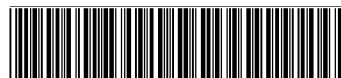




(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator
dokumenta:

HR P960014 A2

HR P960014 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) MKP⁶: **A 61 K 38/47**

(21) Broj prijave: P960014A

(22) Datum podnošenja prijave patenta: 12.01.1996.

(43) Datum objave prijave patenta: 31.12.1997.

(31) Broj prve prijave: 95100446.4 (32) Datum podnošenja prve prijave: 13.01.1995. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: EP
95110638.4 07.07.1995. EP

(62) Broj i datum prvobitne prijave u slučaju podjele patenta:

(71) Podnositelj prijave:

Nika Health Products Limited, Staedtle 36, 9490 Vaduz, LI
Witold Kiczka, 8 Lawrenceville Road, Princeton, 08540 NJ, US
Hraste & Partneri odvjetničko društvo, Zagreb, HR

(72) Izumitelj:

(74) Zastupnik:

(54) Naziv izuma: **NOVE PRIMJENE LIZOZIMSKOG DIMERA**

(57) Sažetak: Prikazani se izum odnosi na farmaceutske preparate koji sadrže jedan lizozimski dimer, preporučljivo velike čistoće, tj. sa oko 10% mas. ili manje neželjenih nusproizvoda, i na nove primjene istog. Te primjene obuhvaćaju lokalno, oralno i parenteralno davanje spomenutih preparata za nespecifičnu imunostimulaciju kao mjeru za sprečavanje i/ili liječenje humanih i životinjskih oboljenja koja obuhvaćaju rak, poremećaje rasta kose, oboljenja riba i oboljenja pčela. Nespecifično stimuliranje imunološkog sustava izaziva se jednom jedinom ili ponovljenom primjenom preparata lizozimskog dimera, preporučljivo u koncentraciji od 5 do 500 µg tjelesne mase.

HR P960014 A2

Prikazani izum se odnosi na nove primjene lizozimskog dimera i na preparate koji sadrže takav dimer. Nove primjene se zasnivaju na općem načelu nespecifičnog stimuliranja imunološkog sustava i posebno su korisne za sprečavanje i/ili liječenje simptoma ili oboljenja u vezi sa umanjenom funkcijom prirodnog obrambenog i regenerativnog sustava u tijelu čovjeka i životinje.

Krajem osamdesetih otkriveno je da su dimerizirani oblici izvjesnih enzima, premda u suštini zadržavaju korisna svojstva odgovarajućih monomera, daleko manje toksični nego monomeri a u nekim slučajevima čak ne očituju nikakva negativna sporedna djelovanja kada se uzimaju u terapijskim dozama. Protuvirusni i protubakterijski preparati koji sadrže kao aktivni sastojak lizozimski dimer ili druge dimerizirane enzime, opisani su u WO 89/11294. Tu je objavljeno da lizozimski dimer može inhibirati naglo razmnožavanje jednog broja bakterijskih vrsta kultiviranih na uzorcima uzetim od pacijenata, kada se primjenjuje u koncentracijama od 1,25 - 20 mg/ml kulture. Također je objavljeno da dimer može liječiti infekcije izazvane psećim parvovirusom (CPV) kada se daje oralno dva puta dnevno u dozi od 1 - 2 mg/kg tjelesne mase. Kasnije su utvrđena druga pogodna svojstva lizozimskih dimera i razvijene su dodatne terapijske primjene lijeka, naročito za liječenje bakterijskih i virusnih infekcija, kako je prikazano u, na primjer, WO 94/01127.

U WO 94/01127 prikazana je pretpostavljena teorija koja može pomoći da se shvate različita djelovanja zapažena kod lizozimskog dimera. Premda cjelokupan način rada lizozimskog dimera još nije u potpunosti shvaćen, čini se da postoji jedna dodatna sposobnost liječenja koja se ne može objasniti bakterioličkim djelovanjem odgovarajućeg monomera. Izumitelji su zapazili izvjesno imuno-stimulativno djelovanje dimeriziranog lizozima, koje se posebno odnosi na moduliranje razine citokina. Pored toga, na osnovu eksperimenata je zaključeno da lizozimski dimer, izgleda, sprečava prodor virusa u bakterijske stanice, pretpostavlja se blokiranjem izvjesnih područja vanjske površine stanice koja vjerojatno sadrži proteine virusnih receptora.

U poznatom stanju tehnike prikazani su rezultati ostvareni in vitro sa lizozimskim dimerom. Posebno su Bartholeyns i Zenebergh (Europ. J. Cancer, Vol. 15, 1979, 86-91) ispitivali dimeriziran lizozim u pogledu citostatičkog djelovanja na stanice raka jetre (HCT) in vitro. Zapazili su $73\% \pm 15\%$ inhibiciju razmnožavanja stanica raka u kulturi stanica (isto, str. 89, tablica 2).

Neočekivano je da, osim WO 94/01127, nisu do sada zabilježeni eksperimenti in vivo sa lizozimskim dimerima. Veoma je čudno i zaprepašujuće, i još uvijek čeka objašnjenje, zašto ni Bartholeyns ni Zenebergh niti bilo koji drugi istraživač nisu nastavili rad na ovom predmetu da bi potakli daljnji razvoj jednog potencijalnog otkrića za borbu protiv raka. Usporedni prikaz (slika 1) čistoće lizozimnog dimera proizvedenog prema postupku Sorentina i dr., Eur. J. Biochem, 124, 183-189 (1982) i lizozimnog dimera koji se preporučljivo koristi u ovom izumu, otkriva bar jedan mogući razlog: Kod preparata prema Dorentinu i dr., nađene su velike koncentracije proizvoda kao što su lizozimski monomer, trimer i tetramer, dok je proizvod koji se preporučljivo koristi u ovom izumu velike čistoće, tj. sadrži željeni lizozimski dimer u količini do 90% mas. od cjelokupne lizozimske frakcije u preparatu. Jedan postupak za proizvodnju tako pročišćenog lizozimskog dimera opisan je u WO 91/10731.

Ovo daje jaku podršku pretpostavci da čistoća ranijih lizozimskih dimera jednostavno nije bila dovoljno dobra za eksperimente in vivo i primjene, budući da je već 15 godina bilo poznato da je monomerni oblik lizozima, uprkos njegovog protubakterijskog djelovanja, prilično toksičan i može izazvati upale i teške alergije pa čak i simptome toksičkog šoka.

S obzirom na ovakve okolnosti, čini se da se može lakše shvatiti što nijedan kompetentan istraživač, uključujući Bartholeynsa i Zenebergha, premda su predlagali lizozimski dimer kao potencijalnog kandidata za daljnja istraživanja, nisu vršili daljnje eksperimente tijekom posljednjih deset-petnaest godina kako bi razvili primjene lizozimskog dimera in vivo.

Uprkos takvom nedostatku istraživačke djelatnosti znanstvenika, vjerojatno zbog predrasuda protiv upotrebe lizozimskog dimera in vivo, autori ovog izuma su nastavili rad na istraživanjima i razvoju kako bi poboljšali postupak za proizvodnju i pročišćavanje dimeriziranog lizozima, i kako bi našli primjene in vivo, kod ljudi i kod životinja, dobivenog proizvoda što je dovelo, na primjer, do protuvirusnih i protubakterijskih primjena opisanih u WO 94/01127.

