

(19)



(10) **LT 5064 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5064** (51) Int. Cl.⁷: **A61K 39/12**

(21) Paraiškos numeris: **2003 008**

(22) Paraiškos padavimo data: **2003 02 03**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2003 07 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2003 11 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/EP01/07978**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2001 07 11**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2003 02 03**

(30) Prioritetas: **10033581.0, 2000 07 11, DE**
10122233.5, 2001 05 08, DE

(72) Išradėjas:

Claudia HIRTH-DIETRICH, DE
Tobias SCHLAPP, DE
Angela SIEGLING, FR
Andreas KNORR, DE
Olaf WEBER, US
Gudrun THEISS, DE

(73) Patent savininkas:

BAYER AKTIENGESSELLSCHAFT, 51368 Leverkusen, DE

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita LAURINAVIČIŪTĖ, UAB „Metida“, Gedimino pr. 45-6, LT-2600 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Avies pararaupų viruso kamieniai, skirti panaudoti prieš organų fibrozę

(57) Referatas:

Šis išradimas yra susijęs su inaktyvuotų pararaupų virusų panaudojimu gamyboje vaistų, skirtų gydyti ligas, kurias žmogaus organizme lydi padidintas kolageno susikaupimas, galintis paveikti vidaus organus, tokius kaip kepenys, ir odą bei ją lydinčias struktūras. Šis išradimas ypatingai yra susijęs su kepenų fibroze ir kepenų ciroze, sukeltas virusinio hepatito arba etanolio vartojimo, o taip pat cistine fibroze.

Šis išradimas yra susijęs su inaktyvuotų pararaupų virusų (parapox virus) panaudojimu žmonėms ligų, kurias lydi padidintas kolageno susikaupimas, dėl kurio gali būti paveikti ir vidaus organai, tokie kaip kepenys, ir oda bei ją lydinčios struktūros, profilaktikai ir gydymui. Ypatingai šis išradimas yra susijęs su kepenų fibroze ir kepenų ciroze, po virusinio hepatito arba etanolio sukeltomis kepenų ligomis, o taip pat cistine fibroze.

Šis išradimas yra ypatingai susijęs su avies pararaupų viruso izoliatų, pvz. D1701, orf-11, graikų orf 176 kamieno, graikų orf 155 kamieno, Naujosios Zelandijos (NZ) izoliatų, pvz. NZ2, NZ7 ir NZ10, bei Baypamun®, kuris išvestas iš D1701, panaudojimu žmonėms.

Apart pradinių kamienų, šis išradimas taip pat yra susijęs su palikuonimis, kurie yra gauti persėjant ir/arba adaptuojant prie konkrečių ląstelių, pvz. WI38. Apart pilnų virusų, šis išradimas taip pat yra susijęs su šių virusų dalimis arba fragmentais. Dalimis yra laikomi genominiai arba subgenominiai fragmentai, kurie yra ekspresuojami naudojant tam tikrus vektorius, pavyzdžiui, vaccinia, tinkamose sistemose, pavyzdžiui, fibroblastų ląstelių kultūrose. Fragmentais yra laikomos frakcijos, kurios gaunamos biochemiškai gryninant, pavyzdžiui, chromatografijos būdu, arba dalelės, kurios yra gautos panaudojus fizikinius metodus, tokius kaip suardymas ultragarsu.

Žinoma, kad pararaupų virusas gali stimuliuoti nespecifines imunines reakcijas žinduoliuose. Baypamun®, kuris yra chemiškai inaktyvuoto avies pararaupų viruso D1701 kamieno preparatas, yra naudojamas gyvūnų infekcinių ligų profilaktikai, metafilaksijai ir gydymui ir streso sukeltų ligų prevencijai.

Nors DE 3 504 940 A (Mayr, Anton) patente aprašomas teigiamas Baypamun® poveikis būklėse, tokiose kaip imunonepakankamumas, kuri sukėlė didelės energijos radiacija, chemoterapija, AIDS, imunosupresija, su amžiumi susijęs pakenkimas ir detoksikaciniai poveikiai, jame nėra aprašyta tiesioginis kepenų fibrozės sumažinimas. DE 3 504 940 taip pat aprašoma, kad Baypamun® padidina auglio gydymo efektyvumą kaip papildas ir kad jis

apsaugo naujagimius nuo ligų, sukeltų nepakankamos motinos imuninės apsaugos.

