



УКРАЇНА

(19) UA (11) 49789 (13) C2

(51) B A61K38/47, C12N9/36

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ДИМЕРУ ЛІЗОЦИМУ ЯК ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ІНГІБУВАННЯ БІОСИНТЕЗУ ФАКТОРА НЕКРОЗУ ПУХЛИНИ, СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ТА ПРОФІЛАКТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ (ВАРІАНТИ), ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ (ВАРІАНТИ), ЗАСТОСУВАННЯ ДИМЕРУ ЛІЗОЦИМУ ЯК ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ АБО ЛІКУВАННЯ СНІДУ

1

(21) 95018021
(22) 13 07 1993
(24) 15 10 2002
(86) РСТ/ЕР93/01841, 13 07 1993
(31) Р-295273
(32) 13 07 1992
(33) PL
(46) 15 10 2002, Бюл. № 10, 2002 р
(72) Кічка Вітольд, PL
(73) НІКА ХЕЛС ПРОДАКС ЛІМІТЕД, LI
(56) WO, A, 89/11294, 30 11 1989
WO, A, 91/10731, 25 07 1991
(57) 1 Применение димера лизоцима в качестве активного начала лекарственного средства для ингибирования биосинтеза фактора некроза опухоли в организме человека или животного
2 Применение по пункту 1, отличающееся тем, что его используют для профилактики или лечения болезней, связанных с чрезмерно высоким уровнем фактора некроза опухоли
3 Применение по пункту 2, отличающееся тем, что его используют в случае, когда значение фактора некроза опухоли превышает 13,75нг/мл
4 Применение по любому из пунктов 1 - 3, отличающееся тем, что его используют для профилактики или лечения заболевания, выбранного из группы, которая включает СПИД, болезни, сопровождающие СПИД, сепсис, септический шок, какксию, болезни, которые при естественном течении вызывают эндотоксический шок, послеродовую агалактию, дизентерию, пиометрит, грипп, колибактериоз, энтерит, бронхопневмонию, фолликулит и болезни, вызванные парвовирусом
5 Применение по любому из пунктов 1 - 4, отличающееся тем, что его используют в комбинации с антибиотиком и/или AZT
6 Применение по любому из пунктов 1 - 5, отличающееся тем, что его используют в форме апиrogenного стерильного раствора, содержащего димер лизоцима в количестве от 0,01 до 10мг/мл
7 Применение по любому из пунктов 1 - 6, отличающееся тем, что его используют в форме для внутривенного введения в виде разовой или повторной дозы
8 Применение по любому из пунктов 1 - 7, отличающееся тем, что его используют для приема

2

разовой или повторной дозе в количестве 0,02мг димера лизоцима на 1кг веса тела
9 Применение по любому из пунктов 1 - 8, отличающееся тем, что указанное лекарственное средство представлено в форме геля или мази, содержащей эффективную дозу димера лизоцима, или в форме тампона для использования во время менструации, или антисептического перевязочного материала, пропитанного эффективным количеством димера лизоцима
10 Способ лечения или профилактики болезней, сопровождающихся чрезмерно высоким уровнем фактора некроза опухоли в организме животного или человека, отличающийся тем, что в качестве активного начала лекарственного средства для снижения уровня фактора некроза опухоли вводят димер лизоцима
11 Способ по пункту 10, отличающийся тем, что его используют в комбинации с антибиотиком и/или AZT
12 Способ по любому из пунктов 10 - 11, отличающийся тем, что его используют в форме апиrogenного стерильного раствора, содержащего димер лизоцима в количестве от 0,01 до 10мг/мл
13 Способ по любому из пунктов 10 - 12, отличающийся тем, что его используют в форме для внутривенного введения в виде разовой или повторной дозы
14 Способ по любому из пунктов 10 - 13, отличающийся тем, что его используют для приема в разовой или повторной дозе в количестве 0,02мг димера лизоцима на 1 кг веса тела
15 Способ по любому из пунктов 10 - 14, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство представлено в форме геля или мази, содержащей эффективную дозу димера лизоцима, или в форме тампона для использования во время менструации, или антисептического перевязочного материала, пропитанного эффективным количеством димера лизоцима
16 Способ профилактики или лечения сепсиса или септического шока, сопровождающихся чрезмерно высоким уровнем фактора некроза опухоли, отличающийся тем, что в качестве активного

(13) C2

(11) 49789

(19) UA

начала лекарственного средства применяют димер лизоцима

17 Способ по пункту 16, **отличающийся** тем, что димер лизоцима используют в комбинации с антибиотиком и/или AZT

18 Способ по любому из пунктов 16 - 17, **отличающийся** тем, что димер лизоцима используют в количестве от 0,01 до 10мг/мл в форме апиrogenного стерильного раствора

19 Способ по любому из пунктов 16 - 18, **отличающийся** тем, что димер лизоцима используют в форме для внутривенного введения в виде разовой или повторной дозы

20 Способ по любому из пунктов 16 - 19, **отличающийся** тем, что димер лизоцима применяют в разовой или повторной дозе в количестве 0,02мг на 1кг веса тела

21 Способ по любому из пунктов 16 - 20, **отличающийся** тем, что указанное лекарственное средство представлено в форме геля или мази, содержащей эффективную дозу димера лизоцима, или в форме тампона для использования во время менструации, или антисептического перевязочного материала, пропитанного эффективным количеством димера лизоцима

22 Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения кахексии, сопровождающейся чрезмерно высоким уровнем фактора некроза опухоли, **отличающаяся** тем, что содержит димер лизоцима, ингибирующий синтез фактора некроза опухоли в организме животного или человека

23 Фармацевтическая композиция по пункту 22, **отличающаяся** тем, что димер лизоцима используют в комбинации с антибиотиком и/или AZT

24 Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 22 - 23, **отличающаяся** тем, что она представлена в форме апиrogenного стерильного раствора, содержащего димер лизоцима в количестве от 0,01 до 10мг/мл

25 Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 22 - 24, **отличающаяся** тем, что ее используют в форме для внутривенного введения в виде разовой или повторной дозы

26 Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 22 - 25, **отличающаяся** тем, что ее используют для приема в разовой или повторной дозе в количестве 0,02мг димера лизоцима на 1 кг веса тела

27 Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 22 - 26, **отличающаяся** тем, что ее используют в форме геля или мази, содержащей эффективную дозу димера лизоцима, или в форме тампона или антисептического перевязочного материала, пропитанного эффективным количеством димера лизоцима

28 Применение димера лизоцима в качестве активного начала лекарственного средства для профилактики или лечения СПИДа или инфекционных болезней, сопровождающих СПИД, сопровождающихся чрезмерно высоким уровнем фактора некроза опухоли

29 Применение по пункту 28, **отличающееся** тем, что его используют в комбинации с антибиотиком и/или AZT

30 Применение по любому из пунктов 28 - 29, **от-**

личающееся тем, что его используют в форме апиrogenного стерильного раствора, содержащего димер лизоцима в количестве от 0,01 до 10мг/мл

31 Применение по любому из пунктов 28 - 30, **отличающееся** тем, что его используют в форме для внутривенного введения в виде разовой или повторной дозы

32 Применение по любому из пунктов 28 - 31, **отличающееся** тем, что его используют для приема в разовой или повторной дозе в количестве 0,02мг димера лизоцима на 1кг веса тела

33 Применение по любому из пунктов 28 - 32, **отличающееся** тем, что указанное лекарственное средство представлено в форме геля или мази, содержащей эффективную дозу димера лизоцима, или в форме тампона или антисептического перевязочного материала, пропитанного эффективным количеством димера лизоцима

