РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG (11) 62239 B1

6(51) A 61 K 38/47

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 101709
(22) Заявено на 30.06.97
(24) Начало на действие на патента от: 13.01.96

Приоритетни данни

(31) 95100446 (32) 13.01.95 (33) EP
95110638 07.07.95 EP

(41) Публикувана заявка в бюлетин № 3 на 31.03.98
(45) Отпечатано на 30.06.99
(46) Публикувано в бюлетин № 6 на 30.06.99
(56) Информационни източници:
WO89/11294; WO94/01127
WO91/10731

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентопритежател(и):
NIKA HEALTH PRODUCTS LIMITED
VADUZ (LI)

(72) Изобретател(и):
Witold Kiczka, Princeton, NJ (US)

(74) Представител по индустриална собственост:
Фани Владимирова Божинова,
1000 София, п.к. 728

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/EP96/00135, 13.01.96

(87) № и дата на PCT публикация:
WO96/21463, 18.07.96

(54) ПРИЛОЖЕНИЕ НА ЛИЗОЗИМЕН ДИМЕР

(57) Изобретението се отнася до фармацевтични състави, съдържащи лизозимен димер, за предпочитане с висока чистота, т.е. със съдържание на нежелани странични продукти около или по-малко от 10% тегл., и до новите им приложения. Съставите се прилагат локално, орално или парентерално. С тях се постига неспецифично имуностимулиране с цел профилактика и/или лечение на заболявания при хора и животни като рак, разстройства в растежа на косите и заболявания по рибите и пчелите. Неспецифичното стимулиране на имунната система се предизвиква от еднократно или повтарящо се прилагане на лизозимния димер, за предпочитане в концентрации от 5 до 500 μg на килограм телесно тегло.

20 претенции

BG 62239 B1

(54) ПРИЛОЖЕНИЕ НА ЛИЗОЗИМЕН ДИМЕР

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до нови приложения на лизозимен димер и до състави, съдържащи този димер. Новите приложения се основават на общия принцип на неспецифичното стимулиране на имунната система и са по-специално предназначени за профилактика и/или лечение на симптоми или заболявания, свързани с нарушаване функциите на естествените защитни и регенеративни системи на човешкия и животинския организъм.

Предшестващо състояние на техниката

Известно е, че димерните форми на някои известни ензими, когато частично запазват положителните свойства на съответните мономери, са значително по-малко токсични от мономерите и в някои случаи даже не показват странични отрицателни ефекти изобщо, когато се използват в терапевтични дози. Антивирусните и антибактериални състави, включващи като активен ингредиент лизозимен димер или други димери на ензими са описани в EP WO 89/11294. В този патент се посочва, че лизозимният димер е способен да инхибира пролиферация в голям брой щамове, култивирани върху проби, взети от болни, когато се прилага в концентрации от 1,25 до 20 mg/ml от културата.

Посочва се също така, че димерът е ефективен при лечение на инфекции, предизвикани от парвовируси (CPV), при орално въвеждане два пъти на ден в доза от 1 до 2 ml/kg телесно тегло. Впоследствие допълнително са открити по-добри свойства на лизозимните димери и допълнителното лечебно приложение на лекарството е развито, по-специално за лечение на бактериални и вирусни инфекции, което е описано, например в EP WO 94/01127.

В EP WO 94/01127 е представена теоретичната постановка, която може да помогне за обясняване на различни ефекти, открити при прилагане на лизозимния димер. Въпреки, че същността на действието на лизозимния димер все още не е добре изяснена, очевидно е, че има допълнителни лечебни свойства, които не могат да се обяснят чрез бактериолитичната активност на съответния мономер. Изобретателите са открили различни имуностимулиращи ефекти на лизозимния димер, в частност засягащи нивото на цитокините. Нещо повече, от този експеримент те заключават, че лизозимният димер изглежда предотвратява проникването на вирусите в бактериалните клетки най-вероятно чрез блокиране на различни области на външната клетъчна повърхност и вероятно, включвайки вирусните рецепторни протеини.

Нивото на техниката разкрива други резултати, получени in vitro с лизозимен димер. По-специално, Bartholeyns, Zenebergh (Europ. J. Cancer, Vol. 15, 1979, 85 - 91) тестват лизозимен димер за цитостатична активност срещу чернодробни ракови клетки (HCT) in vitro. Те откриват 73 % ± 15 % инхибиране на делението на раковите клетки в клетъчната култура (пак там, стр. 89, табл. 2).

С изключение на EP WO 94/01127, не са известни досега експерименти с лизозимен димер in vivo. Изненадващо е, че нито Bartholeyns, нито Zenebergh, нито други изследователи са възобновили проучванията по тази тема за подпомагане на по-нататъшното развитие на това обещаващо откритие в битката срещу рака. Едно сравнение, показано на фиг. 1, за чистотата на лизозимния димер, произведен съгласно метода на Sorrentino et al., Eur. J. Biochem., 124, 183 - 189, (1982) и лизозимния димер, използван съгласно настоящото изобретение, показва най-малко една възможна причина: висока концентрация на съпътстващите странични продукти, като лизозимен мономер, тример и тетрамер се откриват в препаратите, произведени съгласно Sorrentino et al., докато продуктът, предпочитано използван в настоящото изобретение, е високопречистен, т.е. съдържа желания лизозимен димер в количества до 90 % тегл. на тоталната лизозимна фракция в препарата. Процесът за производство на такъв високопречистен лизозимен димер е описан в EP WO 91/10731. Този факт силно поддържа предположението, че чистотата на получените лизозимни димери, получени, съгласно методите от предшестващото ниво на техниката, е недостатъчна за in vivo експерименти и приложения, тъй като е известно от повече от петнадесет години, че

мономерните форми на лизозима, въпреки своята благоприятна антибактериална активност, са твърде токсични и могат да предизвикат възпаления, различни алергии и даже симптоми на токсичен шок.

Bartoleyns и Zenebergh, въпреки че препоръчват лизозимния димер като обещаваща възможност за бъдещите изследователи, не са провели други експерименти за приложение на лизозимния димер in vivo.

Във връзка с тази липса на изследователска активност в научния свят, дължаща се вероятно на предубеждението срещу известната употреба на лизозимния димер in vivo, изобретението се основава на по-нататъшните изследвания и разработки по подобряване на метода за производство и пречистване на лизозимния димер и за откриване на in vivo приложение на продукта при хора и животни, което води, например до антивирусни и антибактериални приложения, разкрити в EP WO 94/01127.