Pored toga, na osnovu saznanja o maloj toksičnosti dimeriziranog lizozima u usporedbi s monomerom i zahvaljujući dostupnosti jednog novog, preparata lizozimskog dimera velike čistoće, autori ovog izuma su riješili pokušati i započeli su ispitivanja protiv raka in vivo koristeći preparate lizozimskog dimera, premda prema poznatom saznanjima iz ovog područja nije ukazivano na njegovu primjenu za liječenje drugih oboljenja osim bakterijskih ili virusnih infekcija. Zbog toga je jedna od najvećih prednosti ovog izuma da osigurava upotrebu lizozimskog dimera velike čistoće za proizvodnju farmaceutskog preparata za dopunu ili zamjenu krajnje toksičnih protukanceroznih lijekova koji se obično daju kod konvencionalne kemoterapije.

Slika 1 daje usporedni prikaz čistoće preparata lizozimskog dimera proizvedenog koristeći dvije poznate tehnike.

Lizozimski dimer velike čistoće, o kome se govori u ovom izumu, može se koristiti za proizvodnju farmaceutskih preparata koji se mogu neposredno koristiti za liječenje životinja i ljudi zahvaljujući njegovom malom sadržaju toksičnog monomera.

Kako je naprijed ukazano, takav pročišćen lizozimski dimer sadrži oko 10% mas. ili manje neželjenih sporednih proizvoda, a može se dobro dimeriziranjem lizozimskih monomera bilo kojeg porijekla, npr. lizozimskih monomera izdvojenih od ljudi, životinja, jaja, bilja, mikroorganizama, pri čemu su monomeri bilo prirodno izolirani u izvornom obliku, bilo proizvedeni kemijskim postupcima ili postupcima genetskog inženjeringa kako bi dali lizozimske monomere iste, ili u suštini iste, kemijske i biološke prirode kao što su prirodni.

Kod ispitivanja na staničnim kulturama in vitro i in vivo na životinjama, preporučljivo miševima i štakorima, autori ovog izuma su mogli uspješno prikazati da primijenjeni preparati lizozimskog dimera pokazuju značajnu mogućnost inhibiranja, ili čak i potpunog sprečavanja naglog razvijanja stanica kanceroznih tkiva i in vitro i in vivo. Ovo ljekovito djelovanje se moglo potvrditi za različite vrste raka, uključujući, premda ne i ograničeno samo na njih, one za koje se zna da su izazvane ili potaknute virusima. Ti virusi posebno obuhvaćaju virus koji izaziva bradavice kod ljudi, Epštajn-Barov virus, virus hepatitisa B i retrovire kao što su HTLV-I (virus leukemije T-stanica kod odraslih), HTLV-II (limfomni virus) i HIV-1 (humani virus gubitka imuniteta), uključujući podtipove.

Vrste raka koje se izazivaju ili na koje utječe djelovanje ovih virusa obuhvaćaju karcinom grlića materice, karcinom urogenitalnog trakta, Kapošijev sarkom, primarni karcinom stanica jetre, leukemiju, limfomu T-stanica, AIDS ili bilo koju njihovu podvrstu. Cilj je prikazanog izuma ostvariti farmaceutski preparat i postupak za sprečavanje i/ili liječenje raka kod životinja i ljudi.

Druga korisna primjena lizozimskog dimera velike čistoće neočekivano je otkrivena kod kliničkih ispitivanja kada su preparati lizozimskog dimera davani pacijentima s manje ili više inficiranim postoperativnim ranama, na primjer nakon amputacije jednog donjeg ekstremiteta. Pokazalo se da lokalno davanje dimera ne samo da uspješno otklanja infekciju rane, već isto tako stimulira rast dlaka i obnovu dlaka na liječenoj površini. Ovo neočekivano otkriće vodilo je do sljedećih istraživanja i jamačno do proizvodnje farmaceutskih preparata koji se mogu primijeniti u slučajevima poremećaja rasta kose, posebno poremećaja rasta kose na bazi lošeg funkcioniranja ili disfunkcije imunološkog sustava, kao, na primjer, u slučaju alopecije areata (opadanje kose).

Ovi preparati mogu bar djelomično zadovoljiti kriterije za dugo željen preparat koji djeluje kao stimulator rasta kose. Osnovno načelo ovog potpuno neočekivanog djelovanja, kako se vjeruje, obuhvaća između ostalog stimuliranje i poboljšanje imunoloških obrambenih mehanizama, poboljšanje cirkulacije krvi u površinskim slojevima tkiva i kože, opće nespecifično poboljšanje imunoloških funkcija i, vjerojatno, neka još neidentificirana djelovanja.

Jedna druga neočekivana i komercijalno veoma interesantna primjena za farmaceutski preparat koji sadrži lizozimski dimer nađena je u području uzgoja riba i pčelarstva, kada su u istraživačkim eksperimentima konvencionalni antibiotici bili zamijenjeni različitim nespecifičnim imunostimulatorima uključujući također i lizozimski dimer.

Primjena imunostimulatora kod uzgoja riba za sprečavanje i/ili liječenje bolesti riba je novo perspektivno otkriće (Siwicki i Anderson 1990; Siwicki i dr. 1994). Trenutačno materije za liječenje bolesti riba obuhvaćaju antibiotike, lijekove i kemikalije koje se koriste za steriliziranje ribnjaka (Stoskopf, 1993). Premda je svaka od ovih terapija barem djelomično učinkovita kod liječenja jedne određene bolesti, javljaju se problemi sa nagomilavanjem tih supstancija u okolnoj sredini i u među ribama, kao i s pojavom patogenih vrsta mikroorganizama otpornih na razne antibiotike.

U slučaju pčelarstva, opća je praksa da se unište rojevi pčela ako postoji dokaz da su pčele zaražene mikrobima, na primjer bakterijskim i/ili virusnim infekcijama. Takva praksa sprečava širenje infekcija na druge rojeve i time svodi gubitke na minimum. Zbog toga postoji potreba da se ostvari jedan alternativan i siguran postupak za preventivno i/ili terapijsko liječenje pčela, koje kombinira prednosti jednog antibiotika koji dodatno ojačava imunološki sustav pčela, i jednog antibiotika koji neće dovesti do pojave mikrobskih vrsta otpornih na antibiotik.

Ovaj izum daje postupak koji zadovoljava takvu potrebu. Pored toga, čak i da lizozimski dimer bude prisutan u proizvedenom medu u primjetnim koncentracijama, to će se prije smatrati kao poboljšanje kvaliteta nego kao pogoršanje, zbog prednosti nespecifičnog imunostimulativnog djelovanja lizozimskog dimera.

Općenito uzevši, imunostimulatori obuhvaćaju skupinu bioloških i sintetičkih spojeva koje pojačavaju nespecifične stanične i humoralne obrambene mehanizme kod životinja i ljudi. Imunostimulatori kao što su beta-glukan, hitosan, leva-mizol, minerali u tragovima i kombinacije minerala, kao i razni proizvodi izvedeni iz brojnih biljnih i životinjskih izvora, djelotvorni su kod sprečavanja oboljenja. Nekoliko vrsta beta-glukana se čini posebno perspektivnim za stimuliranje staničnog i humoralnog nespecifičnog imunološkog reagiranja riba.

Nespecifični obrambeni mehanizmi, koji obuhvaćaju fagocitozu i proizvodnju oksidacijskih radikala brzo se aktiviraju imunostimulatorima i naglo se pripremaju da štite ribe protiv patogenih mikroorganizama kao što su, na primjer, virusi, bakterije, mikoplazme i gljivice, i/ili protiv parazita ili drugih patogenih agenasa. Na taj su način ovi mehanizmi bolji od specifičnog imunološkog reagiranja koje zahtijeva dulji vremenski period za razvijanje specifično prilagođenog imunološkog reagiranja uključujući formiranje antitijela i specifično stanično aktiviranje.