34 Фармацевтическая композиция для ингибирования биосинтеза фактора некроза опухоли в организме человека или животного, **отличающаяся** тем, что в качестве активного начала содержит димер лизоцима

35 Фармацевтическая композиция по пункту 34, **отличающаяся** тем, что ее используют для профилактики или лечения болезней, связанных с чрезмерно высоким уровнем фактора некроза опухоли

36 Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 34 - 35, **отличающаяся** тем, что ее используют в случае, когда значение фактора некроза опухоли превышает 13,75нг/мл

37 Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 34 - 36, **отличающаяся** тем, что ее используют в комбинации с антибиотиком и/или AZT

38 Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 34 - 37, **отличающаяся** тем, что ее используют в форме апиrogenного стерильного раствора, содержащего димер лизоцима в количестве от 0,01 до 10мг/мл

39 Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 34 - 38, **отличающаяся** тем, что ее используют в форме для внутривенного введения в виде разовой или повторной дозы

40 Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 34 - 39, **отличающаяся** тем, что ее используют для приема в разовой или повторной дозе в количестве 0,02мг димера лизоцима на 1кг веса тела

41 Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 34 - 40, **отличающаяся** тем, что ее используют в форме геля или мази, содержащей эффективную дозу димера лизоцима, или в форме тампона для использования во время менструации, или антисептического перевязочного материала, пропитанного эффективным количеством димера лизоцима

42 Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 34 - 41, **отличающаяся** тем, что ее используют для профилактики или лечения заболевания, выбранного из группы, которая включает СПИД, болезни, сопровождающие СПИД, сепсис, септический шок, кахексию, болезни, которые при их естественном течении вызывают эндотоксический шок, послеродовую агалактию, дизентерию,

пиометрит, грипп, колибактериоз, энтерит, бронхопневмонию, фолликулит и болезни, вызванные

парвовирусом

Новые применения димера лизоцима и содержащих его композиции

Настоящее изобретение касается новых способов медицинского применения димера лизоцима и составов, содержащих такой димер. Новые способы применения связаны с лечением определенных дисфункций естественных защитных механизмов.

Терапевтическая эффективность мономерных форм ферментов при лечении различных болезней известна уже в течение длительного времени. Лизоцим был обнаружен Флемингом в 1922 году, но до 1950 года его ферментативные функции не были выявлены. Начиная с этого времени состав стал предметом интенсивного исследования, и появились сообщения о его различных терапевтических эффектах. Наряду с другими свойствами, указывали на противовирусные, противобактериальные, противовоспалительные и противогистаминные свойства. Однако, терапевтическое применение лизоцима было довольно ограничено из-за отрицательных побочных эффектов мономерной формы.

Это ограничение практического применения лизоцима и других терапевтически активных ферментов было преодолено в конце восьмидесятых годов, когда было обнаружено, что изолированные димеризованные формы ферментов при сохранении всех благоприятных свойств известных мономерных форм, не обладают никакими отрицательными побочными эффектами при использовании в терапевтических дозах. Противовирусные и противобактериальные составы, включающие в качестве активного ингредиента димер лизоцима или другие димеризованные ферменты, описаны в международной патентной заявке WO 89/11294. В ней сообщается, что при тестах *in vitro* димер лизоцима ингибировал пролиферацию ряда бактериальных штаммов, культивируемых на образцах культур, взятых у пациентов в концентрациях 5 - 20 мг/мл. Было также сообщено об эффективности димера при лечении инфекции парвовируса бешенства (CPV) при оральном введении дважды в день в дозе 1 - 2 мг/кг веса тела.

Поскольку изобретатель продолжал исследования, далее были найдены новые привлекательные особенности димеров лизоцима и разработаны новые способы терапевтического применения лекарства.

При клинических испытаниях, направленных на подтверждение противобактериальной и противовирусной эффективности димера лизоцима, было неожиданно обнаружено, что димер оказывает неожиданно сильное действие при лечении острых форм заболеваний пищеварительного и дыхательного трактов. Соответственно, были выполнены новые исследования чтобы определить действие димера лизоцима на те стадии различ-

ных болезней, в которых не функционируют естественные защитные механизмы.

Известно, что бактериальные токсины составляют одну группу, большого количества факторов вирулентности, которыми бактерии вызывают болезни. Некоторые последние открытия в области бактериальных токсинов касаются их взаимодействия с иммунной системой хозяина. Это взаимодействие вначале приводит к иммуномодуляции, а затем - к высвобождению цитокинов и других посредников, которые являются причиной большого количества физиологических нарушений, вызванных токсинами. Последний эффект специально изучали в отношении действия эндотоксина, который играет важную роль в патогенезе грамотрицательного сепсиса (см. Bayston, D.F., Cohen, J. Bacterial endotoxins and current concepts in the diagnosis and retreatment of endotoxaemia, J Med Microbiol 1990, 31, 73 - 83). Хотя в течение длительного времени была известна роль экзотоксинов в инфекциях, вызываемых *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes*, именно признание токсического шокового синдрома стафилококка вызвало повышенный интерес к экзотоксинам вырабатываемыми этими организмами.

Токсический шок - это серьезная болезнь, характеризующаяся высокой температурой, гипотензией, капиллярными кровотечениями, диффузной эритродермией, слизистой эритемой, почечной недостаточностью, гипокальциемией, гипоальбуминемией и шелушением при красной сыпи кожи. Многие случаи синдрома токсического шока были связаны с применением вагинальных тампонов в течение менструации, однако чаще всего синдром описывают у обоих полов в несвязанных с менструацией условиях, зачастую после хирургических процедур, когда оставляют на месте перевязочный материал (например, носовые салфетки после ринопластики или сильного кровотечения). Обнаружено, что штаммы стафилококка, взятые из вагины пациентов, перенесших синдром токсического шока (TSS), продуцируют токсин 1 синдрома токсического шока (TSST-1), но источником микроорганизма, вырабатывающего TSST-1, также может быть скрытая инфекция. Начальная бактериемия может иметь скрытую форму, но по прошествии недель и даже месяцев это может привести к развитию локализованных инфекций. Таким инфекциям могут сопутствовать случаи синдрома сепсиса или септического шока. Реже встречающаяся, но более тяжелая форма бактериемии может встречаться при отсутствии доступа микроорганизмов в орган или при местной инфекции, и в таких ситуациях может наблюдаться шок, эндокардит, распространенная внутрисосудистая коагулопатия и прекращение функционирования многих органов (см. Stevens, D.L. et al. Gram-positive shock, Current Opinions in Infections

Diseases 1992, 5 355 - 363)

Известно также, что подобные наблюдения относятся и к другой грамположительной бактерии. Например, инфекция *Streptococcus pyogenes* вызывает шок и в 30% случаев приводит к смерти. *Streptococcus pneumoniae* вызывают пневмонию, которая была зарегистрирована как имеющая высокий уровень устойчивости к пенициллину и тенденцию к развитию синдрома шока. Кроме того, пациенты, больные СПИДом, имеют более частые случаи пневмококковых инфекций, чем все население в целом.

Инфекция, вызванная грамотрицательной бактерией, может также приводить к сепсису и септическому шоку. Грамотрицательная бацилла и вибрион являются источником наиболее важных энтеротоксинов. Энтеротоксин представляет собой липополисахаридный (LPS) компонент внешней мембраны клеточных стенок грамотрицательных бактерий. Энтеротоксины прежде всего оказывают влияние на кишечный тракт и обычно вызывают понос. Наиболее частыми инфекциями, вызываемыми грамотрицательными бактериями у животных и людей, являются инфекции, вызываемые кишечной палочкой. Сопровождающее такие инфекции сильное обезвоживание может приводить к смерти инфицированного индивидуума. Согласно статистике в развивающихся странах от острого поноса каждый год погибает приблизительно 3,2 миллиона детей. Приблизительно 30% всех случаев сепсиса вызваны грамотрицательной бактерией.