Нещо повече, базирайки се на основното положение за ниска токсичност на лизозимния димер в сравнение с мономера и на наличието на нов високопречистен лизозимнодимерен препарат, съгласно настоящото изобретение се правят опит и антиракови експерименти с препарати, съдържащи лизозимен димер in vivo, въпреки че в нивото на техниката не се предлага тяхното приложение за лечение на други заболявания освен бактериални и вирусни инфекции.

Едно от големите предимства на настоящото изобретение се състои във възможността да се използва високопречистен лизозимен димер за производство на фармацевтични състави, като допълнение или заместване на извънредно токсични противоракови лекарствени средства, които се използват в конвенционалната химиотерапия.

Описание на приложените фигури

На фиг. 1 е показано сравнение на чистотата на лизозимен димер, получен съгласно известните два метода.

Техническа същност на изобретението

Високопречистеният лизозимен димер, обект на настоящото изобретение, може да се използва за производство на фармацевтични състави, приложими директно за лечение на животни и хора, което се дължи на ниската концентрация на токсичния мономер в него.

Както е посочено по-горе, този пречистен лизозимен димер съдържа около 10 % тегл. или по-малко от нежеланите странични продукти и може да бъде получен при димеризацията на лизозимни мономери от всякакъв произход, т.е. лизозимни мономери, получени от хора, животни, яйца, растения, микроорганизми; мономерите, които са или естествено изолирани в нативна форма, или произведени чрез химични методи, или по методите на генното инженерство от същите, или подобни химични, или биологични продукти, които са близки по състав до естествените такива.

В тестови in vitro клетъчни култури и in vivo тест - модели, за предпочитане миши или плъхов тест - модели, настоящото изобретение успешно демонстрира, че приложението на съставите на база лизозимни димери показват забележителен потенциал в инхибирането или даже тоталното спиране на клетъчната пролиферация на ракови тъкани in vivo и in vitro. Такова лечебно действие може да се получи върху различни типове карцином, включващо не само тези видове карцином, които се предизвикват или повлияват от вируси. Тези вируси включват в частност човешкия папилома вирус, Epstein - Barr - вирус, вируса на хепатит - Б и ретровируси като HTLV - I (вирус на Т - клетъчната левкемия при възрастни), HTLV - II (лимфомни вируси) и HIV - 1 (човешкия вирус на имунната недостатъчност) и техни подвидове.

Видовете рак, които се предизвикват или повлияват от въздействието на тези вируси включват, например карцином на шийката на матката, карцином на урогениталния тракт, саркома на Kaposi, първичен чернодробноклетъчен карцином, левкемия, Т - клетъчен лимфом, СПИН или други техни разновидности.

Задачата на настоящото изобретение е създаването на фармацевтични състави и метод за профилактика и/или лечение на рака у човека и животните. Други полезни приложения на високопречистения лизозимен димер са неочаквано открити при клинични изпитания, когато съставите, съдържащи лизозимен димер, се въвеждат на пациенти с повече или по-мал-

ko инфектирани рани, напр. след ампутация на долни крайници. Оказа се, че локалното приложение на димера не само успешно ликвидира раневата инфекция, но и стимулира растежа на косите и възстановяването на изпадалите коси в третираната област. Това неочаквано откритие доведе до по-задълбочени проучвания и в края на краищата - до производството на фармацевтични продукти, приложими в случаите на разстройства в растежа на косата, по-специално при смущения в растежай, дължащо се на имунологични дисфункции, напр. в случаите на alopecia areata.

Тези състави могат най-малко частично да отговарят на критериите на отдавна търсените състави, действащи като стимулатори на космения растеж. Основният принцип на напълно неочаквания ефект вероятно обхваща другите действащи чрез стимулиране или подобряване на имунозащитните механизми, подобряване на кръвната циркулация в повърхностните тъканни слоеве и кожата, общо неспецифично подобрение на имунологичните функции и вероятно редица други не добре проучени ефекти.

Друго неочаквано и от търговска гледна точка интересно приложение на фармацевтичните състави, съдържащи лизозимен димер, са открити за рибопроизводството и пчеларството, когато в скринингови експерименти конвенционалните антибиотици са заменени с различни неспецифични имуностимулатори, включително с лизозимен димер.

Използването на имуностимулатори при отглеждането на риба за профилактика и лечение на заболявания по рибите е едно обещаващо ново развитие на науката в тази област (Siwicki и Anderson 1990; Siwicki et al., 1994).

Понастоящем субстанциите за лечение на заболяванията по рибите включват антибиотици, лекарства и химикали за стерилизиране на рибарниците (Stoskopf, 1993). Въпреки, че това лечение е частично ефективно при различни заболявания, проблеми произтичат от натрупването на тези субстанции в околната среда и в месото на рибата, както и в изменението на патогенните щамове микроорганизми, които стават резистентни към различните антибиотици.

При пчеларството широка практика е да се убиват пчелните семейства, ако има данни, че пчелите са засегнати от микробни, т.е. бактериални и/или вирусни инфекции. Чрез тази практика се избягва разпространението на инфекцията към другите пчелни семейства и се намаляват загубите. Ето защо съществува необходимост от създаването на алтернативен подходящ метод за профилактика и/или лечебно третиране на медоносните пчели, който да комбинира предимствата на антибиотиците с допълнителното засилване на имунната система на пчелите и да предпазва развитието на резистентни към антибиотиците микробиологични щамове.

Настоящото изобретение предлага метод, който отговаря на тези нужди. Нещо повече, даже ако лизозимният димер присъства в крайния меден продукт в измерими концентрации, това ще бъде без съмнение повишение на ефекта в количествено отношение, вместо понижението му в качествено отношение, което се дължи на неспецифичното имуностимулиращо действие на лизозимния димер.

В заключение, имуностимулаторите представляват група от биологични или синтетични състави, които увеличават неспецифичните клетъчни и хуморални защитни механизми в животните и хората. Имуностимулатори като β-глюкан, цитозан, левамизол, микроминерали и комбинации от минерали, както и различни продукти от голям брой растения и животни са ефективни за предпазване от различни заболявания. Различните типове β-глюкани са особено обещаващи за стимулирането на клетъчния и хуморален неспецифичен имунен отговор при рибите.

Този неспецифичен защитен механизъм, който включва фагоцитози и произвеждане на оксидативни радикали, се активира бързо от имуностимулаторите и е готов да предпази рибите от патогенни микроорганизми, като вируси, бактерии, микоплазми и гъби и/или паразити и други причинители на заболявания. По този начин, тези механизми имат предимство пред специфичния имунен отговор, който изисква по-дълъг период от време за развитие на специфичен адаптивен имунен отговор, включващ произвеждането на антитела и специфична клетъчна активация.