Veoma ohrabrujući rezultati dobiveni kod prvih in vivo ispitivanja, koji su ukazivali na značajno poboljšanje imunoloških obrambenih mehanizama, doveli su do pokretanja detaljnog istraživačkog programa o djelovanju lizozimskog dimera na specifične i nespecifične stanične i humoralne obrambene mehanizme riba, posebno pastrve i lososa, i pčela.

Zbog toga je jedan cilj prikazanog izuma da se ostvare nove primjene lizozimskog dimera, obuhvaćajući njegovu primjenu za proizvodnju jednog farmaceutskog preparata za stimuliranje nespecifičnog staničnog i humoralnog imunološkog reagiranja kod riba i kod pčela.

Drugi je cilj prikazanog izuma ostvariti postupak za korištenje farmaceutskih preparata koji sadrže taj lizozimski dimer kako bi se izazvalo nespecifično stimuliranje imunološkog sustava jednom ili ponovljenom primjenom preparata, radi sprečavanja i/ili liječenja prirodno izazvanih oboljenja riba i pčela.

Eksperimenti in vivo su pokazali da u nekim slučajevima, na primjer kada su ribe već napadnute izvjesnim kemikalijama ili neželjenim bioaktivnim supstancijama kao što su nusproizvodi farmaceutskih preparata koji su im davani, može biti preporučljivo da se ribe liječe lizozimskim dimerom velike čistoće prikazanim u WO 91/10731, koji sadrži oko 10% mas. ili manje neželjenih nusproizvoda, i koji je u suštini bez monomernog oblika lizozima. Da bi se smanjili troškovi uzgoja riba i/ili uzgoja pčela, može biti, ipak, prihvatljivo davati preparat lizozimskog dimera manje čistoće, sve dok se daje u dozi koja ne izaziva štetno djelovanje zbog prisustva toksičnih nusproizvoda, posebno lizozimskog monomera.

Lizozimski dimer, o kome je riječ, može se bilo neposredno davati pacijentu kome je potreban, bilo koristiti za proizvodnju farmaceutskih preparata koji se primjenjuju u uobičajenim galenskim oblicima. Gelovi, masti ili tekući preparati sadrže lizozimski dimer poželjno u koncentraciji od oko 0,01 - 10 mg/ml, a često u koncentraciji od oko 0,1 - 1,0 mg/ml. Obično su pripremljeni kao sterilni i apirogenski preparati i, eventualno, sadrže bar još jedno fiziološki prihvatljivo otapalo i/ili nosač i/ili bar jedan pogodan konzervans.

Farmaceutski spojevi koji sadrže lizozimski dimer korisni su i prvenstveno namijenjeni za vanjsku lokalnu i/ili parenteralnu primjenu koja obuhvaća lokalne injekcije, na primjer u blizini krutog tumora, ili vanjsko nanošenje na površinu tijela uključujući potkožnu injekciju. Intravenozne injekcije mogu zamijeniti ili dopuniti lokalno nanošenje u tijeku liječenja. Pokazalo se kao vrlo učinkovito da se lizozimski dimer nanosi na sluznice, preporučljivo udisanjem (nosne, usne, grlene sluznice) tekućih preparata ili mjesnim nanošenjem (na primjer vaginalne, maternične sluznice) tekućih ili kremastih preparata ili tampona impregniranih materijalom koji sadrži lizozimski dimer.

U nekim je slučajevima preporučljivo da se lizozimski dimer daje oralno, poželjno u uobičajenim galenskim oblicima kao što su, na primjer, tablete, kapsule ili dražeje, ili u obliku zrnaca, granula, pahuljica ili u obliku praška. Ovi kruti preparati često sadrže aktivni lijek u količini od oko 0,01 - 10 mg, preporučljivo 0,1 - 1,0 mg po g cjelokupnog preparata. Također je preporučljivo da još sadrže bar jedan pogodan nosač i/ili konzervans i/ili druge uobičajene dodatke kao što je, na primjer, neko sredstvo za davanje ukusa ili za bojenje. U slučaju liječenja riba, kruti preparati se mogu dodati hrani. Alternativno ili dodatno, lizozimski dimer se može otopiti u vodi ribnjaka, budući da se vjeruje kako se aktivni lijek isto tako može resorbirati preko škrga kod riba. U slučaju uzgoja pčela, preparati lizozimskog dimera mogu se davati otapanjem krutih preparata u pijaćoj vodi, čaju, šećernim otopinama ili drugim uobičajenim tekućinama pripremljenim za pčele, na primjer zamijeni za hranu. Može se, međutim, pripremiti kao vodena otopina, preporučljivo koncentriran, i pomiješan s medom, kako bi se osiguralo da pčele prime lijek.

Preparat za oralnu upotrebu može biti i u obliku jednog osmotskog sustava. U izvesnim slučajevima kao, na primjer, kod sprečavanja i/ili liječenja raka urogenitalnog trakta, lokalno nanošenje antiseptičkih zavoja ili tampona natopljenih djelotvornom dozom lizozimskog dimera velike čistoće može biti korisno i blagotvorno.

Razne vrste naprijed spomenutih preparata daju se, preporučljivo, u jednoj jedinoj ili ponovljivoj dozi od oko 0,005 do 0,5 mg/kg tjelesne mase, naročito dozi od oko 0,01 do 0,1 mg/kg tjelesne mase. Ne treba posebno naglasiti da zahtijevana koncentracija aktivnog lizozimskog dimera u krajnjem farmaceutskom preparatu ovisi prvenstveno o veličini humanog ili životinjskog pacijenta i o vrsti terapije ili preventivnom djelovanju određenom za dotičnog pacijenta. U većini slučajeva, međutim, naprijed spomenuti opsezi koncentracija su dovoljni za pravilno liječenje. Može, ipak, biti potrebno, posebno kod veterinarske medicine, da se poveća stvarna koncentracija lizozimskog dimera do vrijednosti iznad 10 mg/ml i ispod proizvoda topivosti dimera u odgovarajućem otapalu, tj. na oko 20 mg/ml tekućine ili masti. Kada se tako postupa, volumen preparata koji se daje može se održavati na prihvatljivom minimumu radi lakšeg rukovanja.

Ako je moguće, protokol kombiniranog davanja naprijed spomenutih preparata poželjniji je u odnosu na terapiju pojedinačnim lijekovima bilo oralnim, parenteralnim ili lokalnim vanjskim davanjem.

Zbog u suštini netoksičnog karaktera lizozimskog dimera velike čistoće, preparati koji sadrže ovaj dimer mogu se davati u tijeku dugog vremenskog razdoblja, na primjer mjesecima, pa čak i godinama, a da ne izazivaju štetna nuzgredna djelovanja. Vremenski razmaci za preventivno ili terapijsko davanje lijeka mogu se, tipično, kretati odjednom do dva puta dnevno, do tjednih i mjesečnih doza, a mogu obuhvaćati čak dulje intervale, u ovisnosti o pacijentu o kome se radi i urgentnosti liječenja, kao i o djelotvornosti imunostimulacije lizozimskim dimerom.