Из-за сепсиса инфекции, вызываемые грамположительными и грамотрицательными бактериями, представляют собой всегда серьезное заболевание во всех странах.

В Соединенных Штатах ежегодно регистрируют около 400 000 случаев заболеваний приблизительно с 50%-ной смертностью.

В последние годы сепсис и септический шок были предметом большого количества публикаций. Замечено, что в патофизиологии септического шока, эндотоксинемии и в других бактериальных интоксикациях главную роль играют посредники. К ним относятся фактор некроза опухоли (TNF), интерлейкин-1 (IL-1), интерферон (IFN), фактор деятельности тромбоцитов и eicosanoids (производные арахидоновой кислоты), причем наиболее важный из них - TNF, который оказывает влияние на метаболизм, а также - на иммунную и фагоцитарную системы (см. Berkowitz, F.E. Bacterial toxins in pathogenesis of infections, Current Opinions in Infectious Diseases, 1991 4: 332 - 337). Было показано, что погибшие от септического шока пациенты имели более высокие концентрации TNF и интерлейкина-1. Многие авторы сообщали о повышенных уровнях TNF - а в плазме и в крови пациентов после септического шока. Было также отмечено, что токсический эффект TNF- α может в большой степени не зависеть ни от концентраций TNF, ни от их присутствия в организме.

Многие авторы исследовали возможность модуляции каскада цитокинов в сепсисе и септическом шоке. Сообщаемые успешные случаи включают применение моноклональных антител против

TNF и нейтрализацию липополисахарида с помощью антилипополисахаридных средств. Однако антитела не повышают гибель бактерий. Частично благоприятные эффекты также наблюдались при применении таких агентов, как дексаметазон и пентоксифиллин, которые блокируют продукцию TNF макрофагами.

Известно, что другие цитокины также способствуют септическому шоку. В этой ситуации вводят препараты, которые модулируют каскад цитокинов при септическом шоке и обладают способностью воздействовать на возбудителя инфекции, так как защита хозяина зависит от тех же самых цитокинов, вызванных воспалением. Поиск средств для предотвращения септического шока является главной задачей, цель которой является заключается в оказании помощи большему количеству пациентов. Для этих целей существенным является управление уровнем TNF.

Такой же критической является роль TNF и в другом защитном механизме - лихорадке, которая является типичной физиологической реакцией на инфекцию, фактически, для всех высших животных и человека. Пять пирогенных цитокинов (интерлейкин-1, TNF, интерферон, интерлейкин-2 и интерлейкин-6) в настоящее время считаются основными эндогенными посредниками лихорадочной реакции, ингибирующей преоптические термочувствительные нейроны, которые обычно облегчают снижение высокой температуры и подавляют резкое повышение температуры в организме человека. Лихорадка и ее медиаторы могут причинять вред как органу, в который они вторгаются, так и хозяину. За последние годы было накоплено значительное количество данных, подтверждающих, что интерлейкин-1, TNF и интерлейкин-6 являются медиаторами патофизиологических нарушений при инфекциях. Поскольку эндогенные пирогены способствуют патологическому процессу при различных инфекциях, то потенциальный вред хозяину причиняют как медиаторы, так и лихорадочная реакция. Наиболее убедительное свидетельство этого получено при изучении грамотрицательного сепсиса. Имеется доказательство, что эндогенные пирогены являются промежуточным звеном для системных и локальных проявлений сепсиса, вызванных инфекциями грамположительных бактерий, СПИДом, инфекциями спирохет, менингитом, респираторным дистресс-синдромом у взрослых, гнойным артритом и микобактериозом. Хотя приведенные данные противоречат наблюдению, что лихорадочная реакция, непосредственно повышает сопротивление инфекции у экспериментальных животных, тем не менее сущность процесса эволюции заключается больше в сохранении видов, чем в выживании индивидуума. Очевидно, вредные системные воздействия пирогенных цитокинов на последствия подавления, инфекций (например, грамотрицательного сепсиса) адаптируются как благоприятные локальные воздействия лихорадки при менее внезапных и быстро развивающихся инфекциях. Поэтому, ускоряя гибель безнадежно инфицированных индивидуумов, природа убивает индивидуумов, которые являются

опасными для видов. Таким путем виды в целом могут быть защищены от эпидемических болезней (см. Mackowiak, P. A. Mechanism of Fever, Current Opinions in Infectious Diseases, 1992, 5: 348 - 354).

Фундаментальная концепция лихорадки, вызванной патогенными микроорганизмами, заключается в том, что экзогенные пирогены, независимо от их происхождения или структуры, вызывают лихорадку, индуцируя клетки хозяина (прежде всего макрофаги) вырабатывать эндогенные пирогены. Соответственно, могут быть эффективны терапевтические методы, основанные на применении антиэндогенных антител пирогена и антагонистов эндогенных рецепторов пирогена. Одна из возможностей заключается в блокировании биосинтеза TNF. Исследования на животных показывают, что в каскаде реакции на инфекционную болезнь TNF может быть синтезирован прежде IL-1 и других цитокинов. Согласно мнению многих ученых, ингибирование биосинтеза TNF также означает и прекращение биосинтеза IL-1. Но ингибирование биосинтеза TNF также означает, что прекращаются вредные воздействия некоторых внезапных и безнадёжных инфекционных болезней.

TNF также известен как один из посредников воспалительных процессов. Во многих случаях воспаление - это первая стадия болезни с естественным течением, сопровождающаяся развитием септического шока. В случаях, когда нарушена целостность тканей, например, при ранах, восприимчивых к инфекции ранениях, в особенности брюшных ранах (перитоните), болезнях желудочно-кишечного тракта, таких, как острые инфекции, сопровождающие аппендицит, острых бактериальных и вирусных инфекциях, наблюдаемых при послегриппозной пневмонии, опухолевых болезнях, особенно в фазе разложения опухолей и т.п., воспаление является первым симптомом увеличения синтеза TNF. Таким образом, управление уровнем TNF является желательным при лечении таких инфекционных болезней.

Еще более значительной является роль TNF непосредственно при заболевании СПИДом. СПИД характеризуется сильно выраженным иммунодефицитом. Главный показатель СПИДа - это уменьшение числа лимфоцитов CD4+. Число клеток, инфицированных ВИЧ, этиологическим возбудителем СПИДа, относительно невелико (≤ 1 из 100 - 1000) даже в моноядерных клетках периферической крови (PBMC) пациентов, больных СПИДом. В то время, как инфицированы в основном лимфоциты CD4+, эти клетки не являются исключительными мишенями для поражения ВИЧ. Недавно получены доказательства того, что спектр клеток - мишеней для ВИЧ может быть весьма широк. Явные различия наблюдались в последствиях действия инфекционной болезни ВИЧ на моноциты (макрофаги) по сравнению с Т-лимфоцитами. В то время, как Т-лимфоциты имеют тенденцию разрушаться, моноциты (макрофаги) устойчивы к длительному заболеванию. Поэтому моноциты (макрофаги) могут сохранять ВИЧ внутри себя подобно другим клеткам организма. Тип реакции моноцита (макрофага) на инфекцию