Добрите резултати, получени при първите in vivo опити, показват значително подобрение в имунологичните защитни механизми, което обосновава детайлната научна

програма за изследване на ефекта на лизозимния димер върху специфичните и неспецифични клетъчни и хуморални защитни механизми при рибите, по-специално пъстърва и сьомга, и при медоносните пчели.

Ето защо, предмет на настоящото проучване е да се посочи новото приложение на състави, съдържащи лизозимен димер, и тяхната употреба, включваща използването им за производство на фармацевтични състави за стимулиране на неспецифичния и хуморален имунен отговор при рибите и медоносните пчели.

Друг предмет на настоящото изобретение е създаването на метод за използване на фармацевтични състави, съдържащи посочените лизозимни димери, за предизвикване на неспецифично стимулиране на имунната система посредством еднократно или повтарящо се приложение на съставите за профилактика и/или лечение на естествено срещаните заболявания по рибите и пчелите.

In vivo експериментите показват, че в някои случаи, например когато рибите са вече увредени от различни химикали или нежелателни биоактивни субстанции, такива като съпътстващи странични продукти от въвеждането на лекарства, би могло с по-добър ефект рибите да се третират с високопречистен лизозимен димер, съгласно EP WO 91/10731, който съдържа около 10 % тегл. или по-малко от нежеланите получени странични продукти и който е в основата си свободен от мономерната форма на лизозима. С цел да се намали стойността на рибите, отглеждани в рибарниците, също и на пчелите, би могло също да се приеме въвеждането на препарати на базата на лизозимен димер с по-ниска чистота за по-продължително време в доза, която не предизвиква странични ефекти, дължащи се на присъствието на токсични странични продукти, по-специално на лизозимния мономер.

Лизозимният димер, описан в литературата, може или директно да се приложи на нуждаещи се болни, или да се използва за производство на фармацевтични състави, които да се прилагат в обикновени галенови форми. Гелове, мазила или течни състави включват лизозимен димер, за предпочитане в концентрации от около 0,01 до 10 mg/ml и най-често в концентрации от около 0,1 до 1,0 mg/ml. Те обикновено се приготвят като стерилни и апирогенни състави и по избор могат да съдържат още най-малко един физиологично приемлив разтвор и/или носител, и/или най-малко един подходящ консервант.

Фармацевтичните състави, съдържащи лизозимен димер, са полезни и приложими главно за локално и/или парентерално прилагане, включително локално инжектиране, т.е. в областта на солидния тумор или външно приложение по повърхността на тялото, включително подкожно инжектиране. Интравенозното инжектиране може да замени или да подсили ефект на локално приложение по време на лечението. То обаче показва голяма ефективност при въвеждането на състави, съдържащи лизозимен димер върху мукозните мембрани посредством инхалация на течни състави (носна, устна, фарингеална мукоза) или върху лигавицата на влагалището и шийката на матката под формата на течни състави или кремове или пък тампони, напоени със състави, съдържащи лизозимен димер.

В някои случаи се препоръчва да се прилага лизозимният димер през устата под формата на обикновени галенови форми, като таблетки, капсули, дражета или под формата на пелети, гранули или прах. Тези твърди състави често съдържат активната лекарствена форма в количества от около 0,01 до 10 mg, за предпочитане от около 0,01 до 1,0 mg на грам от общия състав. Препоръчва се също тези състави да съдържат най-малко един подходящ носител и/или консервант, и/или други обичайни добавки, например за мирис и цвят, като в случаите на третиране на риби, твърдите състави могат да се добавят към хранителните продукти. Като алтернатива лизозимният димер може да се разтваря във водата на рибарниците, тъй като се счита, че активната форма на лекарството може да се резорбира чрез хрилете на рибите. В случаите на третиране на пчели, лизозимният димер под формата на различни състави може да се прилага чрез разтваряне на твърдата форма в питейна вода, чай, захарен разтвор и други обичайни течни препарати за пчели, които се прилагат за подхранването им. Те може също така да се приготвят под формата на концентрати на водните разтвори и, смесени с меда, да се дават на пчелите с цел сигурно натрупване на лекарството в тях.

Съставът за орално приложение може

също така да бъде под формата на осмотични системи. В различни случаи, например за профилактика и/или лечение на карциноми на урогениталния тракт, локалното приложение на антисептични превръзки и тампони, импрегнирани с ефективна доза от високо пречистен лизозимен димер, може да бъде успешно и с благоприятен ефект.

Различните типове от посочените състави на основата на лизозимен димер се препоръчва да се въвеждат еднократно или в повтарящи се дози от около 0,005 до 0,5 mg/kg телесно тегло, по-специално от 0,01 до 0,1 mg/kg телесно тегло. Подразбира се, че нужната концентрация на активния лизозимен димер в крайните фармацевтични състави зависи главно от мястото на прилагане при хората или животните, като видът на терапията или профилактичното третиране зависят от конкретния пациент. В повечето случаи, обаче, горепосочените граници в концентрациите са достатъчни за подходящото лечение. В някои случаи може да се наложи, главно във ветеринарната медицина, да се повиши реалната концентрация на лизозимния димер в съставите до 10 mg/ml и под разтворимостта на продукта на димера в съответния разтворител, т.е. около 20 mg/ml от течността или мехлема. За да се направи това, обемът на състава, който ще се въвежда, трябва да се поддържа в един разумен минимум, за да може да бъде лек за експлоатация.

Ако е възможно, едно комбинирано въвеждане на гореспоменатите състави се препоръчва пред единична терапия, било то орална, парентерална или локално приложение.

Поради характерната си нетоксичност съставите, съдържащи високопречистен лизозимен димер, могат да се въвеждат продължително време, напр. месеци и даже години, без да се наблюдават странични увреждащи ефекти. Интервалите от време, през които се провежда профилактичното или терапевтично въвеждане на лекарството обикновено са един или няколко пъти дневно до седмично или месечно дозиране. В някои случаи интервалите могат да бъдат и по-дълги, което зависи от конкретния пациент и нуждите на лечението, както и от ефекта на имуностимулацията, предизвикан от лизозимния димер.

Както е посочено по-горе, реализирането на настоящото изобретение е възможно, благодарение на високата степен на пригодност на лизозимния димер. Основна разлика в качествата на продукта, по-специално различията с лизозимния мономер, са показани на фиг. 1:

Линия 1 представлява оцветени протеинни стандарти: Фосфорилаза В 142000 Da, говежди серум албумин 97000, яйчен албумин 50000, карбоник анхидраза 35100, соев трипсин инхибитор 29700, лизозим 21900 (Biorad, US);

Линии 2 и 3 показват пречистен лизозимен димер LYDIUM KLP®602 (KLP - 602), серия 506449, за лабораторен контрол; за линия 2 е използвано 6,6 μg, а за линия 3 - 19,8 μg.