Priimant dabartinę žinių padėtį kaip išeities tašką, dabar netikėtai buvo rasta, kad inaktyvuotų pararaupų virusų įvedimas gali sumažinti kepenų fibrozę arba apsaugoti nuo jos. Gyvūnų modeliuose šis poveikis buvo rastas anglies tetrachlorido sukeltos kepenų fibrozės atveju, kuris yra paremtas toksiniu kepenų pakenkimu, ir kepenų fibrozės, kuri yra sukelta panaudojant heterologinį serumą ir kuriame nėra kepenų uždegimo, atveju. Terapinio poveikio mastas taip pat yra netikėtas: perdėtas kolageno, kuris yra susijęs su kepenų fibroze, gaminimasis yra inhibuojamas 60 % anglies tetrachlorido modelio atveju, ir jis yra beveik pilnai inhibuojamas serumo modelio atveju. Sutinkamai su šiais rezultatais iš ilgalaikių eksperimentų, iš ūmaus anglies tetrachlorido įvedimo buvo galima parodyti, kad Baypamun® ir iš aukščiau minėtų avies pararaupų kamienų gauti preparatai inhibuoja kepenų žvaigždinių ląstelių transformaciją į kolageną gaminančias miofibroblastų tipo ląsteles.

Kadangi kepenų fibrozę ir/arba kepenų cirozę gali sukelti įvairūs nuodai, tokie kaip virusinės infekcijos ir piktnaudžiavimas alkoholiu, skirtingi patologijos mechanizmai sueina į bendrą galutinį kelią, t.y. kolageno gaminimąsi. Kaip rodo eksperimentiniai rezultatai su aukščiau aprašytais gyvūnų neinfekciniais modeliais, inaktyvuotų pararaupų virusų įvedimas stebėtinai apsaugo nuo kolageno nusėdimo nepriklausomai nuo jį sukeliančios nuodingos medžiagos.

Taigi pararaupų virusai atveria naują terapinį principą poveikiui sutelkti galutiniame šio kelio etape, kuris yra bendras visoms ligoms, kurios veda į fibrozę.

Šis poveikis duoda pagrindo manyti, kad naudojant pararaupų viruso preparatus bus pasiektas ypatingai efektyvus gydymas net ir viruso sukeltos kepenų fibrozės atveju, kadangi yra žinoma, kad tokie preparatai pasižymi papildomu imunostimuliaciniu poveikiu.

Galingas dabar atrastas Baypamun® priešfibrozinis efektas atveria galimybę naudoti Baypamun® arba NZ2 preparatus kaip etaloninį standartą vertinant priešfibrozinis efektus testuose priešfibrozinėms medžiagoms identifikuoti.

Taigi, inaktyvuoti pararaupų virusai arba jų palikuonys ir iš aukščiau minėtų kamienų gauti preparatai turi visaapimantį priešfibrozinio aktyvumo spektrą ir todėl yra tinkami ne tik kepenų fibrozinių ligų profilaktikai ir gydymui, bet taip pat ir ryšium su kitų organų fibrozinėmis ligomis, pavyzdžiui, plaučių, kasos, širdies ir odos. Kepenų fibrozės ir kepenų cirozės gydymui ypatingai tinka naudoti pararaupų virusų izoliatus.

Priklausomai nuo klinikinės problemos, terapinis agentas pararaupų viruso pagrindu yra vartojamas arba sistemiškai, tai yra, pavyzdžiui, leidžiamas į raumenis, po oda, į veną arba vartojamas peroraliniu būdu arba inhaliacijomis arba, kitu atveju, vietiniu būdu. Tada pararaupų virusas yra išgrynintas ir liofilizuotas ir yra suspenduojamas tinkamame tirpiklyje prieš pat vartojimą, arba yra kitoje tinkamoje kompozicijoje, arba yra skrandžio sultims atsparioje vartojimo formoje arba kitokioje peroralinio vartojimo formoje.