ВИЧ может влиять на установление скрытого состояния инфекции в хозяине, причем эта реакция может также приводить к патогенным нарушениям, вызываемым растворимыми факторами, синтезируемыми инфицированными клетками (см. Tashifumi Natsuyama et al. Cytokines and HIV infection. Is AIDS a Tumor Necrosis Factor disease?, AIDS 1991, 5: 1405 - 1417). Многие ученые сообщают, что линии Т-клеток человека, инфицированные вирусом человеческого Т-клеточного лейкоза (HTLV-1), высоко чувствительны к инфекции ВИЧ и вызывают сильное действие, относящееся к заболеванию клетки, вместе с повышенной репликацией ВИЧ. Кроме того, инфицированные ВИЧ клетки чувствительны к повреждениям этих клеток супернатантом. Анализ титра вируса после лечения этим супернатантом показал, что фактор, синтезируемый Т-клетками (MT-2) повысил репликацию ВИЧ. Фактор был идентифицирован и обозначен как TNF- α , и это открытие совпадает с сообщениями о том, что Т-клетки (MT-2) синтезируют TNF- β . То же самое действие наблюдали при использовании TNF- α . TNF- α и TNF- β выборочно уничтожали инфицированные ВИЧ клетки и повышали репликацию ВИЧ. Было также сообщено, что линии Т-клеток, инфицированных ВИЧ, а также свежие изолированные клетки линии PBMC от инфицированных ВИЧ индивидуумов давали на TNF реакцию, приводящую к повышенным уровням TNF. Можно предположить, что такое же самое повышение экспрессии ВИЧ должно происходить *in vivo*. Фактически, повышающее действие TNF может быть нейтрализовано антителами против TNF.

Повышение репликации ВИЧ после лечения TNF- α и TNF- β доходит до величины $10 \pm$ около (см. Yakarnam, A. et al. Tumor necrosis factors (α, β) induced by HIV-1 in peripheral blood mononuclear cells potentiate virus replication, AIDS 1990, 4: 21 - 427).

Имеются также подтверждения, что различные цитокины могут воздействовать на репликацию ВИЧ. При применении очищенных моноядерных фагоцитов из нормальной периферической крови в течение нескольких часов после экспозиции вируса ВИЧ наблюдали индукцию как IL-6, так и TNF- α . Такую индукцию цитокина также наблюдали при использовании ВИЧ, инaktivированного высокой температурой. На основании многих наблюдений, а также сообщений Toshifumi Matsuyama et al. (op cit) был сделан вывод, что СПИД представляет собой болезнь, вызываемую цитокином или TNF. При СПИДе среди множества цитокинов основными молекулами, повышающими репликацию ВИЧ, и индуцирующими их собственную экспрессию, а также экспрессию других цитокинов, являются TNF- α и TNF- β . Доказано, что TNF- α стимулирует высвобождение других цитокинов в клетках различных типов, и поэтому является ключевым цитокином каскада цитокинов в первом защитном механизме.

Было предложено, что многие симптомы, связанные со СПИДом, можно объяснить высвобождением цитокинов, имеющих различные биологические функции. Повышение синтеза двух хорошо

известные пирогенов, таких, как IL-1 и TNF- α , может объяснить наличие лихорадки, наблюдаемой у пациентов, больных СПИДом. TNF может участвовать в кахексии, связанной со СПИДом. Как TNF- α , так и TNF- β работают как иммуномодуляторы и молекулы-эффекторы при цитотоксичности, вызываемой моноцитом-медиатором. Кроме того, TNF отвечает за активацию иммунного ответа и может непосредственно уничтожать инфицированные ВИЧ клетки, повышая таким образом репликацию ВИЧ. Был предложен также иммунологический механизм для объяснения истощения клеток CD4-T при СПИДе (Hatsuyama et al, op cit). Сообщается также, что саркома Kaposi, относящаяся к СПИДу, также вызвана TNF- α . TNF может быть получен из кератиноцитов с помощью физиологических стимулов типа ультрафиолетового света, который способствует индукции IL-6 в коже и развитию саркомы Kaposi при СПИДе. В испытаниях *in vitro* TNF- α может повреждать миелин и олигодендроциты, к тому же обнаружено, что некоторые линии клеток, полученные из глиомы, чувствительны к антипролиферативному действию TNF- α . Можно сделать вывод, что дисфункция центральной нервной системы у больных СПИДом является результатом действия TNF- α . Некоторые сообщения указывают, что уровни TNF- α и IL-1 в сыворотках существенно повышались с развитием СПИДа и ARC (комплекс болезней, связанных со СПИДом), причем они попадали в диапазон нормальных контрольных значений при испытаниях сыворотки бессимптомных носителей ВИЧ. Согласно Matsuyama et al (op cit) СПИД - это болезнь, вызываемая как TNF, так и ВИЧ. Это показывает, что установление контроля над индукцией TNF может привести к осуществлению эффективной терапии для пациентов, больных СПИДом.

Следующие основные открытия позволили решить вышеописанные проблемы и найти новые терапевтические применения димера лизоцима при вышеупомянутых патологических состояниях:

- 1 Димер лизоцима ингибирует синтез TNF
- 2 Димер лизоцима стимулирует синтез IFN- α
- 3 Димер лизоцима повышает фагоцитарную активность

Соответственно, целью настоящего изобретения является создание фармацевтических составов, терапевтически пригодных для лечения болезней, связанных с чрезмерно высокими уровнями описаного выше TNF (фактора некроза опухоли).

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтических составов, пригодных для профилактики болезней, связанных с чрезмерно высокими уровнями описаного выше TNF.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтических составов и гигиенических изделий, пригодных для терапии и предотвращения болезней, связанных с увеличением и чрезмерно высокими уровнями TNF.

Согласно изобретению, указанные цели могут быть достигнуты следующими новыми способами

использования димеризованной формы лизоцима и новыми фармацевтическими составами, содержащими димер лизоцима в качестве активного компонента

- применением димера лизоцима для изготовления лекарственного средства для ингибирования биосинтеза фактора некроза опухоли у животных и человека,

- применением димера лизоцима для изготовления фармацевтического препарата для лечения болезней, связанных с чрезмерно высокими уровнями фактора некроза опухоли,

- применением димера лизоцима для изготовления фармацевтического препарата для профилактики болезней, связанных с чрезмерно высокими уровнями фактора некроза опухоли,

- применением димера лизоцима для изготовления лекарственного средства для управления высвобождением индуцируемым ВИЧ фактора некроза опухоли у бессимптомных носителей и у пациентов, имеющих комплекс болезней, связанных со СПИДом,

- применением димера лизоцима для изготовления фармацевтических составов для лечения СПИДа,

- применением димера лизоцима для изготовления фармацевтического препарата для предотвращения и/или лечения сепсиса и септического шока,

- применением димера лизоцима для изготовления фармацевтического препарата для предотвращения и/или лечения кахексии,

- применением димера лизоцима для изготовления фармацевтического препарата для предотвращения и/или лечения лихорадки,

- введением инъекций, содержащих димер лизоцима в количестве 0,01 - 10 мг/мл, предпочтительно 0,1 - 1,0 мг/мл апиrogenного стерильного состава, включающего физиологически приемлемый растворитель и фармацевтически утвержденный консервант,

- введением внутривенно вышеуказанных инъекций в однократной или многократной дозе 0,02 мг/кг веса тела,

- пропитанные тампоны и антисептическая одежда, а также мази или гели, содержащие эффективные дозы димера лизоцима для предотвращения сепсиса и септического шока и для лечения инфицированных ран,

- вагинальные тампоны, пропитанные эффективной дозой димера лизоцима для применения во время менструации,

В качестве димеризованной формы лизоцима предпочтительно используется изолированный очищенный димер лизоцима. В некоторых случаях возможно применение составов, которые помимо димера лизоцима также содержат небольшие фракции тримера и высших олигомеров фермента.