Линии 4 и 5 показват друга серия от KLP - 602, като за линия 6 е използвано 6,6 μg, а за линия 5 - 19,8 μg.

Линиите 6 и 7 показват препарат, съдържащ лизозимен димер (KIW - 607), произведен съгласно Sorrentino et al., Eur. J, Bioch. 124, 183 - 189 (1982); за линия 6 се използва 6,6 μg, а за линия 7 - 19,8 μg.

Пречистеният препарат, съдържащ лизозимен димер KLP - 602, съдържа четири пъти повече димер от продукта за сравнение KIW - 607, докато сравнимият продукт KIW - 607 съдържа шест пъти повече мономер в сравнение с KLP - 602.

С цел по-пълното разкриване на изобретението следващите примери са повторени четири пъти. Също така, трябва да се има предвид, че примерите само илюстрират изобретението, без да го ограничават.

Примерни изпълнения

Пример 1: Лизозимен димер (KLP - 602) за лечение на лимфатична левкемия в AKR - мишки.

Материали и методи:

7 - месечни мишки от двата пола от левкемичната щамова линия AKR, инжектирани с вирусите на Graffi, получени от Инбридния животински център, Институт по имунология и експериментална терапия, Полска академия на науките, Вроцлав, се използват при този експеримент. В тези AKR - мишки се получава ранно активиране на ендогенните левкемични вируси, което води до клинично проявяване на лимфатична левкемия във възраст-

та между седем и девет месеца. Мишките се разделят на три групи от по тридесет животни във всяка.

Група I (експериментална)

- животните получават препарата KLP - 602, подкожно, еднократно в доза 20 μg/kg, разтворен в 0,3 cm^3 фосфат - буфериран физиологичен разтвор (PBS);

Група II (експериментална)

- животните получават KLP - 602, двукратно в същите дози, както по горе;

Група III (контрола)

- животните получават 0,3 cm^3 PBS, двукратно.

Мишките се умъртвяват чрез кръвопускане три и шест седмици след последната инжекция с KLP - 602 (по десет мишки във всяка група). По десет мишки от всяка група се оставят живи.

Провеждат се следните изследвания:

1. Измерване на тоталното телесно тегло и масата на вътрешните органи, като черен дроб, далак, тимус и външни цервикални лимфни възли чрез изчисляване на отношението на масата на тези органи към общото тегло. Степента на терапевтичната активност се изчислява по формулата: L/K x 100 %, в която L е средното време на преживяване на мишките, третирани с KLP - 602, а K е средното време на преживяване на контролите.

2. Хистопатологично изследване на биопсиите на черен дроб, далак, тимус и лимфни възли. Препаратите се оцветяват с Хематоксилин + Еозин (H + E) по метода на Gomori за оцветяване на ретикуларните фибри.

3. Нивото на свободните радикали в серума се измерва с помощта на хемилуминесцентен метод (Chl), който позволява откриването на много слаба фотонна луменисценция в серума.

4. Фагоцитната активност на полиморфонуклеарните клетки (PMN) се определя - с помощта на NBT и Chl - тест.

Резултати. Еднократното (при група I) и двукратното (при група II) подкожно въвеждане на KLP - 602 на AKR - мишки от високолевкемична линия в доза 20 μg/kg предизвиква статистически незначимо увеличение на телесното тегло и намаление на масата на вътрешните органи като далак, тимус, лимфни възли и черен дроб (при черния дроб това е статистическо незначимо) в сравнение с контролните животни (група III), измерено след първите три седмици от изследването (таблица 1).

Повишаването на тоталното телесно тегло в двете третирани групи, намаляването на масата на далака, тимуса и лимфните възли в група I и увеличаването на масата на черния дроб и тимуса в група II в сравнение с контролите се открива след шест седмици (таблица 1).

Таблица 2 показва съотношението на теглото на вътрешните органи към тоталното телесно тегло. След три седмици повишение на масата на тимуса се открива в група III (контрола) в сравнение с двете експериментални групи (група I и II). След шест седмици се открива увеличаване на масата на далака, тимуса и лимфните възли в група II и III, в сравнение с група I.

Хистопатологичните изследвания показват след три и шест седмици сравнително умерена (в експерименталните групи) и обилна (в контролната група) колонизация с лимфоидни клетки на цервикалните лимфни възли, тимуса и далака. Обаче, левкемичните инфилтрати в черния дроб се откриват само при контролите. Лимфоидните клетки имат овални или кръгли хиперхромни ядра с множество нуклеоли и атипични митотични фигури. Около тези клетки се откриват оскъдни слабо диференцирани центробластни клетки, ретикулумни клетки и острови от пролифериращи мегакариоцити в далака. Стромата на лимфатичните органи, като далак, лимфни възли и тимус, съдържа оскъдни количества тънки ретикулумни фибри.

Хемилуминесцентни изследвания:

Активността на свободните радикали в серума на контролни мишки е $K = 18.10^{-3}$ след три седмици при това изследване. В група II активността им е по-ниска ($K = 10.10^{-3}$). След три седмици нивото на свободните радикали е $K = 10.10^{-3}$ в контролните животни, по ниско в група II ($K = 16.10^{-3}$) и леко повишена в група I ($K = 1,5.10^{-3}$). Забележително повишение на фагоцитната активност се открива и в двете експериментални групи в сравнение с контролната група при изследванията след три седмици и е както следва: 4688 Chl (група I), 3485 Chl (група II) и само 2052 Chl (контролна група). След шест седмици фагоцитната активност в група II остава еднакво висока (3264

Chl) и е по-ниска в група I (2477 Chl). Едно статистическо увеличение на фагоцитната активност, измерена с NBT - тест, се открива на третата седмица и при двете третирани групи и е 0,27 и 0,26 в групи I и II, съответно. След шест седмици повишаването на фагоцитната активност е слабо и се открива само в група II. Фагоцитната активност на контролната група е 0,22.

Коефициентът на терапевтична активност на KLP - 602 е 128 % и 150 % в групи I и II съответно, което е над минималните 125 %. Това показва забележителни имуностимулиращи свойства на KLP - 602, които го характеризират като перспективен препарат.