Ryšium su tuo, jį gali būti reikalinga keletą kartų įvesti arba ilgą laiką vartoti pagal chronologines schemas, atitinkančias klinikinės problemos reikalavimus.

Šis išradimas yra susijęs su pararaupų virusų izoliatais, kurie yra gauti iš D1701, orf-11 kamienų, graikų orf 176 kamieno, graikų orf 155 kamieno ir Naujosios Zelandijos (NZ) kamienų, panaudojimu vaistų, kurie turi prevencinį arba gydomąjį poveikį į žmonių organų fibrozę, gamyboje. Pirmenybė yra teikiama Naujosios Zelandijos (NZ) kamienų, t.y. NZ2, NZ7 ir NZ10 kamienų, panaudojimui vaistų, kurie turi prevencinį arba gydomąjį poveikį į žmonių organų fibrozę, gamyboje, o labiausiai tinkamas yra NZ2. Be to, aukščiau aprašyti pararaupų virusai gali būti modifikuojami persėjant arba adaptuojant prie tinkamų ląstelių, ir tokie pararaupų virusai, kurie buvo gauti persėjant arba adaptuojant, gali būti naudojami vaistų, kurie turi prevencinį arba gydomąjį poveikį į žmonių organų fibrozę, gamyboje; todėl persėjimui arba adaptavimui, pavyzdžiui, galima naudoti žmonių ląsteles, tokias kaip WI-38, MRC-5, jaučio ląsteles, tokias kaip BK-K13A47/Reg arba MDBK, ir avies ląsteles, tokias kaip MDOK. Vaistų, kurie turi prevencinį arba gydomąjį poveikį į žmonių organų fibrozę, gamyboje taip pat galima naudoti aukščiau minėtų pararaupų virusų dalis arba fragmentus. Dalimis yra laikomi genominiai arba subgenominiai fragmentai, kurie yra ekspresuojami tinkamose sistemose, pavyzdžiui, fibroblastų ląstelių kultūrose, naudojant tam tikrus vektorius, tokius

kaip vaccinia virusai, o fragmetais yra laikomos frakcijos, kurios gaunamos biochemiškai gryninant, pavyzdžiui, chromatografijos būdu, virusines daleles, kurios yra ekspresuotos arba kurios yra fiziškai suardytos, pavyzdžiui, veikiant ultragarsu. Be to, šis išradimas yra susijęs su aukščiau aprašytų avies pararaupų viruso kamienų arba modifikacijų, kurios yra gaunamos iš jų kaip aprašyta aukščiau, panaudojimu derinyje su kitais agentais vaistų ir vaistinių preparatų, kurie turi prevencinį arba gydomąjį poveikį žmonių organų fibrozės, gamyboje ir su Baypamun® (paties arba derinyje su kitais agentais) panaudojimu vaistų ir vaistinių preparatų, kurie turi prevencinį arba gydomąjį poveikį žmonių organų fibrozės, gamyboje. Labiausiai šis išradimas yra susijęs su aukščiau aprašytų avies pararaupų viruso kamienų arba iš jo gautų aukščiau aprašytų modifikacijų panaudojimu derinyje su kitais agentais peroralinio vartojimo kompozicijoje, pavyzdžiui skrandžio sultims atspariose kapsulėse.

Be to, šis išradimas yra susijęs su Baypamun® arba NZ2 preparatų, kaip etalono priešfibroziniams poveikiams įvertinti testuose priešfibrozinių medžiagų identifikavimui, panaudojimu.

Čia pateiktas kaip pavyzdys avies pararaupų virusas NZ-2 buvo deponuotas 2001 m. liepos 10 d. Europos ląstelių kultūrų kolekcijoje, Taikomosios mikrobiologijos ir tyrimų centre, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, United Kingdom. Depozito numeris yra 01071006.