Инъекции согласно настоящему изобретению могут также применять внутримышечно и подкожно. В некоторых случаях можно также соответствующим образом применять тот же самый жидкий состав (одновременно или независимо) при внутриматочном и интрауддеральном (введении

внутри вымени) или локальным введении - в конечном счете, вместо с другими местными препаратами

Предпочтительные апиrogenные стерильные составы, включающие по крайней мере один физиологически приемлемый растворитель и/или по крайней мере один фармацевтически утвержденный консервант, состоят из апиrogenной стерилизованной воды или водного фосфатного буферного раствора (PBS) в качестве растворителя, а также тиомерсала в качестве утвержденного - консерванта для протеиновых фармацевтических препаратов

Димеризованную форму лизоцима получают в процессе контролируемой полимеризации мономера фермента, сопровождаемой аккуратной очисткой, в частности, при удалении мономерной формы, имеющей упомянутые токсические побочные эффекты, а также тримеров и высших фракций олигомера постреакционной смеси. Для получения димерной формы фермента можно использовать любой известный метод полимеризации. Процесс изготовления, включающий стадии очистки, описан в международном патенте WO 91/10731

Предыдущие предварительные клинические испытания димера лизоцима не обнаружили никаких мутагенных или тератогенных эффектов, либо они были очень слабо выражены. Единственная токсичная доза при оральном/кожном введении (LD50) не поддавалась измерению (> 2000 мг/кг), а при внутривенном введении LD50 составила > 1000 мг/кг

Описываемое здесь новое применение димера лизоцима подтверждено при испытаниях *in vitro*, а также доказало свою эффективность *in vivo* при клиническом применении. Проведены также некоторые сравнительные испытания

Считается, что ингибирующее действие на высвобождение TNF эффективно выявляют благодаря более широкому спектру действия димера лизоцима, а именно - его способности индуцировать высвобождение IFN, а также вызываемое им повышение фагоцитоза. Эти два упомянутых свойства являются важными факторами в естественных защитных механизмах. Соответственно, терапевтическое и профилактическое действие вышеупомянутых новых применений димера лизоцима поддерживается естественными защитными механизмами, а также одновременно усиливается ими

Далее настоящее изобретение объясняют примеры, в которых приводятся ссылки на прилагаемые рисунки, графически иллюстрирующие результаты наиболее важных испытаний

Рис. 1 иллюстрирует подавление высвобождения IFN *in vitro* в культуре лимфоцитов, оптимально стимулируемой ConA в присутствии димера лизоцима при различных разбавлениях

Рис. 2 иллюстрирует уровень IFN в крови новорожденных (определенный экспериментально)

Рис. 3 иллюстрирует уровень IFN в крови новорожденных (определенный экспериментально) при сравнительном испытании терапевтической эффективности лекарственных средств согласно

изобретению

Пример 1

Для определения иммуноактивности димера лизоцима исследовали человеческие периферийные лимфоциты крови с анализом при помощи активируемого флюоресценцией анализатора клеток (FACS)

Митогенная стимуляция периферийных лимфоцитов человека - это хорошо отработанный метод проверки реактивности наиболее важных клеток иммунной системы. Для того, чтобы проверить влияния терапевтических веществ на активацию и пролиферацию лимфоцитов от здоровых доноров крови, в оптимальную дозу добавляют митоген, затем окончательно измеряют количественный ответ лимфоцитов, имеющих иммунореперважные параметры. Результаты сравнивают с контрольным значением, полученным при отсутствии медикаментозного лечения

Для стимуляции лимфоцитов использовали ConA при концентрации 20 мг/мл в среде. Начальная концентрация клеток была 10⁶ клеток/мл. Краткоживущие культуры содержали в инкубаторе с CO₂ в течение одного (рецепторы IL-2 на лимфоцитах и HLA-Dr) или двух дней (для всех других испытаний). Следующие параметры измерений были получены в качестве критериев клеточной активации

- неоптерин (маркер для иммунной активации)
- β-2-микроглобулин (также маркер активации)
- интерлейкин-2 (лимфоцит - Т-хелпер, полученный из аутокринного и паракринного вещества)
- интерлейкин-6 (гормон клеточной дифференцировки) фактор некроза опухоли - TNF (вазоактивный, множественно сильнодействующий интерлейкин)
- интерферон-α (фактор дифференцировки, в частности для В-лимфоцитов)
- тимидинкиназа (фермент, регулируемый в пролиферативных клетках)
- рецептор лимфоцита интерлейкин -2 (акцепторная молекула для аутокринного и паракринного действия IL-2)
- лимфоцит Ki-67 (экспрессия антигена в активированных и пролиферативных клетках)
- лимфоцит HLA-Dr (антиген гистосовместимости класса II, регулируемый в течение иммунной реакции)

Следующие наблюдения были получены в культуре супернатанта в отношении продуктов клетки

Концентрация неоптерина, синтезируемого Т-лимфоцитами в течение иммунного ответа в стимулируемых культурах, в настоящих экспериментах не была заметно повышена выше контрольных значений при применении димера лизоцима в стимулируемых ConA клетках без использования тестируемого димера. При применении повышенной концентрации тестируемого димера значения неоптерина были немного выше

Аналогично, значения β-2-микроглобулина при всех концентрациях димеров лизоцима колебались вокруг контрольного значения

Рецепторы IL-2, взятые с поверхности лимфо-

цита в течение развития культуры и предоставляющие информацию относительно общего оборота рецептора IL-2, находились на сопоставимом уровне с рецепторами IL-2 на поверхности лимфоцита (см. ниже) и оказывали хорошее подавление при самой высокой концентрации тестируемого димера

Интерлейкин-6 проявил четкую тенденцию зависимости дозы от высших значений при более высоких концентрациях. Эта молекула имеет очень важное значение в кроветворении, клеточной дифференцировке и иммунной реакции. При

тестировании первые три значения должны быть экстраполированы, так как самый высокий стандарт составил только 2000 пг/мл

Результаты, касающиеся остальных молекул, приведены ниже в Таблице 1. В

отличие от интерлейкина-6 TNF-α был неожиданно обнаружен в супернатантах культуры в значительно меньших концентрациях за исключением двух последних шагов разбавления, которые оказались неэффективными для подавления концентрации TNF

Таблица 1

Влияние димера лизоцима на лимфоциты периферической крови человека

№	Образец	HLA-DR/	CD3	Рецептор IL-2	Ki-67/CD8 Ki-67/CD4
	контроль	3,3	8,9	6,0	2,7
1	1 мг/мл	2,2	2,6	4,8	5,3
2	0,3 мг/мл	1,9	6,3	4,1	3,0
3	0,1 мг/мл	3,0	6,1	6,5	(8,9)
4	33 мкг/мл	3,0	5,9	6,3	3,0
5	10 мкг/мл	3,4	6,0	7,7	3,7
6	3,3 мкг/мл	2,4	5,0	7,5	3,7
7	1 мкг/мл	2,5	4,9	7,0	4,1
8	0,3 мкг/мл	3,3	5,8	7,5	3,9
9	0,1 мкг/мл	2,8	4,0	7,9	3,8
10	33 нг/мл	3,1	4,6	8,0	4,1