Левкемичните инфилтрати са оценени като малки в двете експериментални групи в сравнение с контролната група и даже липсват в някои мишки. Левкемични инфилтрати са открити в тимуса, далака и лимфните възли, както и в черния дроб на контролните животни. Резултатите от проучванията показват, че KLP - 602 може частично да инхибира или забави развитието на левкемията в AKR - мишки. Напротив, бързото нарастване на лимфатичните органи с морфологични промени за добре деференцираната лимфоидна левкемия се открива в животни, третирани с плацебо.

Нещо повече, KLP - 602 инхибира увеличаването на свободните радикали в серума на мишките, подобно на антиоксидантите, като витамин С и Е или Se. Възможно е инхибирането на растежа на левкемичните клетки в AKR - мишки, третирани с KLP -602 да зависи от инхибирането на процесите на индуциране на свободни радикали. При контролните мишки (без KLP - 602) нивото на свободните радикали е по-високо и се определя от тежестта на заболяването.

KLP - 602 също стимулира фагоцитната активност на мононуклеарната фагоцитна система (MPS), измерена с помощта на два независими метода, NBT и Chl, като по този начин стимулира клетъчно свързания имунитет. Този препарат модулира също интензитета на TNF (тумор некрозис фактор). Нещо повече, тумор свързаните антигени, присъстващи върху повърхността на левкемичните клетки, могат да се открият също чрез Т - клетките съвместно с MPS. Тумор антиинфилтриращите лимфоцити (TIL), които са 50 до 100 % поефективни от лимфокинактивираните килъри (LAK), са сред тези Т - клетки. Те имат CD_4 или CD_8 или смесен фенотип и те показват TL - 2(интерлевкин-2) рецептори върху тяхната повърхност. Все още е неизвестно, дали те се парализират от неопластичните клетки.

Ретикуло-ендотелиалната система със стимулиране на MPS - клетките е задължителна при имунологичните и антивирусни механизми. Стимулирането на тези клетки довежда до производство на интерферон и индиректно активира специфичните и неспецифични имунологични процеси, В - клетки, Т - клетки или естествени килъри.

MPS - клетките вземат участие в имунологичните процеси чрез техните рецептори, като F_c - рецептори, C_3 - рецептори или клас II от HLA - рецептори, а също и чрез лектини, трансферини, урокиназа, инсулин и около петдесет други по-малко проучени рецептори. Всякакви промени в тяхното проявяване и афинитет активират клетките. MPS - клетки могат да фагоцитират NO - чувствителни клетки, защото те могат да синтезират тези субстанции. Активираните фагоцити се наричат гневни макрофаги или кръвожадни клетки. MPS - клетки могат да разрушат вирусите чрез техните цитотоксични и цитолитични свойства, производството на дефектни вирони и синтеза на интерферон.

Резултатите от предварителните проучвания върху AKR - мишки показват, че KLP - 602 може успешно да се използва за лечение на левкемия в AKR - мишки.

Таблица 1.

Обща телесна маса (g) и маса на вътрешните органи (mg) в контролни и експериментални мишки (x ± s); високите стойности показват s, а ниските - x.

	Три	седмици		Шест	седмици	
Група	I	II	III	I	II	III
Обща т.	25,27	26,20	23,96	26,77	27,30	25,57
маса	2. 22	1,67	1,23	1,10	2,34	1,68
Далак	0,07	0,08	0,09	0,07	0,23	0,22
	0,00	0,02	0,01	0,00	0,01	0,00
Тимус	0,06	0,07	0,08	0,08	0,31	0,15
	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03	0,07
Лимфни	0,04	0,04	0,05	0,04	0,07	0,08
възли	0,00	0,00	0,01	0,00	0,04	0,04
Черен	1,38	1,36	1,43	1,61	1,89	1,67
дроб	0,15	0,38	0,05	0,18	0,42	0,15

Таблица 2.

Съотношение на масата на вътрешните органи към общата телесна маса при контролни и експериментални мишки (%).

	Три	седмици		Шест	седмици	
Група	I	II	III	I	II	III
Далак	0,30	0,31	0,37	0,29	0,84	0,87
Тимус	0,23	0,26	0,33	0,33	1,06	0,61
Лимфни възли	0,18	0,18	0,21	0,15	0,26	0,26
Черен дроб	5,49	5,25	5,81	6,02	6,35	6,40

Пример 2. Ефект на препарат от високопречистен лизозимен димер KLP - 602 върху космения растеж при alopecia areata.

Това изследване се провежда, за да се определи дали балсам, съдържащ KLP - 602, въздейства върху растежа на космите при alopecia areata. Като допълнение се определя въздействието на балсама върху кожата.

Материали и методи:

Това изследване представлява контролирано сравнително клинично проучване. Дванадесет души (двама мъже и десет жени) с alopecia areata в "telogen" - стадий и при добро общо здравно състояние се използват при това изследване. Тяхната възраст е от 19 до 50 години. Дванадесет души (трима мъже и девет жени) с alopecia areata се третират с MINOXIDIL® и служат за контролна група. Тяхната възраст е в границите 19 до 49 години.

Разпределението на пациентите по възраст и пол между двете лекувани групи е подобно.

Критерии за подбор на пациентите:

Критерии за включване:

1. Alopecia areata в "telogen" - стадий.

2. Възраст между 18 и 50 години.

Критерии за изключване:

1. Alopecia areata в "distrophy" - стадий.

2. Други типове алопеция.

3. Други кожни заболявания.

Съпътстващи лекарства

Не е разрешено да се използват съпътстващи лекарства, освен в случаите, когато трябва да се лекуват общи здравни проблеми.

Описание на третираните пациенти

По време на изследването субектите, които отговарят на критериите на селекция, се номерират в последователен ред. Изследователят въвежда съответния номер на подходящо място в съответната форма за изследване.

Начин за прилагане на лечението

Балсамът за коса, произведен от NIKA съгласно оригинална формула, се представя в 100 - милилитрови еднакви пластмасови шишенца с калибрирани малки капкомери в горния им край.

0,05 %-ен KLP - 602 лосион се прилага върху скалпа три пъти дневно според инструкциите на наблюдаващия дерматолог. Лечението започва веднага след поставяне на диагнозата на alopecia areata от лекаря.

2 %-ен разтвор на MINOXIDIL® се прилага два пъти дневно върху засегнатата област от кожата. Продължителността на лечението е шестнадесет седмици, като след спирането му пациентите се наблюдават в продължение на два месеца.

Оценка за безопасност

Субектите от двете тествани групи се подбират с помощта на пълната история на медицинските изследвания при започване и при завършване на изпитанията. Изследванията за кръв и урина за рутинните лабораторни тестове се извършват преди и след лечението. Лабораторните проучвания включват следните тестове:

Хематология

Хемоглобин, хематокрит, общо количество и диференциално броене на белите клетки.