Kako je naprijed naznačeno, prikazani izum je bar dijelom omogućen mogućnošću nabavke visokokvalitetnog lizozimskog dimera. Uočljiva razlika kvaliteta proizvoda i, posebno, neželjenog udjela lizozimskog monomera, prikazana je na slici 1:

Traka 1 predstavlja standarde LMW prethodno obojenih proteina:

fosforilaza B 142 000 daltona, BSA 97 000, ovalbumin 50 000, karboanhidraza 35 100, inhibitor sojinog tripsina 29 700, lizozime 21 900 (Biorad, SAD);

trake 2 i 3 prikazuju pročišćen lizozimni dimer LVDIUM KLP®602 (KLP-602). Lot 506449, laboratorijska kontrola; traka 2 punjena sa 6,6 µg a traka 3 sa 19,8 µg;

trake 4 i 5 prikazuju drugi obrok KLP-602, traka 4 punjena sa 6,6 µg a traka 5 sa 19,8 µg;

trake 6 i 7 prikazuju jedan preparat lizozimskog dimera (KIW-607) proizvedenog prema Sorentino-u i dr., Eur. J. Bioch. 124, 183-189 (1982); traka 6 punjena sa 6,5 µg i traka 7 punjena sa 19,8 µg.

Preparat pročišćenog lizozimskog dimera, KLP-602, sadrži četiri puta više dimera nego usporedni proizvod KIW-607, dok usporedni proizvod KIW-607 sadrži šest puta više monomera nego KLP-602.

Da bi se ovdje opisani izum mogao bolje shvatiti, prikazani su sljedeći primjeri. Podrazumijeva se da su ti primjeri samo u svrhu ilustriranja, i da nisu namijenjeni za bilo kakvo ograničavanje izuma.

Primjer 1

Lizozimski dimer (KLP-602) kod liječenja limfocitne leukemije kod AKR miševa.

Materijali i postupci

Sedam mjeseci stari miševi oba spola leukemijske vrste AKR, zaraženi Graffi virusom iz Centra za uzgoj životinja, Instituta za imunologiju i eksperimentalnu terapiju, Poljske akademije znanosti, u Wrocławu, korišteni su u eksperimentu. Kod AKR miševa vrši se rano aktiviranje endogenog virusa leukemije, što dovodi do kliničkih očitovanja limfocitne leukemije u dobi od sedam do devet mjeseci. Miševi su podijeljeni u tri skupine od po 30 životinja svaka:

Skupina I. (eksperimentalna)

- životinjama je davan KLP-602 jednom u dozi od 20 µg/kg u 3 cm³ PBS;

Skupina II. (eksperimentalna)

- životinje su primale KLP-602 u istoj dozi kao i naprijed; Skupina III. (kontrolna)
- životinje su primale 0,3 cm³ PBS dva puta.

Miševi su ubijeni krvarenjem tri i šest tjedana nakon posljednje injekcije KLP-602m (10 miševa iz svake skupine). Deset miševa iz svake od skupina ostavljeno je živim.

5 Izvršena su sljedeća ispitivanja :

1. Mjerenje ukupne tjelesne mase i mase unutarnjih organa kao što je jetra, slezena, timus i vanjski cervikalni limfni čvorovi, s određivanjem odnosa mase organa prema ukupnoj masi tijela. Odnos terapijske aktivnosti procijenjen je koristeći formulu $L/K \times 100\%$, gdje je L prosječno vrijeme preživljavanja miševa liječenih sa KLP-602, a K je prosječno vrijeme preživljavanja kontrolnih životinja.
- 10 2. Histopatološka ispitivanja biopsija jetre, slezene, timusa i limfnih čvorova. Isječci su bojeni sa H+E Gomorijevog postupka za vlakna retikuluma.
3. Razina slobodnih radikala u serumu određena je korištenjem postupka kemiluminescencije (Chl) koji omogućava otkrivanje veoma slabe fotonske luminescencije seruma.
- 15 4. Fagocitska aktivnost polimorfonukleara (PMN) određena je koristeći NBT ispitivanja i ispitivanja kemiluminescencijom (Chl).

Rezultati:

20 Pojedinačno (Skupina I.) i dvostruko (Skupina II.) potkožno davanje KLP0602 visoko leukemičnoj vrsti AKR miševa, pri dozi od 20 $\mu\text{g/kg}$, izazvalo je statistički beznačajno povećanje tjelesne mase, kao i smanjenje mase unutarnjih organa kao što su slezena, timus, limfni čvorovi i jetra (posljednje je bilo statistički beznačajno) u usporedbi s kontrolnim životinjama (Skupina III.), mjereno nakon tri tjedna studija (tablica 1).

25 Povećanje ukupne tjelesne mase obje liječene skupine, smanjenje mase slezene, timusa i limfnih čvorova kod skupine I, i povećanje jetre i timusa kod skupine II, u usporedbi sa kontrolnim životinjama (skupina III.) javilo se nakon šest tjedana studija (tablica I.).

30 Tablica 2 prikazuje odnos mase unutarnjih organa prema ukupnoj tjelesnoj masi. Nakon tri tjedna zapaženo je povećanje mase timusa u skupini III. (kontrolna) u usporedbi sa obje eksperimentalne skupine (I. i II.). Nakon šest tjedana, pojavilo se povećanje mase slezene, timusa i limfnih čvorova u skupinama II. i III. u usporedbi sa skupinom I.

35 Histopatološka ispitivanja vršena nakon tri i šest tjedana pokazala su umjerenu (u eksperimentalnim skupinama) i prekomjernu (u kontrolnoj skupini) kolonizaciju cervikalnih limfnih čvorova, timusa i slezene limfoidnim stanicama. Međutim, leukemijski infiltrat u jetri nađen je samo kod kontrolnih životinja. Limfoidne stanice su imale ovalna ili kružna hiperkromatska jedra s brojnim jedarcima i atipičnim mitotičkim figurama. Ove su stanice praćene malobrojnima malo diferenciranim centroblastičnim stanicama, stanicama retikuluma i otocima proliferativnih megakariocita u slezeni. Vezivno tkivo limfnih organa kao što je slezena, limfni čvorovi i timus, sadržalo je malobrojna, tanka vlakna retikuluma.

Ispitivanja kemiluminescencijom:

40 Aktivnost slobodnih radikala u serumima kontrolnih miševa bila je $K = 18 \times 10^{-3}$ nakon tri tjedna proučavanja. U skupini II. aktivnost slobodnih radikala bila je niža ($K = 10 \times 10^{-3}$). Nakon šest tjedana razina slobodnih radikala bila je $K = 10 \times 10^{-3}$ kod kontrolnih životinja, manja u skupini II. ($K = 16 \times 10^{-3}$) i nešto malo viša u skupini I. ($K = 1,5 \times 10^{-3}$).

45 Značajno povećanje fagocitne aktivnosti PMN-a zapaženo je kod obje eksperimentalne skupine u usporedbi s kontrolnom skupinom nakon tri tjedna i bila je: 4688 Chl (skupina I.), 3485 (skupina II.), i samo 2052 Chl za kontrolnu skupinu. Nakon šest tjedana fagocitna aktivnost u skupini II. bila je i dalje velika (3264 Chl) a niža u skupini I. (2477 Chl). Značajno povećanje fagocitne aktivnosti mjereno jednim NBT testom zapaženo je nakon tri tjedna u obje liječene skupine i bilo je 0,27 i 0,26 u skupini I, odnosno u skupini II. Nakon šest tjedana povećanje fagocitne aktivnosti bilo je niže i javilo se samo u skupini II. Fagocitna aktivnost u kontrolnoj skupini bila je 0,22.