1 pavyzdys

Avies pararaupų viruso D1701 (Baypamun®) poveikis

Metodika:

Baypamun® (sausa medžiaga) – preparatas, išskirtas iš chemiškai inaktyvuotų avies pararaupų virusų D1701 kamieno, – pagal nurodymus buvo ištirpintas injekcijoms skirtame vandenyje (titras, remiantis TCID₅₀ (50 % audinių kultūros infektyvios dozės), buvo apie 10⁷/ml).

Kontrolinei gyvūnų grupei, kaip placebo tirpalas, buvo įvestas Polygeline tirpalas, turintis tą patį baltymo kiekį kaip ir Baypamun® tirpalas.

Gyvūnui per vieną kartą buvo suleista i.p. 0,5 ml tirpalo. Leidžiama tris kartus per savaitę, bet niekada viena po kitos einančiose dienose.

Baypamun® buvo tirtas dviejuose gyvūnų modeliuose, kuriuose skyrėsi fibrozės kilmė, t.y. anglies tetrachlorido modelyje ir kiaulės serumo modelyje.

Pastovus veikimas anglies tetrachloridu yra standartinis metodas eksperimentinei kepenų fibrozei sukelti, po kurios atsiranda cirozė (McLean E.K., McLean A.E.M., Sutton P.M., Instant cirrhosis. *Br. J. Exp. Pathol.* 1969; 50: 502-506). Jis yra visuotinai pripažintas žmogaus kepenų fibrozės ir kepenų cirozės modelis. Buvo naudotos Sprague-Dawley žiurkių patelės. Norint užtikrinti maksimalią anglies tetrachlorido mikrosominio metabolizmo indukciją, savaitę prieš eksperimento pradžią gyvūnams su geriamuoju vandeniu buvo duodama 1 g izoniazido/l. Kas penktą dieną peroraliniu būdu buvo duodama anglies tetrachlorido 0,1 ml/100 g kūno masės dozė (anglies tetrachloridas:mineralinė alyva = 1:1). Po septynių savaičių gyvūnai buvo numarinti ir ištirti. Lygiagrečiai su anglies tetrachloridu buvo veikama Baypamun®.

Veikimas heterologiniu serumu, pavyzdžiui, žiurkių atveju kiaulės serumu, yra panašus metodas, kuris yra dažnai naudojamas literatūroje kepenų fibrozei su po jos einančia ciroze sukelti; šis metodas, skirtingai nuo kitų modelių, sukelia tik minimalų kepenų parenchiminių ląstelių pakenkimą ir uždegimą (Bhunchet, E. and Wake, K. (1992): Role of mesenchymal cell population in porcine serum-induced rat liver fibrosis. *Hepatology* 16:1452-1473). Sprague-Dawley žiurkių patelės buvo veikiamos 2x per savaitę po 0,5 ml sterilaus kiaulės serumo (Sigma)/gyvūnui, o kontroliniai gyvūnai gavo sterilaus fiziologinio natrio chlorido tirpalo (2x per savaitę, 0,5 ml/gyvūnui, i.p.). Baypamun® buvo leidžiamas lygiagrečiai su kiaulės serumu, bet niekada neleidžiamas tą pačią dieną. Po septynių savaičių gyvūnai buvo numarinti ir kolageno kiekiui nustatyti buvo išimtos kepenys.

Kepenų audinio histologiniams tyrimams iš dešinėsios priekinės kepenų skilties buvo išimti standartizuoti skersiniai audinių cilindrai (maždaug 10 x 2 mm). Užšaldytos išpjovos buvo dažomos 0,1 % Picrosirius raudonojo tirpalo kepenų fibrozės metu susidariusiam randui aptikti.

Kontrastiniam sustiprinimui buvo naudojami Fast Green kontrastiniai dažai. Kepenų fibrozės laipsnis buvo nustatytas kiekvienoje atpjovoje kaip viso ploto procentinė dalis, išmatuota pagal Picrosirius raudonuoju nudažytą plotą. Videomikroskopinis spalvos detektavimas buvo standartizuotas ir laikomas pastovus viso eksperimento metu. 64 kvadratai standartizuotame 31 mm² tinklelyje buvo matuojami esant 50 kartų galutiniam padidininimui.