Влияние димера лизоцима на лимфоциты периферической крови человека

№	Образец	TNF	Тимидинкиназа	INF-α
	контроль	205,11	9242	4,97
1	1 мг/мл	38,07	923	8,81
2	0,3 мг/мл	17,19	10914	9,44
3	0,1 мг/мл	13,75	7254	17,96
4	33 мкг/мл	36,11	9525	3,67
5	10 мкг/мл	22,22	5492	7,54
6	3,3 мкг/мл	54,91	5198	6,26
7	1 мкг/мл	18,47	5840	33,91
8	0,3 мкг/мл	14,47	6839	10,07
9	0,1 мкг/мл	94,16	3672	4,97
10	33 нг/мл	172,46	7312	10,07
	1 мг/мл	38,07	923	8,81

Концентрацию тимидинкиназы измеряют в цитоплазме лимфоцитов после замораживания и оттаивания клеточных гранул. Тимидинкиназа отрегулирована в разделяющихся клетках и является хорошим маркером для клеточной пролиферации. Данные из Таблицы 1 показывают снижение самых высоких тестируемых концентраций димера лизоцима, в других разбавлениях не обнаружено какой-либо четкой тенденции. Интерферон-α, в свою очередь, при тех же самых условиях обнаруживает значения, превышающие контрольные значения одного ConA при более высоких концентрациях. Видимое увеличение происходит со Пмроого значения до третьего разбавления.

Маркеры лимфоцитов HLA-DR/CD3, маркер тканевой совместимости, выражен на активированных Т-лимфоцитах в течение иммунной реакции. Полученные результаты, показывают определенный процент активированных Т-клеток в контрольной культуре, причем при различных кон-

центрациях димера лизоцима в культурах значения колеблются вокруг контрольных значений.

Рецепторы IL-2 лимфоцитов интерлейкин-2 является цитокином, синтезируемым лимфоцитами-Т-хелперами после активации при помощи IL-1. IL-2 обладает аутокринным и паракринным действием. Лимфоциты – Т-хелперы не только синтезируют IL-2, но также стимулируются этой молекулой для пролиферации. Рецепторы для IL-2 на поверхности лимфоцитов – Т-хелперов отрегулированы после активации. Таблица 1 показывает, что при самой высокой концентрации димера лизоцима, имеется заметное подавление рецепторов IL-2 на лимфоцитах, в то время, как остальные значения не отличаются больше, чем в пределах ширины биологического спектра. Таблица 1 также содержит данные, относящиеся к Ki-67/CD8 и Ki-67/CD4. Ki-67 – это молекула пролиферации, появляющаяся в клетках, подвергнутых митозу. Ki-67 является важным параметром для

оценки стимулируемых клеток и для диагноза опухоли. В полученных результатах наблюдается небольшое ингибирование клеточной пролиферации в супрессоре Ki-67 клеток (CD8) при двух Пимых высоких дозах димера лизоцима. В лимфоцитах-хелперах (CD4) при самой высокой дозе появляется существенное увеличение процента положительных клеток. При более низких дозах процент клеток с экспрессией Ki-67/CD4 слегка превышает контрольное значение.

Маркировка подавления TNF показана на Рис 1.

Перечисленные выше иммунологические параметры, выбранные в зависимости от их потенциальной важности для иммунного ответа, были проанализированы методом, основанным на измерении влияния тестируемого вещества на оптимально стимулируемые ConA периферические лимфоциты человека, которые устойчивы, чувствительны и дают возможность оценить большое количество различных параметров. При некоторых концентрациях димеров лизоцима имеются заметные различия в результатах испытаний по сравнению со значениями испытаний лимфоцитов, стимулируемых только одним ConA, в то время, как в примере с TNF и IFN- α наблюдаемые эффекты находятся четко в пределах диапазона всех тестируемых разбавлений.

Пример 2

Лабораторные испытания выполняли для определения действия димера лизоцима на фагоцитарную функцию *in vitro* клеток молока и крови. Ранее было установлено, что при стандартном тестировании *in vitro* димер лизоцима не ингибирует пролиферацию микроорганизмов, выделенных из инфицированных молочных желез коров. Поскольку при клиническом применении введение димера лизоцима интрауддериально и одновременно внутривенно эффективно устраняет инфекционные заболевания молочных желез у коров, было очевидно, что главным противобактериальным механизмом в молочных железах коров

ПимеПется фагоцитоз. Соответственно, для определения действия димера лизоцима на фагоцитоз при испытаниях *in vitro* использовали кровь и молоко как здоровых, так и инфицированных коров. Для сравнения эксперименты проводили при той же самой концентрации тестируемого вещества и том же самом времени инкубации, используя клетки, полученные от здоровых и инфицированных коров или даже от инфицированной и здоровой части молочной железы той же самой коровы, чтобы устранить различия индивидуального ответа.

При тестировании крови или молока здоровых и инфицированных коров добавляли как очищенную димерную форму, так и смесь димера и Пимых фракций ПимеПеров, и высших олигомеров лизоцима в концентрациях 25 – 0,25 мкг/мл, затем смесь инкубировали при 37°C в течение 0,5 – 24 часов. Для каждого образца определяли процент фагоцитирующих клеток (индекс фагоцитоза по методу Wisniewski et al) и процент NBT-положительных гранулоцитов (согласно Park).

Димер лизоцима усиливает фагоцитарную активность лейкоцитов при испытаниях *in vitro*. Это воздействие зависит от дозы и времени инкубации. Для активации лейкоцитов молока необходимы более высокие концентрации димера лизоцима, чем для активации лейкоцитов крови. Чрезмерно высокие концентрации димера несколько снижают *in vitro* фагоцитарную активность. Выбранные результаты приведены в Таблицах 2 и 3, в которых термин «димер лизоцима +» используется для обозначения состава, содержащего малую фракцию ПимеПеров и высших олигомеров лизоцима, как указано выше в описании. Результаты главным образом показывают, что, как только реакционная смесь после полимеризации не содержит никаких цитотоксических мономерных форм димера, сопоставимые результаты получают для высокоочищенного и менее чистого Пимеризованного лизоцима.

Таблица 2

Действие димера лизоцима на фагоцитарную активность лейкоцитов молока от здоровых коров (концентрация димера 20 мкг/мл, время инкубации 3 часа)

Индикатор	Лейкоциты молока от здоровых коров		
	Препарат	Корова № 477	Корова № 463
% фагоцитоза	контроль	77,8	80,0
	димер лизоцима +	100	100
	димер лизоцима	92,6	100
индекс фагоцитоза	контроль	2,7	4,1
	димер лизоцима +	4,4	6,4
	димер лизоцима	4,8	8,4
% редукции МВТ	контроль	3,4	2,5
	димер лизоцима +	5,7	3,8
	димер лизоцима	3,4	6,8

Таблица 3

Действие димера лизоцима на фагоцитарную активность лейкоцитов молока от инфицированных коров (концентрация димера 20мкг/мл, время инкубации 30мин)

Индикатор	Лейкоциты молока от инфицированной коровы № 490		
	Препарат	Инфицированная*/ часть	Здоровая часть
% фагоцитоза	контроль	98	58
	димер лизоцима +	98	90
	димер лизоцима	100	100
индекс фагоцитоза	контроль	10,9	2,7
	димер лизоцима +	8,7	14,9
	димер лизоцима	10,9	8,9
% редукции MBT	контроль	4,2	4,2
	димер лизоцима +	5,9	8,4
	димер лизоцима	5,5	7,0

*/ = при воспалении, корова не подвергалась лечению

Ясно, что степень очистки димера лизоцима не оказывает никакого заметного влияния на наблюдаемую фагоцитарную активность лейкоцитов молока. Впоследствии может оказаться, что клетки эффектора могут быть гранулоцитами.