50 Indeks terapijske aktivnosti bio je za KLP-602 128% za skupinu I i 150% za skupinu II, što je iznad minimalnih 128%. Ovo ukazuje na izrazita imunostimulativna svojstva KLP-602, što ga čini pogodnim za daljnja proučavanja.

55 Leukemijski infiltrati bili su znatno manji u obje eksperimentalne skupine nego u kontrolnoj skupini a kod nekih miševa čak ih nije ni bilo. Leukemijski infiltrati su se nalazili u timusu, slezeni i limfnim čvorovima. Pored toga, nađeni su u jetri kontrolnih životinja. Rezultati studije ukazuju da KLP-602 može djelomično suzbiti ili odložiti razvoj leukemije kod AKR miševa. Nasuprot tome, kod životinja koje su primale placebo došlo je da naglog povećanja limfnih organa sa morfološkim promjenama tipičnim za diferenciranu limfoidnu leukemiju.

- 5 Pored toga, KLP-602 suzbija povećanje slobodnih radikala u mišjem serumu. Suzbija procese slobodnih radikala slično djelovanju protuoksidatora kao što su vitamini E, C ili selen. Moguće je da suzbijanje proliferacije leukemijskih stanica kod AKR miševa liječenih pomoću KLP-602 ovisi o suzbijanju procesa koje izazivaju slobodni radikali. Kod kontrolnih miševa (bez KLP-602) razina slobodnih radikala bila je viša i odgovarala je intenzitetu oboljenja.
- 10 KLP-602 može stimulirati fagocitno djelovanje MPS, mjereno pomoću dva neovisna postupka, NBT i Chl, pa tako stimulira imunitet stečen posredstvom stanica. Vjerojatno da može modulirati sintezu TNF. Pored toga, T-stanice koje sudjeluju sa MPS mogu prepoznati "antigene za odbacivanje tumora" koji se nalaze na površini leukemijskih stanica. Limfociti protiv infiltriranja tumora "TIL, za 50-100% učinkovitiji od limfokinski aktiviranih ubojica (LAK) nalaze se među tim T-stanicama. Oni imaju CD4 ili CD8 ili miješani fenotip i na svojoj površini izražavaju IL-2 receptor. Još uvijek je nepoznato zašto ih paraliziraju tumorske stanice.
- 15 Retikuloendotelni sustav sa stimulacijom MPS stanica bitan je imunološki i protuvirusni mehanizam. Stimulacija tih stanica dovodi do proizvodnje interferona i posredno aktivira specifične i nespecifične imunološke procese, B-stanice, T-stanice ili NK ovisne.
- 20 MPS stanice sudjeluju u imunološkim procesima preko svojih receptora kao što su Fc receptori, C₃ receptori, ili receptori klase II. HLA, kao i lecitini, transferini, urokinaza, insulin i pedeset drugih manje poznatih receptora. Svaka promjena njihovog izražavanja i afiniteta ukazuje na aktiviranje stanica. MPS stanice mogu fagocitizirati NO-osjetljive stanice jer mogu sintetizirati tu supstanciju. Aktivirani fagociti se nazivaju "ljutiti makrofazi" ili "krvožedne" stanice. MPS stanice mogu uništavati viruse svojim citotoksičnim i citolitičkim svojstvima, produkcijom defektnih viriona i sintezom interferona.
- 25 Rezultati prethodnog eksperimenta na AKR miševima, od kojih se mnogo očekuje, ukazuju da se KLP-602 može uspješno koristiti za liječenje leukemije kod AKR miševa.

Tablica 1. Ukupna tjelesna masa (g) i masa unutarnjih organa (mg) kod kontrolnih i eksperimentalnih miševa ($\bar{x} \pm S$)

	Tri tjedna			Šest tjedana		
Skupina	I.	II.	III.	I.	II.	III.
Ukupna tjelesna masa	25,27 2,22	26,20 1,67	23,96 1,23	26,77 1,10	27,30 2,34	25,57 1,68
Slezena	0,07 ^{xa} 0,00	0,08 0,02	0,09 ^{ab} 0,01	0,07 ^{ax} 0,00	0,23 ^{xb} 0,01	0,22 ^{xb} 0,00
Timus	0,06 ^{xa} 0,01	0,07 0,02	0,08 ^{xb} 0,02	0,08 ^{xa} 0,01	0,21 ^{xb} 0,03	0,15 ^{xbc} 0,07
Limfni čvorovi	0,04 0,00	0,04 0,00	0,05 0,01	0,04 ^{xa} 0,00	0,07 ^{xb} 0,04	0,08 ^{xb} 0,04
Jetra	1,38 0,15	1,36 0,38	1,43 0,05	1,61 0,18	1,89 0,42	1,67 0,15

x - statistički značajna razlika ($p < 0,01$) za a:b, a:c i b:c.

Tablica 2: Odnos mase unutarnjih organa i ukupne tjelesne mase kod kontrolnih i eksperimentalnih miševa (%)

	Tri tjedna			Šest tjedana		
Skupina	I.	II.	III.	I.	II.	III.
Slezena	0,30	0,31	0,37	0,29 ^{xa}	0,84 ^{xb}	0,87 ^{xb}
Timus	0,23 ^{xa}	0,26	0,33 ^{xb}	0,33 ^{xb}	1,06 ^{xb}	0,61 ^{xbc}
Limfni čvorovi	0,18	0,18	0,21	0,15 ^{xa}	0,26 ^{xb}	0,26 ^{xb}
Jetra	5,49	5,25	5,81	6,02	6,35	6,40

x - statistički značajna razlika ($p < 0,01$) za a:b, a:c i b:c.

Primjer 2

- 5 Djelovanje preparata vrlo pročišćenog lizozimskog dimera (KLP-602) na rast kose kod alopecija areata

Istraživanje je vršeno da bi se utvrdilo da li jedan balzam koji sadrži KLP-602 djeluje na rast kose kod alopecije areata. Pored toga, bila je procijenjena tolerantnost na taj balzam kada se nanese na kožu.

- 10 Materijali i postupci:

Ispitivanje je bilo kontrolirano, usporedna klinička studija. Dvanaest osoba (dva muška i deset ženskih pacijenata) sa alopecijom areata u "telogenskom" stadiju, dobrog općeg zdravstvenog stanja, bilo je uključeno u ispitivanje. Starost im je bila od 19 do 50 godina. Dvanaest osoba (tri muška i devet ženskih pacijenata) sa alopecijom aerata liječenom MINOXIDIL®-om smatrano je za kontrolnu skupinu. Njihova starost je bila u opsegu od 19 do 49 godina. Raspodjela osoba prema spolu i starosti u obje liječene skupine bila je slična.

Kriteriji izbora pacijenata:

Kriteriji uključivanja:

5

1. Alopecija areata u "telogenskom" stadiju;
2. Starost 18-50 godina.

Kriteriji isključivanja:

10

1. Alopecija areata u stadiju "distrofije";
2. Druga vrsta alopecije;
3. Bilo koje drugo kožno oboljenje.

15 Istodobno uzimanje drugih lijekova:

Istodobno uzimanje drugih lijekova nije bilo dopušteno osim ako nije bilo potrebno za održavanje općeg zdravstvenog stanja.

20 Dodjeljivanje brojnih oznaka kod liječenja:

U tijeku eksperimenta su osobe koje su zadovoljile kriterije za izbor dobile su ispitnim skupinama redne brojeve. Istraživač je unosio pripadajući redni broj u odgovarajuću rubriku bolesnikovog osobnog kartona.