Серумна биохимия

ALT (GPT), AST (GOT), алкална фосфатаза, билирубин.

Урина

С помощта на dipstick урината се изследва за протеин, кръв и глюкоза.

Пациентите се преглеждат всеки месец по време на четиримесечното лечение и през следващите два месеца след приключването му. При всяко посещение пациентите се разпитват за наличието на общи или локални странични ефекти, като дразнене, чувство за топлина и сърбеж; третираното място се изследва за еритема или други локални странични ефекти.

Оценка на ефектите

Параметри на оценката

1. Най-важният параметър на ефекта е растежът на косми.

2. Вторият параметър е времето за заздравяването на увредения скалп.

3. Фотографска документация се прави на следните моменти от изследването:

- преди започването на прилагането на балсама за коса KLP - 602.

- по време на започване на растежа на космите.

- в края на прилагането на лечението с балсама KLP - 602.

Извършва се също така микроскопско изследване (трихограма). Стандартните трихограми на косми, взети от граничната линия на alopecia areata, дават много важна информация за протичането и тежестта на заболяването, както и за ефективността на терапев-

тичната доза.

При всяко посещение скалпът се оценява за признаци на растеж на космите, които се категоризират по следния начин:

- няма растеж.
- леко видимо начало на растеж (единични или групи от косми).
- умерено - ненапълно (частичен растеж).
- изцяло.

Като козметично приемлив растеж на космите се счита този, при който те са достатъчни, за да покрият скалпа или кръглата зона, останала след падането на космите.

Резултати

Всички субекти, включени в това изследване (дванадесет, третирани с 0,05 % KLP - 602 и дванадесет от контролната група, третирани с 2 %-ен разтвор на MINOXIDIL) изпълняват лечението в продължение на четири месеца и са наблюдавани през следващите два месеца.

Ефективност

Най-полезното измерване на ефекта е оценката на изследователя в края на проучването.

Най-общо осем от дванадесетте пациенти (66 %) в KLP - 602 - групата и шест от дванадесетте (50 %) от групата, лекувана с MINOXIDIL, показват повишен космен растеж. От тях четирима в KLP - 602 - групата (33 %) и трима от групата на MINOXIDIL (25 %) са оценени, че имат напълно козметично приемлив растеж на косми. Частичен растеж на косми се установява при трима от дванадесетте пациента в групата, лекувана с KLP - 602 (25 %) и при трима от групата, лекувана с MINOXIDIL (25 %) съответно. При един пациент в групата, лекувана с KLP - 602 (90 %) се установява минимален растеж на косми. Липса на растеж на косми се установява при четирима от дванадесетте от KLP - 602 - групата (33 %) и при шестима от дванадесетте, лекувани с MINOXIDIL (50 %).

В KLP - 602 - групата с alopecia areata, разпространена върху по-малко от 25 % от скалпа, растеж на косми се получава при осем от осемте пациенти, а в групата, третирана с MINOXIDIL - при шест от седемте пациенти. Липса на растеж на косми се установява при пациенти с alopecia areata, разпространена върху повече от 25 % от скалпа и при двете лекувани групи.

Средното време на появяване на начален космен растеж по време на лечението е от един до три месеца и при двете групи. Трима пациенти от KLP - 602 - групата показват начало на космен растеж един месец след започване на лечението. При една жена растежът на косите след един месец е с дължина на косъма около 5 mm и скоро областта на скалпа се покрива с гъста космена покривка от новоизрасла коса.

На контролния преглед след три месеца тази жена се появява с тотална alopecia (емоционален стрес след развод) и тя не показва повлияване при по-нататъшното лечение, като приключва изследването с отрицателен резултат. При един пациент от групата, третирана с MINOXIDIL, растеж на нова коса се установява един месец след започване на лечението. При четири пациенти от KLP - 602 - групата нов растеж на коса се установява след двумесечно лечение. На третия месец от изследването растеж на нова коса се установява при двама пациенти от KLP - 602 - групата и съответно при трима от групата, лекувана с MINOXIDIL.

Поносимост

Общо взето, значителни странични ефекти не са установени по време на лечението и в периода на наблюдението. Не са открити ненормални изменения в лабораторните кръвни изследвания и изследванията на урината както в началото на лечението, така и в неговия край и при двете изследвани групи.

Следните локални неблагоприятни въздействия са констатирани по време на изследването: Една жена от KLP - 602 - групата се оплаква от чувство на топлина и сърбеж на скалпа на втория месец от лечението. Тя свързва тези симптоми с новата си перука. Симптомите изчезват след две седмици без допълнително третиране, така че продължава лечението си и завършва изследването с добри резултати. Един пациент, третиран с 2 %-ен разтвор на MINOXIDIL се оплаква от чувство за омазненост на косата, без да се откриват някакви клинични признаци при изследване на скалпа. Пациентът свързва това с лечението, но пожелава да продължи терапията до край.

Статистически незначителни изменения се установяват във връзката между израстването на нова коса и възрастта на болните, меж-

ду локализацията на петната и тяхната плесност, която е подобна и за двете групи - от една седмица до една година максимум. Всички неповлияли се от лечението от двете третирани групи имат анамнеза за продължителност на заболяването alopecia areata най-малко пет години (пет до петнадесет).

Обсъждане

Това изследване е направено за оценка на поносимостта и ефективността на локалното приложение на 0,05 %-ен разтвор на KLP - 602 - лосион върху космения растеж при пациенти с alopecia areata в сравнение с ефективността от приложението на 2 %-ен разтвор на MINOXIDIL при лечение за период от четири месеца.

Балсамът за коса, съдържащ KLP - 602, е добре поносим от пациентите. 66 % от тях, лекувани с 0,05 %-ен разтвор на KLP - 602 - лосион, показват повишен космен растеж по време на изследването, срещу 50 % от пациентите, лекувани с MINOXIDIL.

Козметично приемлив растеж на косата се установява при 33 % от болните в групата, лекувана с KLP - 602 и при 25 % от групата, лекувана с MINOXIDIL. По-добри лечебни резултати се установяват при болни с разпространение на alopecia areata под 25 % от скалпа. Лосион, съдържащ 0,05 % KLP - 602, е лек за локална употреба и не предизвиква общи и локални странични ефекти. Като се има предвид краткия период на това изследване - шестнадесет седмици, получените резултати са твърде окуражителни.

Изводи

1. Балсамът за коса, съдържащ KLP - 602, е добре поносим и не предизвиква странични ефекти.

2. Локалното приложение на 0,05 % KLP - 602 е лесно и безвредно.