В дальнейших примерах излагаются результаты исследований *in vivo*. Для клинических испытаний использовали состав 2мг димера лизоцима в 10мл раствора PBS. Этот препарат обозначен как KLP-602.

Пример 3

При внутривенном введении KLP-602 стимулировал фагоцитарную активность гранулоцитов крови у здоровых и больных и у здоровых новорожденных жеребят, а также у молочных коров после интрадудерального введения. Это влияние проявляется в увеличении числа нейтрофилов и повышении способности поглощать стафилококки и снижать MBT. Это явление происходит прежде всего в течение первых 12 - 24 часов после инъекции препарата. Эффект KLP-602 на фагоцитарную активность в вымени зависел от дозы и лекарственной формы и реакции отдельного животного.

Димер лизоцима использовали для терапии инфекционных болезней рогатого скота, свиней, лошадей и собак. В различных дозах и в различных интервалах времени препарат вводили внутривенно, внутримышечно, подкожно, интрадудерально и внутриматочно. Медикаментозному лечению подвергли 346 коров, 274 новорожденных, 110 свиноматок и кабанов, 294 поросят, 709 молочных поросят, 35 жеребят и 107 собак. Альтернативное лечение применяли как контрольное. Благодаря природе подопытных животных, ни одно не было оставлено без терапевтического лечения по этическим причинам. Однако выводы можно было сделать при сравнении с клинической картиной лечения болезней, известной из ветеринарной литературы.

Пример 4

При проведении испытаний на детенышах уровень в крови IFN и TNF определяли для группы здоровых и инфицированных животных, причем последних не подвергали лечению в первые 12 часов инфекционного заболевания, затем давали антибиотики и проводили лечение димером лизо-

цима в высокоочищенной форме. Полученные результаты графически иллюстрируются на Рис 2 и 3, показывая соответственно уровни TNF и IFN. На обоих рисунках представлены истинные результаты, наблюдаемые на образцах крови четырех отдельно идентифицированных новорожденных. На обоих рисунках линия 1 представляет собой результаты в крови здорового жеребенка, а линия 2 - результаты инфицированного, но не подвергнутого лечению жеребенка (уровень IFN на 12-ый час, равный 45U/мл, не показан, но диаграмма указывает значение направлением линии 2). Затем животное было подвергнуто известному лечению на 12-ый час, и линия 3 показывает результаты у жеребенка после лечения антибиотиками, линия 4 - результаты у жеребенка после лечения KLP-602.

В группе, которой вводили димер лизоцима, после одной или двух инъекций KLP-602 выздоровели более 90% детенышей, страдающих от гастроэнтерита и более чем 85% детенышей, больных острой бронхопневмонией. Очень характерными были быстрое исчезновение таких симптомов, как пихорадка и понос. Лечение этим лекарственным препаратом не требовало обеспечения животных дополнительными жидкостями. Время и скорость выздоровления превосходили таковые значения у контрольной группы, подвергнутой лечению антибиотиками.

Пример 5

KLP-602 был наиболее эффективен при лечении болезней, поражающих свиней 100% или почти 100% животных выздоравливали от следующих болезней: послеродовая агалактия (синдром MMA), дизентерия, пиометра, грипп и колибактериоз. Применение лекарственного средства в случаях отека и бронхопневмонии дало менее очевидные, но все же значительно лучшие результаты, чем получаемые при альтернативных методах лечения. Наблюдаемое незамедлительное снижение поноса (обычно в течение первых 24 часов) и пихорадки, а также возобновление секреции молока особенно важно в случаях послеродового воспаления вымени и матки, что спасает жизнь поросят. На Таблице 4 показана эффективность терапии KLP-602 по сравнению с альтернативными методами лечения.

Пример 6

100% жеребят, страдающих от энтерита и 83,3% жеребят, больных бронхопневмонией, при лечении KLP-602 выздоравливали быстрее, чем контрольная группа, которой вводили известные препараты

Пример 7

KLP-602 тестировали при лечении некоторых болезней у собак, например, типа фолликулита (эффективность составляла 100%), инфекционных, заболеваний верхних и нижних дыхательных путей и инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта, характерными симптомами которых является понос. В этой группе более всего был распространен парвовирус, который, как из-

вестно, является практически неизлечимой болезнью. Однако и при заболеваниях парвовирусом наблюдали около 75% случаев выздоровления.

При испытаниях на животных, пораженных естественно возникающими болезнями, было сделано несколько важных наблюдений.

1. Терапия является эффективной и очень простой при лечении болезней, имеющих многофакторные этиологию и патогенез (такие болезни распространены в популяциях животных и с ними тяжело справиться особенно в питомниках, где очень легко происходит распространение эпидемических болезней). Такие открытия доказывают модулирующий эффект димера лизоцима на естественные защитные механизмы.

Таблица 4

Лечение животных KLP-602						Лечение животных другими препаратами			
Количество случаев	Длительность (дни)	Число выздоровевших	%	Число не выздоровевших	%	Число случаев	Используемый препарат	Длительность	Выздоровевшие, %
I Кишечная палочка у поросят									
434	1 - 2	421	97	13	3	400х	Антибиотики глюкоза, вит. В	3 - 5	75-80х
II Дизентерия у свиней									
29	1 - 2	29	100	-	-	219	Антибиотики СТОЛМЕД, РИДОМЕД	5 - 9	75
III Послеродовая агалактия									
30	1 - 2	30	100	-	-	40х	Антибиотики кортизон, сульфамид	3 - 5	80х
IV Грипп у поросят									
38	1 - 5	38	100	-	-	200х	Антибиотики (латентные составы)	3 - 9	60-80х
V Одематоз									
62	1 - 3	78	95	4	5	120х	Антибиотики пенициллин, тетрациклин, вит. В, жидкости+глюкоза	3 - 6	60х

х приблизительные данные

2. Терапия является эффективной для болезней, которые при их естественном течении вызывают эндотоксический шок или других нарушения типа длительной лихорадки, сопровождающейся высокой температурой, и оказывают воздействие на состояние животного в течение длительного периода времени после выздоровления, причиняя таким образом большой вред животным, таким, как лошади (жеребята), которых разводят для гонок и других спортивных состязаний, а также, главным образом, для пищевой промышленности, когда издержки производства имеют критическое значение. Быстрое выздоровление позволит существенно сократить затраты на лечение таких болезней.

3. Результаты, наблюдаемые *in vivo*, подтверждают подавление уровней TNF при лечении димерами лизоцима различных возникающих естественным путем инфекционных болезней, и, таким образом, подтверждают заявляемое изобретение.

Пример 8

Исследования действия димера лизоцима на активность антибиотиков против различных мик-

роорганизмов проводили для выбора бактерии для дальнейших испытаний, определения доз антибиотиков, наиболее эффективных для отобранных микроорганизмов, и определения диапазона концентраций димера лизоцима, в пределах которого будут наблюдаться ожидаемые эффекты. В экспериментах использовали две серии лиофилизированного очищенного димера лизоцима - одну, полученную в 1991 и другую - в 1992. В экспериментах применяли антибиотики, доступные на польском рынке, поставляемые польским изготовителем лекарств Polfa, такие, как пенициллин, неомицин, эритромицин, цефалоспорины (SEFRIL).

Тестируемые антибиотики суспендировали в буферном растворе NaCl (PBS-Biomed) или в бычьей сыворотке. К суспензии добавляли димер лизоцима таким образом, чтобы в тестируемых образцах концентрация димера всегда составляла 5мкг/мл. В каждом испытании концентрации тестируемых антибиотиков были различными в зависимости от варьирующей чувствительности используемых микроорганизмов.