25 Probno davanje lijekova:

Balzam za kosu koji proizvodi NIKA prema vlastitoj formuli, dobiven je u identičnim plastičnim bocama od 100 ml, koje su imale poklopac s kalibriranim otvorom za ispuštanje kapi. 0,05% KLP-602 losion nanošenje na površinu lubanje (vlasište) tri puta dnevno prema uputstvima dermatologa koji je vodio liječenje. Liječenje je započelo neposredno nakon što je dermatolog dijagnosticirao alopeciju areata.

30

2 % otopine MINOXIDIL®-a nanošena je dva puta dnevno na zahvaćena područja kože.

Liječenje je trajalo 16 tjedana. Nakon liječenja su pacijenti praćeni 2 mjeseca u razdoblju nakon liječenja.

35

Procjena sigurnosti

Osobe za obje ispitne skupine su provjeravane preko cjelokupne povijesti i liječničkog pregleda na početku i na kraju istraživanja. Uzorci krvi i urina za rutinske laboratorijske analize uzimani su prije i nakon liječenja. Laboratorijska ispitivanja obuhvaćala su sljedeće provjere:

40

Hematologija:

Hemoglobin, hematokrit, ukupan i diferencijalni broj leukocita

45

Biokemija seruma:

ALT (GPT), AST (GOT), alkama fosfataza, bilirubin

50

Urin:

analiza urina na protein, krv i glukozu.

55

Pacijenti su mjesečno pregledani u tijeku 4 mjeseca liječenja i 2 mjeseca u razdoblju nakon liječenja. Kod svake vizite pacijenti su ispitivani u postojanju općih ili lokalnih neugodnih pojava kao što je nadraživanje, pečenje, svrab, a liječene površine su pregledane da nema crvenila kože ili drugih lokalnih nuspojava.

Procjena učinkovitosti:

Parametri učinkovitosti

1. Primarni parametar učinkovitosti bio je rast kose,
2. Sekundarni parametar učinkovitosti bilo je vrijeme zarašćivanja poremećenog vlasišta,
3. Fotografska dokumentacija je stvarana u sljedećim točkama studije:

prije nanošenja balzama za kosu sa KLP-602
u trenutku početka rasta kose
na kraju primjene balzama za kosu sa KLP-602.

Vršena je mikroskopska procjena (trihogram). Standardizirani trihogrami uzimani na granici lezija alopecije areata dvali su najkorisniju informaciju o tijeku i ozbiljnosti oboljenja a i o učinkovitosti mjera liječenja.

Kod svake vizite vlasište je provjeravano u pogledu znakova u rastu kose, koje je kategorizirano na sljedeći način:

- nema
- malo - vidljiv ponovni rast (paperjaste dlake ili pojedinačni redci dlake)
- umjereno - nepotpuno (djelomično)
- potpuno.

"Kozmetički prihvatljiv" rast kose definiran je kao dovoljan da pokrije vlasište i prikrije područja koja su i dalje bez kose.

Rezultati:

Sve osobe uključene u eksperiment (12 liječenih sa 0,05% KLP-602 i 12 iz kontrolne skupine liječene 2% Minoxidil otopinom) završili su četveromjesečno razdoblje liječenja i još dvomjesečno kontrolno razdoblje nakon toga.

Učinkovitost

Najkorisnija mjera učinkovitosti bila je procjena istraživača na završetku eksperimenta. U cjelini, kod osam od dvanaest osoba (55%) u KLP-602 skupini i šest od dvanaest osoba (50%) u Minoxidil skupini zapažen je povećan rast kose u tijeku eksperimenta. Od njih, za četiri osobe u KLP-602 skupini (33%) i tri u Minoxidil skupini (25%) smatra se daje to potpuno, kozmetički prihvatljiv rast kose. Djelomičan rast kose uočen je kod tri od dvanaest ocjenjivanih osoba u KLP-602 skupini (25%) i kod tri u Minoxidil skupini (25%). Kod jedne osobe u KLP-602 skupini (9%) uočen je minimalan rast kose. Nije došlo do rasta kose kod četiri od dvanaest (33%) u KLP-602 skupini i kod šest od dvanaest (90%) u Minoxidil skupini.

Kod KLP-602 skupine gdje je alopecija zahvatila manje od 25% vlasišta, rast kose je ostvaren kod osam od osam osoba, a kod šest od sedam osoba u Minoxidil skupini. Ponovni rast kose nije uočen kod osoba iz obje ispitne skupine kod kojih je alopecija zahvatila više od 25% vlasišta.

Srednje vrijeme reagiranja rasta kose u korelaciji s trajanjem liječenja, bilo je u opsegu od jednog do tri mjeseca u obje skupine. Tri osobe u KLP-602 reagirale su nakon jednog mjeseca liječenja. Kod jedne žene porast kose nakon prvog mjeseca bio je s krajnjim vlasima duljine od oko 5 mm, a gole površine vlasišta su bile pokrivene gustom ponovno izraslom kosom. Kod kontrolne vizite nakon drugog mjeseca, ova se žena pojavila s alopecijom totalis (emotivni stres - razvod) i nije reagirala na daljnje liječenje, i završila je i studiju s negativnim rezultatom. Kod jedne osobe u Minoxidil skupini ponovni rast kose zapažen je nakon mjesec dana liječenja. Kod četiri pacijenta u KLP-602 skupini ponovni rast kose ostvaren je nakon dva mjeseca liječenja. Nakon trećeg mjeseca studije, ponovni rast kose je zapažen kod dvije osobe u KLP-602 skupini i kod tri u Minoxidil skupini.

Sigurnost

U tijeku liječenja i u razdoblju praćenja nakon toga, nisu primijećene nikakve nuzgredne pojave. Nisu primijećene nikakve nenormalnosti laboratorijskih vrijednosti za krv i urin, ni na početku ni na kraju istraživanja kod obje liječene skupine.

Lokalna nepovoljna djelovanja primijećena u tijeku proučavanja: Jedna žena u KLP-602 skupini žalila se na pečenje i svrab na vlasištu u drugom mjesecu liječenja. Te je simptome povezala s nošenjem nove perike. Taj osjećaj je nestao u roku od dva tjedna bez nekog dodatnog liječenja, ona nije prekinula terapiju i završila je istraživanje s dobrim rezultatom. Jedan pacijent koji je liječen 2% Minoxidil otopinom žalio se na masnu kosu, ali pregledom vlasišta nisu zapaženi neki značajni klinički znaci. Pacijent je povezao ovaj događaj sa ispitivanjem ali je bio voljan nastaviti liječenje.

Nisu zapaženi značajniji nalazi glede veze ponovnog rasta kose sa starošću pacijenta, lokalizacijom ogoljenih mjesta i vremenom trajanja tekućeg oboljenja, koje je bilo kratko i slično za obje skupine, a kretalo se od jednog tjedna do najviše jedne godine. Sve osobe u obje skupine koje nisu reagirale na liječenje, imale su anamneze alopeciji areata u trajanju od bar pet godina (5-15 godina).

Diskusija

Eksperiment je trebao procijeniti sigurnost i učinkovitost lokalno nanijetog 0,05 % KLP-602 losiona za rast kose kod pacijenata sa alopecijom areata i da je uspoređi sa učinkovitošću 2% Minoxidil otopine u tijeku četveromjesečnog liječenja.