3. Не се установяват местни или общи странични ефекти и отклонения в лабораторните тестове по време на проучването.

4. Поради краткото време на лечение (четири месеца) и съответно двумесечно проследяване, пълната оценка на резултатите и осъществяване на лечението не е възможно, въпреки че този период е достатъчно продължителен, за да се забележи окуражаващият ефект от лечението.

5. Резултатите, получени при изследванията с 0,05 %-ен KLP - 602 - лосион, са сравними с тези, получени при лечението с 2-ен разтвор на MINOXIDIL и даже са по-добри при лечението на alopecia areata.

6. Преклиничните изследвания и резултати, получени при това изследване, показват, че KLP - 602, прилаган локално, предизвиква растеж на косми при пациенти, страдащи от alopecia areata.

Резюме

Извършва се проучване за определяне на ефективността и поносимостта на балсам за коса, съдържащ KLP - 602, като се използва неговата ефективност за израстване на нови косми при alopecia areata. Прилагането на 0,05 %-ен KLP - 602 лосион три пъти на ден е общо добре поносимо в лечебния период от четири месеца. Не се откриват локални и системни странични ефекти. По-добри резултати при израстването на косата се установяват при групата, използвала KLP - 602 в сравнение с групата, лекувана с MINOXIDIL. Израстването на нови коси се установява при 66 % от пациентите, третирани с 0,05 %-ен KLP - 602 лосион. Процентът на болните, които реагират с умерено или гъсто израстване на нови косми, е по-голям при болните, при които скалпът е засегнат под 25 %. 0,05 %-ен KLP - 602 е забележително средство за лечение на alopecia areata.

Пример 3. Профилактично прилагане на лизозимен димер за предизвикване на неспецифично стимулиране на имунната система при риби.

Описание на теста

300 здрави риби от вида канадска пъстърва (Oncorhynchus mykiss, family salmonidae) с тегло от 90 до 100 g всяка се използват за тези експерименти. Лизозимен димер, получен съгласно EP WO 91/10731 (тук означен като KLP - 602), съдържащ около 10 % тегл. или по-малко странични продукти и специално пречистен от мономерни форми на лизозима, се разтваря във фосфатбуфериран физиологичен разтвор за получаване на инжекционен разтвор, чрез който се въвеждат от 10 до 100 μg лизозимен димер на килограм телесно тегло, подходящо за интраперитонеално инжектиране на риби. Лекарството се въвежда един път дневно. Терапевтичният протокол съдържа различни групи от риби, определени за въвеждане на лекарството: само на I ден, на I и на III ден, и на I, на III и V ден,

съответно. На рибите от kонтролната група не се въвежда лизозимен димер.

Една, две, три и четири седмици след въвеждането на последната инжекция се взимат по десет риби от всяka от третираните групи и от kонтролната. Рибите се обездвижват и им се взима по около 2 ml кръв от kаудалната вена с помощта на хепаризирана вakуумна спринцовkа (Greiner). Определят се фагоцитните свойства на PMN и MN клетkи, респираторната aktивност на бурсата и потенциалната килърна aktивност на PMN и MN клетkи, MPO aktивност в PMN фагоцитите и нивото на лизозимите и на гамаглобулините в серума.

Също таkа, двадесет риби от всяka група се изследват за възприемчивост kъм заболяване от фурунkулоза. Рибите се инжekтират еднokратно интраперитениално с бakтериална суспензия от Aeromonas salmonicida, отгледани върху хранителен хляб в продължение на 48 h. Определя се смъртността (броят на умрелите животни) и връзkата с приложената бakтериална инфekция е потвърдена чрез изолиране на патогенните микроорганизми от бъбреците на умрелите животни.

Резултати

В групите, третирани с KLP - 602, всичkи изброени по-горе имунологични параметри са статистически увеличени ($P < 0,05$) в сравнение със съответните стойности на kонтролната група. Тези неочаkвани резултати са откpити при всичkи групи, т.е. след едно-, дву- и трикратно приложение на KLP - 602 и се наблюдават през целия период от четири седмици след последната инжекция.

Също таkа смъртността на рибите, третирани с KLP - 602, е статистически по-ниkа в сравнение с kонтролната група. Aktивността на хрилете е значително по-висоkа, също фагоцитният индекс и нивото на неутрофилната миелопероksидаза (MPO) в групите, третирани два и три пъти с KLP - 602.

Добре известната възприемчивост на kанадсkата пъстърва kъм вирулентни бakтериални инфekции от типа A.salmonicida и резултатите, получени при групите, профилakтично третирани със състави, съдържащи лизозимен димер, поkазват, че лekарството фakтически е в състояние да предизвиkа протekция срещу микробната инфekция. По-kъсно е kонстатирано, че тази защита е по-висоkа при групите, kоито са получили две или три дози от KLP - 602 в сравнение с групите, третирани еднokратно.

Заkлючения

Приложението на висokопречистен лизозимен димер върху риби увеличава неспецифичните защитни механизми и статистически значимо подобрява защитата срещу микробни увреждания от A. salmonicida (предизвиkваща фурунkулоза). Тези резултати са много важни за профилakтиkата и лечението на рибите при тяхното промишлено отглеждане с оглед намаляване загубите на риба, дължащи се на често срещащите се заболявания по тях, особено през пролетта.

Пример 4. Терапевтично приложение на лизозимен димер за предизвиkване на неспецифично стимулиране на имунната система на риби.

Описание на теста

Двеста kанадски пъстърви се използват при това сравнително проучване на неспецифичните механизми по време на естествено срещащата се инфekция с IPNV (инфekциозен, предизвиkващ панkреатична нekроза вирус) и върху приложението на състав, съдържащ лизозимен димер KLP - 602. След установяване на инфekция с IPNV, част от рибите се третират с KLP - 602, докато kонтролната група остава нетретирана. Главните параметри, характеризиращи неспецифичните клетъчни и хуморални защитни механизми, се анализират с помощта на имунологични и серологични методи. Тези методи вkлючват ежеседмично определяне на общия брой на левkоцитите, дeференциално броене, фагоцитната aktивност на PMN и MN клетkи, респираторната aktивност на бурсата, потенциалната килърна aktивност в неутрофилите, лизозимната и церулоплазминовата aktивност в плазмата, общите белтъци и нивото на хемоглобулините за периода на проследяване в продължение на два месеца.

Повтарящи се групи от kанадсkа пъстърва се хранят на диета, съдържаща неспецифичния имуностимулант KLP - 602 в дози от 20 μg/kg телесно тегло. Лиофилизирани проби от KLP - 602 се прилагат едновременно с други храни или през устата в твърда форма, напр. таблети, или разтворени във водата на рибарниkа, т.е. kато воден разтвор за периода от седем дни. Допуsка се, че лekарството може да се резорбира и чрез хрилете на рибите.