Эффективность одного антибиотика или в комбинации с димером лизоцима тестировали в

PBS или в суспензии бычьей сыворотки *in vitro* на *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus uberis*, полученных от больных животных. В экспериментах также использовали лабораторные штаммы *Sarcina lutea* 9341 ATCC и *Staphylococcus aureus* 209 P.

Поскольку испытания носили предварительный характер, каждый антибиотик проверяли в отношении 1, 2 или 3 различных видов бактерии следующим образом.

1 Подготовка чашек Петри

0,05 мл 18-ти часового бульона культуры тестируемой бактерии, добавляли к 14 мл образца обогащенного агара (Biomed). Смесь перемешивали и выливали на чашку Петри диаметром 10 мм. После охлаждения и отверждения агара помещали стерильные цилиндры, которые заполняли растворами тестируемых антибиотиков.

2 Подготовка растворов антибиотиков

10 мг образца тестируемого антибиотика предварительно растворяли в PBS, затем требуемый объем этого раствора добавляли к определенному объему PBS или бычьей сыворотки для получения концентрации антибиотика, наиболее близкой к MIC (минимальная ингибирующая концентрация), каждый раз готовили растворы 3 различных концентраций.

3 Приготовление раствора димера лизоцима

10 мг лиофилизованного димера лизоцима предварительно растворяли в 10 мл PBS. Дальнейшие разбавления готовили либо с PBS, или с бычьей сывороткой и добавляли к растворам антибиотиков, приготовленным ранее как описано выше. Тестировали следующие комбинации:

- антибиотик/PBS
- антибиотик/PBS + димер лизоцима
- антибиотик/сыворотка
- антибиотик/сыворотка + димер лизоцима

В каждом цилиндре концентрация антибиотика была той же самой, концентрация димера лизоцима составляла 5 мг/мл. После заполнения цилиндров растворами чашки Петри сохраняли при комнатной температуре в течение 2 часов, затем культуры инкубировали при 37°C.

4 Получение результатов и оценка активности

Чашки Петри удаляли из нагревателя после 18-часовой инкубации и измеряли диаметр зоны ингибирования роста бактерий (отсутствие колоний) вокруг цилиндров.

Не было обнаружено никакого различия в размерах зон ингибирования роста бактерий вокруг цилиндров, заполненных суспензиями антибиотика в PBS без и с добавкой димера лизоцима концентрацией 5 мг/мл. Размер зоны ингибирования, была меньше вокруг цилиндров, заполненных

суспензией антибиотика в бычьей сыворотке, однако - больше вокруг цилиндров, заполненных антибиотиком + суспензией димера лизоцима в бычьей сыворотке. Зоны были больше, чем наблюдаемые вокруг цилиндров, заполненных суспензиями PBS, а также больше, чем вокруг цилиндров, заполненных суспензиями сывороток только антибиотиков, без добавки димера лизоцима.

Обнаружен феномен при испытаниях с пенициллином, используемым против *Sarcina lutea*. Ампициллин проявил синергизм в комбинации с димером лизоцима при ингибировании *in vitro* роста *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* и *Staphylococcus epidermidis*. Было отмечено увеличение активности эритромицина в присутствии димера лизоцима против *Staphylococcus aureus* 209 P и *Streptococcus uberis*, а также в присутствии SEFRIL - против *Staphylococcus aureus* 209 P, *Escherichia coli* и *Salmonella enteritidis* и были устойчивы к этому антибиотику.

Увеличение противобактериальной активности тестируемых антибиотиков наблюдалось только при использовании бычьей сыворотки в качестве растворителя. Как правило, увеличение составляло в среднем 50%, но в некоторых случаях присутствие димера лизоцима привело к увеличению активности антибиотиков на 100%.

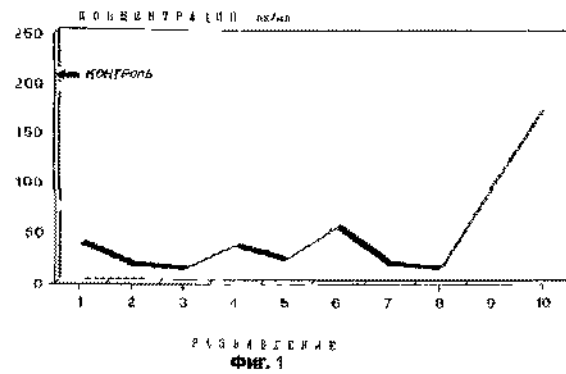
Выводы

Димер лизоцима (без любого консерванта) в концентрациях 5 мг/мл обнаруживает *in vitro* синергизм с некоторыми антибиотиками, используемыми в MIC (минимальных ингибирующих концентрациях) в присутствии бычьей сыворотки при ингибировании роста бактерий. Результаты, полученные в настоящее время, несомненно свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований.

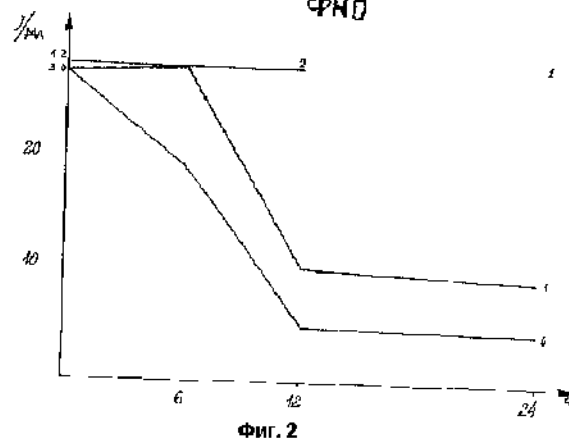
Пример 9. Синергизм с AZT при лечении пациентов, больных СПИДом. Ito, M et al. недавно сообщили, что TNF-α может быть антагонистом активности AZT против ВИЧ (Ito, M et al. "Tumor necrosis factor antagonizes inhibitory effect of azidothymidine on human immunodeficiency virus (HIV) replication *in vitro*", *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 166, 1095 - 1101). Пациенты, больные СПИДом в прогрессирующей стадии, страдают от большого количества случайных инфекционных болезней. Некоторые инфекционные агенты могут стимулировать увеличение TNF, IL-6 и других цитокинов, которые могут либо подавлять иммунитет, либо усиливать репликацию ВИЧ.

Соответственно, лечение только AZT недостаточно эффективно. Для увеличения активности AZT против ВИЧ предложено объединить лечение AZT с введением димера лизоцима в целях ингибирования синтеза TNF-фактора-антагониста активности AZT против ВИЧ.

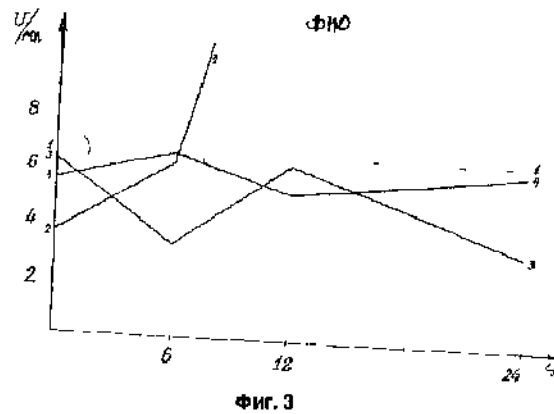
ФНО



ФНО



ФНО



ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)
 вул Сим'ї Хохлових, 15, м Київ, 04119, Україна
 (044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»
 вул Артема, 77, м Київ, 04050, Україна
 (044) 216 – 32 – 71