuoikeuspäivää.
T Julkaistu hakemuksen tekemispäivän tai etuoikeuspäivän jälkeen ja valaisee keksinnön periaatetta tai teoreettista taustaa.
E Aikaisempi suomalainen tai Suomea koskeva patentti- tai hyödyllisyysmallihakemus, joka on tullut julkiseksi hakemuksen tekemispäivänä (etuoikeuspäivänä) tai sen jälkeen.
D Julkaisu, joka on mainittu hakemuksessa.
L Julkaisu, joka kyseenalaistaa etuoikeuden, osoittaa toisen julkaisun julkaisupäivämäärän tai johon viitataan jostakin muusta syystä.

& Samaan patenttiperheeseen kuuluva julkaisu.

Tämä asiakirja on koneellisesti allekirjoitettu.

Lisätietoja liitteessä ☐

Päiväys
07.05.2014

Vanhempi tutkijainsinööri
Stiina Kaikkonen
Puhelin (09) 6939 5507

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

Patentti- ja innovaatiolinja
PL1160
00101 Helsinki

TUTKIMUSRAPORTTI

PATENTTIHAKEMUS NRO
20135146

VIITEJULKAISUT, JATKOA

Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot ja olennaiset kohdat	Koskee vaatimuksia
A	US 2005100513 A1 (WATKINS MARY B [US] et al.) 12. toukokuuta 2005 (12.05.2005) koko julkaisu	1-16