Pacijenti su dobro podnosili balzam za kosu koji je sadržavao KLP-602. Kod 66% osoba liječenih 0,05 % KLP-602 losionom uočen je povećan rast kose u tijeku eksperimenta, u usporedbi sa 55% osoba u Minoxidil skupini.

Kozmetički prihvatljiv rast kose zapažen je kod 33% pacijenata u KLP-602 skupini i kod 25% u minoxidil skupini. Bolji rezultati liječenja su zapaženi kod pacijenata kod kojih je alopecija alterata zahvatila manje od 25% vlasišta. 0,005% KLP-602 losion se lako koristio lokalno i nije izazvao nikakve ni lokalne ni opće neugodnosti. Uzimajući u obzir kratko trajanje eksperimenta (16 tjedana), dobiveni rezultati su veoma ohrabrujući.

Zaključci

- Balzam za kosu koji je sadržavao KLP-602 bio je dobro podnesen i nije izazivao nikakva sporedna djelovanja.
- Lokalno nanošenje 0,05% KLP-602 bilo je lako i sigurno.
- U tijeku eksperimenta nisu zapaženi nikakvi lokalni ili opća sporedna djelovanja niti promjene u laboratorijskim nalazima.
- Zbog kratkog vremena liječenja (4 mjeseca) i 2 mjeseca praćenja nakon toga, potpuna ocjena rezultata i izvođenja liječenja nije bila moguća, premda je to razdoblje bilo dovoljno dugo da bi se zapazila ohrabrujuća učinkovitost liječenja.
- Rezultati dobiveni u ispitivanjima pokazali su daje 0,05% KLP-602 losion usporediv sa 2% Minoxidil otopinom, čak i učinkovitiji kod liječenja alopecije areata.
- Preliminarna istraživanja u rezultatima ostvarenim u eksperimentu pokazuju da lokalno primijenjen KLP-602 izaziva rast kose kod pacijenata koji pate od alopecije areata.

Kratak pregled

Eksperiment je izveden kako bi se utvrdila učinkovitost i podnošljivost jednog balzama za kosu koji je sadržavao KLP-602 za rast kose kod alopecije areata. Nanošenje 0,05% KLP-602 losiona tri puta dnevno bilo je u cjelini dobro podnošeno u četveromjesečnom razdoblju liječenja. Nisu zapažene nikakve lokalne ili sistemske nuzgredne pojave. Uočeno je bolje reagiranje rastom kose kod KLP-602 skupine nego kod Minoxidil skupine. Reagiranje rastom kose zapaženo je kod 66% osoba liječenih 0,05% KLP-602 losionom. Postotak pacijenata koji su reagirali umjerenim ili intenzivnim ponovnim rastom kose bio je veći kod pacijenata kojima je površina gubljenja kose obuhvaćala manje od 25% površine vlasišta. Čini se da je 0,05% KLP-602 značajno sredstvo za liječenje alopecije areata.

Primjer 3: Preventivna primjena lizozimskog dimera za izazivanje nespecifičnog stimuliranja imunološkog sustava riba.

Projekt ispitivanja

Tri stotine zdravih riba vrste kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*, porodica *lossosa*), mase 90-100 g svaka, podvrgnuto je ispitivanju. Lizozimski dimer, proizveden prema WO 91/107731 (ovdje označen kao "KLP-602"), koji je sadržavao oko 10% mas., ili manje, neželjenih nusproizvoda, i koji je bio u suštini bez monomernog oblika lizozima, otopljen je u PBS (slana otopina puferirana fosfatom) da bi se pripremila otopina za injekcije za davanje 10 i 100 µg lizozimskog dimera po kg tjelesne mase, pogodan za intraperitonealne injekcije ribama.

Terapeutski protokol je obuhvaćao različite skupine riba podvrgnute davanju lijeka samo dana 1, dana 1 i dana 3, ili dana 1, 3 i 5. Riba iz kontrolne skupine nisu podvrgavane davanju lizozimskog dimera.

5 1, 2, 3 i 4 tjedna po davanju posljednje injekcije, 10 pojedinačnih riba uzeto je iz svake od liječenih skupina i iz kontrolne skupine. Riba su imobilizirane i uzeto je oko 2 ml krvi iz repne vene pomoću heparinirane sisaljke (Greiner). Određeni su fagocitska sposobnost PMN i MN stanica, djelovanje na naglo pojačanje disanja i potencijalna ubijačka djelatnost PMN i MN stanica, MPO aktivnost u PMN fagocitima, i razine lizozima i gamaglobulina u serumu.

10 Također je po 20 riba iz svake skupine podvrgnuto ispitivanju zarazavanja jednim oboljenjem (furunkuloza). Ribama je data po jedna intraperitonealna injekcija bakterijske suspenzije *Aeromonas salmonicida* uzgojene na hranljivoj podlozi 48 sati. Utvrđena je smrtnost životinja i potvrđena njena međuovisnost sa izvršenom bakterijskom infekcijom izoliranjem patogena iz bubrega mrtvih životinja.

15 Rezultati

Kod skupina liječenih KLP-602, svi naprijed spomenuti imunološki parametri bili su značajno povećani ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuće vrijednosti kod kontrolne skupine. Ovaj neočekivani rezultat je zapažen kod svih skupina, tj. nakon jednostruke, dvostruke ili trostruke primjene KLP-602 i trajao je tijekom cijelog razdoblja promatranja do 4 tjedna nakon posljednje injekcije.

Također je i smrtnost riba kod skupina koje su dobivale KLP-602 bila značajno manja nego kod kontrolne skupine. Aktivnost na pojačavanju disanja bila je čak znatno veća, kao i fagocitski indeksi i razine neutrofilске mijeloperoksidaze (MPO) skupina koje su dva ili tri puta primale KLP-602.

25 Poznata osjetljivost kalifornijske pastrve na virulentna bakterijska zarazavanja A, salmonicida-om i zapaženi rezultati skupina koje su preventivno dobivale preparat sa lizozimskim cimerom, ukazuju da je lijek ustvari u stanju da izazove kratkotrajnu zaštitu protiv ovog zaražavanja mikrobima. Dalje je uočeno daje zaštita bila veća kod skupina koje su dobile dve ili tri doze KLP-602 nego kod skupina koje su samo jednom dobile preparat.

30 Zaključak:

Davanje lizozimskog dimera velike čistoće ribama pojačava nespecifične obrambene mehanizme i značajno pojačava zaštitu protiv zaražavanja mikrobima, na primjer A. salmonicida-om (koja izaziva furunkulozu). Ova zapažanja su od velikog značaja za preventivo djelovanje i liječenje riba u industriji uzgoja ribe, kako bi se sveli na minimum gubici riba usljed čestih ribljih bolesti, posebno tijekom proljeća.

Primjer 4: Terapeutska primena lizozimskog dimera za izazivanje nespecifičnog stimuliranja imunološkog sustava riba

40 Projekat ispitivanja

Dvije stotine kalifornijskih pastrva je bilo uključeno u ovu usporednu studiju nespecifičnih obrambenih mehanizama u tijeku jedne prirodne infekcije IPNV-om (virus infektivne nekroze pankreasa) i nakon primjene jednog preparata koji je sadržavao dimeriziran lizozim (KLP-602). Nakon identifikacije infekcije IPNV-om, dio riba je liječen sa KLP-602, dok je kontrolna skupina ostala neliječena. Glavni parametri koji karakteriziraju nespecifični stanični i humoralni obrambeni mehanizam, analizirani su imunološkim i serološkim postupcima. Ovi su postupci obuhvaćali tjedna određivanja ukupnog broja leukocita, relativnog broja leukocita, fagocitsku sposobnost PMN i MNB stanica, aktivnost na pojačanju disanja i potencijalnu aktivnost ubijanja, aktivnost MPO u neutrofilima, lizozimsku i ceruloplazminsku djelatnost u plazmi, kao i ukupne razine proteina i gamaglobulina, u tijeku razdoblja praćenja u trajanju od 2 mjeseca.