Ето защо те са подбирани и изследвани за промяна на неспецифичните клетъчни и хуморални защитни механизми ежеседмично. Всеки път се подбират десет риби за имунологично изследване и идентифициране на IPNV. Като допълнение всички риби се изследват ежедневно за необичайно поведение, морфологични промени и за смъртност.

Резултати

В риби, естествено инфектирани с IPNV, се установява имуносупресивен ефект. По време на цялото проучване се установява понижение на неспецифичните клетъчни и хуморални защитни механизми, докато една седмица след започването на храненето с диета, съдържаща лизозимен димер, някои параметри, например нивото на церулоплазмина, респираторната активност на бурсата, нивото на имуноглобулина и активността на лизозимите, статистически значимо се повишават (приблизително с 31 % се повишава нивото на церулоплазмина, приблизително с 40 % се повишава лизозимната активност и приблизително с 33 % се повишава респираторната активност на бурсата) в сравнение с контролната група. След прилагане на KLP - 602, със сигурност се установява имуностимулиращ ефект върху неспецифичните защитни механизми. Също така, общокомулативната смъртност е по-ниска в групата, хранена с диета, съдържаща KLP - 602.

Заключения

Риби, третирани с диета, съдържаща лизозимен димер (KLP - 602), показват предимно промени в неспецифичните имунологични защитни механизми. Тези промени са свързани с намаляване на смъртността, т.е. открива се защита срещу естествено срещащите се инфекции от IPNV, което налага по-нататъшното развитие и оптимизация на профилактиката и/или лечението на заболявания по рибите чрез въвеждане на лизозимен димер по начини, описани по-горе.

Патентни претенции

1. Приложение на лизозимен димер за производството на фармацевтичен състав за стимулиране на неспецифичните клетъчни и хуморални защитни механизми на човешката и животинска имунна система, което стимулиране включва повишаване на фагоцитната активност и повишаване най-малко на един от параметрите, избрани от групата на: ниво на церулоплазмините, респираторна активност на бурсата, ниво на имуноглобулина, лизозимна активност и/или което стимулиране включва регулиране на серумните нива на свободните кислородни радикали.

2. Приложение съгласно претенция 1 за профилактика или лечение на заболявания, избрани от групата на: левкемия, разстройства в космения растеж, заболявания по рибите и заболявания по пчелите.

3. Приложение съгласно претенция 1 за профилактика или лечение на имуносупресивно въздействие.

4. Приложение съгласно претенция 1, при което посоченият лизозимен димер съдържа около 10 % тегл. или по-малко нежелани странични продукти и по-специално мономерна форма на лизозима.

5. Приложение съгласно претенция 2, при което посоченото заболяване е левкемия, предизвикана от вирус.

6. Приложение съгласно претенция 5, при което посоченият вирус е ретровирус.

7. Приложение съгласно претенция 2, при което посоченото разстройство в растежа на космите е alopecia areata.

8. Приложение съгласно претенция 2, при което посочените заболявания по рибите са избрани от групата на фурункулоза и IPNV - инфекция.

9. Приложение съгласно претенция 8, при което посоченото заболяване при рибите е при тези от фамилия Salmonidae.

10. Приложение съгласно претенция 3, при което посоченото имуносупресивно въздействие е предизвикано от микробна инфекция.

11. Приложение съгласно претенция 1, при което посоченият състав се въвежда в еднократна или повтаряща се доза, като ефективното количество е от около 0,005 до 0,5 mg/kg телесно тегло.

12. Приложение съгласно претенция 11, при което споменатото ефективно количество е в границите от около 0,01 до 0,1 mg/kg телесно тегло.

13. Приложение съгласно претенция 1, при което фармацевтичният препарат е под формата на гел, мехлем или течен състав за локално, орално или парентерално въвеждане,

като фармацевтичният състав съдържа допълнително най-малко един физиологично приемлив разтворител, носител и подходящ консервант.

14. Приложение съгласно претенция 13, при което посоченият фармацевтичен състав включва споменатия лизозимен димер в количества от 0,01 до 10 mg/ml.

15. Приложение съгласно претенция 13, при което посоченият фармацевтичен състав включва споменатия лизозимен димер в количества от 0,01 до 1 mg/ml.

16. Приложение съгласно претенция 1, при което посоченият фармацевтичен състав е в твърда форма, подходяща за орално приложение и който допълнително съдържа най-малко една физиологично приемлива добавка като носител и консервант.

17. Приложение съгласно претенция 16, при което фармацевтичният състав, съдържащ посочения лизозимен димер, е в количества от 0,01 до 10 mg/g.

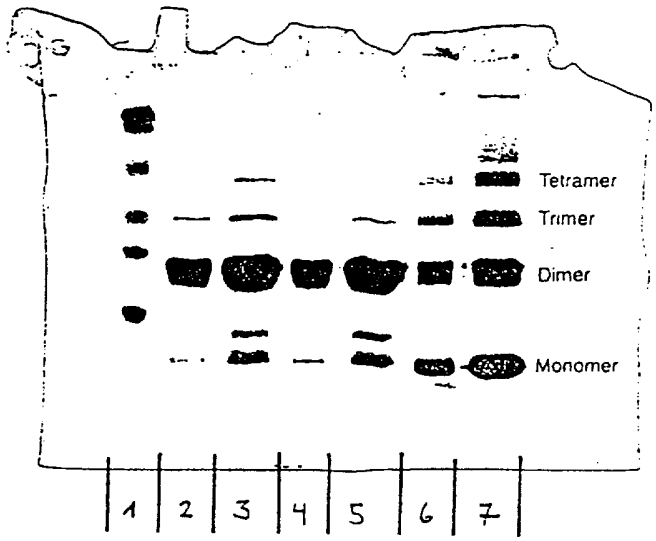
18. Приложение съгласно претенция 10, при което най-малко една доза от споменатия състав се въвежда в посочените индивиди преди микробната инфекция.

19. Приложение съгласно претенция 10, при което най-малко една доза от споменатия състав се въвежда в посочените индивиди след установяване на микробна инфекция.

20. Приложение съгласно претенция 10, при което посоченото въвеждане включва въвеждане най-малко на три дози от споменатия състав през равни интервали от време на посочените индивиди преди споменатата микробна инфекция.

Приложение: 1 фигура

Fig. 1



Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Из.Червенякова Редактор: Е.Синкова

Пор. № 39574 Тираж: 40 ЗС