50 Replicirane skupine kalifornijske pastrve hranjene su hranom koja je sadržala nespecifičan imunostimulator KLP-602 u dozi od 20 µg po kg tjelesne mase. Liofilizirani uzorci KLP-602 davani su zajedno s hranom bilo oralno u krutom obliku (pahuljice, zrnca), bilo otopljeni u vodi ribnjaka, tj. kao vodena otopina, u razdoblju od sedam dana. Pretpostavlja se da se lijek također može resorbirati jednim putem kroz riblje škrge.

55 Nakon toga su uzimani uzorci i ispitivani na promjene nespecifičnog staničnog i humoralnog mehanizama u intervalima od po tjedan dana. Svaki put je proizvoljno birano po 10 riba za imunološka ispitivanja i za identifikiranje IPNV. Pored toga, sve su ribe dnevno pregledane da nema neuobičajenog ponašanja, morfoloških promjena i u pogledu smrtnosti.

Rezultati

Kod riba prirodno zaraženih IPNV-om moglo se zapaziti djelovanje usmjereno na suzbijanje imuniteta. U tijeku cijelog vremena praćenja, parametri koji označavaju nespecifični stanični i humoralni obrambeni mehanizam bili su značajno umanjeni, pri čemu su se tjedan dana nakon davanja hrane koja je sadržavala lizozimski dimer, neki od parametara, na primjer razinu ceruloplazmina, aktivnost pojačavanja disanja, razinu imunoglobulina i lizozimska aktivnost, značajno povećali (na primjer, povećanje od oko 31 % razine ceruloplazmina; povećanje od oko 40% lizozimske aktivnosti; povećanje od oko 33% aktivnosti na pojačanju disanja) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nakon davanja KLP-602, imunostimulacijsko djelovanje na nespecifične obrambene mehanizme bilo je nedvosmisleno identificirano. Isto tako je kumulativna smrtnost bila najniža kod skupina koje su primale hranu koja je sadržavala KLP-602.

Zaključak

Ribe koje su dobivale hranu koja sadrži lizozimski dimer (KLP-602) iskazale su pozitivne promjene nespecifičnih imunoloških obrambenih mehanizama. Ove su promjene bile u korelaciji sa smanjenom smrtnošću, tj. ukazivale su na zaštitu protiv prirodno nastale infekcije IPNV-om, koji nalaz jako preporučuje da se dalje razvija i optimizira strategija prevencije i/ili liječenja bolesti riba davanjem ovdje spomenutog lizozimskog dimera.

PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Primjena jednog lizozimskog dimera, koji poželjno sadrži oko 10% mas. ili manje neželjenih nusproizvoda i koji je, u suštini, bez monomernog oblika lizozima, **naznačen time**, što je za proizvodnju farmaceutskog preparata za preventivno i/ili terapijsko djelovanje na jedno oboljenje birano iz skupine koja obuhvaća rak, poremećaje rasta kose, neko oboljenje riba i neko oboljenje pčela.
2. Primjena prema zahtjevu 1, **naznačena time**, što spomenuto preventivno ili terapijsko djelovanje obuhvaća nespecifičnu stimulaciju imunološkog sustava i/ili regenerativnih mehanizama čovječjeg ili životinjskog tijela.
3. Primjena prema zahtjevu 1 ili 2, **naznačena time**, stoje spomenuti rak potican ili izazvan djelovanjem jednog virusa biranog iz skupine koja obuhvaća virus koji izaziva bradavice kod čovjeka, Epštajn-Barov virus, jedan hepatitis B virus i jedan retrovirus, preporučljivo virus leukemije T-stanica kod odraslih (HTLV-I), HTLV-II i HIV-1, uključujući podvrste HIB-a.
4. Primjena prema zahtjevu 1 ili 2, **naznačena time**, za stimuliranje rast kose, preporučljivo u slučaju poremećaja rasta kose usljed nepravilnog imunološkog funkcioniranja, najpreporučljivije u slučaju alopecije areata.
5. Primjena prema zahtjevu 1 ili 2, **naznačena time**, što spomenuto oboljenje riba obuhvaća furunkulozu i infekciju IPNV-om.
6. Primjena prema bilo kojem od zahtjeva 1, 2 i 5, **naznačena time**, što te ribe obuhvaćaju porodicu lososa, posebno kalifornijsku pastrvu.
7. Primjena prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačena time**, što je spomenuti lizozimski dimer jedan proizvod dimeriziranja lizozimskih monomera izvedenih od prirodnih izvora koji obuhvaćaju ljude, životinje, jaja, bilje i mikroorganizme, ili sintezom kemijskim postupcima i/ili postupcima genetskog inženjeringa.
8. Primjena prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačena time**, što se preparat lizozimskog dimera daje u jednoj jedinici ili ponovljivoj dozi od oko 0,005 - 0,5 mg/kg, preporučljivo od oko 0,01 - 0,1 mg/kg tjelesne mase.
9. Primjena prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačena time**, što je preparat lizozimskog dimera u obliku gela, masti ili tekućeg preparata, koji preporučljivo sadrži lizozimski dimer u količini od 0,01-10 mg/ml, preporučljivije u količini od oko 0,1-1,0 mg/ml, i što preparat poželjno sadrži bar još jedan fiziološki prihvatljivo otapalo, nosač i pogodan konzervans, za lokalno, oralno ili parenteralno davanje.
10. Primjena prema bilo kojem od zahtjeva 1-8, **naznačena time**, što je preparat lizozimskog dimera u krutom obliku, posebno u obliku tablete, kapsule, dražeje, praška, zrnaca, granula ili pahuljica, pri čemu preparat preporučljivo sadrži lizozimski dimer u količini od 0,01-10 mg, preporučljivije u količini od oko 0,1-1,0 mg po g cjelokupnog preparata, i što preparat poželjno sadrži bar još jedan pogodan nosač, jedan konzervans i neki uobičajen farmaceutski dodatak, za oralno davanje.
11. Primjena prema bilo kojem od zahtjeva 1, 2, 7 do 9, za sprečavanje i/ili liječenje - eventualno virusom izazvanog - raka urogenitalnog trakta, **naznačena time**, što se djelotvorna doza lizozimskog dimera lokalno nanosi u obliku antiseptičkog zavoja ili impregniranog tampona.

SAŽETAK

Prikazani se izum odnosi na farmaceutske preparate koji sadrže jedan lizozimski dimer, preporučljivo velike čistoće, tj. sa oko 10% mas. ili manje neželjenih nusproizvoda, i na nove primjene istog. Te primjene obuhvaćaju lokalno, oralno i parenteralno davanje spomenutih preparata za nespecifičnu imunostimulaciju kao mjeru za sprečavanje i/ili liječenje

humanih i životinjskih oboljenja koja obuhvaćaju rak, poremećaje rasta kose, oboljenja riba i oboljenja pčela.

Nespecifično stimuliranje imunološkog sustava izaziva se jednom jedinom ili ponovljenom primjenom preparata lizozimskog dimera, preporučljivo u koncentraciji od 5 do 500 µg tjelesne mase.