Norint kiekybiškai nustatyti kepenų žvaigždinių ląstelių (HSC; taip pat Ito ląstelių arba A vitamino akumuliuojančių ląstelių) transformacijos apimtį po ūmaus žiurkių poveikio anglies tetrachloridu, histochemiškai buvo detektuotos α -lygiųjų raumenų aktino-teigiamos ląstelės. α -Lygiųjų raumenų aktino-teigiamas plotas buvo nustatytas, esant 200 kartų galutiniam padidinimui, kiekvienoje išpjovoje kiekvienu atveju 16-je centrinių skiltelių 248x180 μ m laukeliuose. Žinoma, kad HSC transformacija į kolageną ir augimo faktorių produkujančias panašias į miofibroblastus ląsteles yra lemiamą kepenų fibrozės sukėlimo stadija. Todėl transformuotos HSC yra ankstyvasis kepenų fibrogeninio aktyvumo rodiklis.

Buvo naudotas Leica Quantimed 500MC (Leica Germany) pusiau automatinis morfometras.

Norint nustatyti OH-proliną, kiekvienu atveju 50-100 mg kepenų audinio buvo išdžiovinta ir pavirinta maždaug 17 val. su 6N HCl. Nugarinus rūgštį vakuuminėje krosnyje, liekana buvo ištirpinta 5 ml distiliuoto vandens ir nufiltruotas šis tirpalas. Kambario temperatūroje 25 min. buvo inkubuojama 200 μ l šio nufiltruoto tirpalo su 200 μ l etanolio ir 200 μ l oksidacijos tirpalo (7 % vandeninio chloramino T hidrato tirpalas, praskiestas 1:4 acetatiniu-citratinu buferiu, pH 6,0). Po to pridedama 400 μ l Erlichio reagento (12 g 4-dimetilaminobenzaldehido 20 ml etanolio + 2,74 ml koncentruotos sulfato rūgšties 20 ml etanolio). Palaikius 35 °C temperatūroje 3 valandas, matuojama sugertis esant 573 nm bangos ilgiui. Standartams buvo naudoti vandeniniai OH-prolino (Sigma) tirpalai. OH-prolino kiekis kepenų mėginiuose buvo apskaičiuotas miligramais gramui kepenų sausos masės.

Norint kontroliuoti reaktingo deguonies laisvųjų radikalų susidarymą, buvo matuota kepenyse redukuoto α -tokoferolio (α -TOC) – laisvuosius radikalus gaudančio agento – koncentracija, o laisviesiems radikalams jautraus fermento 7-etoksirezorufino deetilazės (EROD) aktyvumas buvo matuojamas serume. Abu parametrai yra būdingai slopinami apnuodijant anglies tetrachloridu ir duoda galimybę įvertinti audinio oksidacinio pakenkimo stiprumą.

Gyvūno kepenų būklė buvo nustatyta matuojant kai kuriuos standartinius serumo parametrus: alanin-aminotransferazę (ALT), šarminę

fosfatazė (AP), aspartat-aminotransferazė (AST), γ -glutamil-transferazė (GGT), glutamat-dehidrogenazė (GLDH) ir bendrąjį bilirubiną (TBIL).

Rezultatai:

Poveikis Baypamun® žymiai sumažina kepenų fibrozinę degeneraciją anglies tetrachloridu paveiktose žiurkėse (Fig.1). Be to, galima stebėti beveik pilną HSC pakitimų inhibavimą (Fig.2). Proliferuojančių neparenchimininių ląstelių skaičius Baypamun® paveiktų gyvūnų kepenyse yra žymiai sumažintas (Fig.3). Neparenchiminės ląstelės apima HSC ir Kupffer'io ląsteles, kurios panašiai dalyvauja fibrogenezėje.

Kepenų ląstelių pakenkimo indikatoriai serume, tokie kaip ALT, AP, AST, GGT, GLDH ir TBIL (1 lentelė) rodo tendenciją virsti normaliais.

Tas pats EROD ir α -tokoferolio koncentracijų sumažėjimas kontrolinėje grupėje ir Baypamun® paveiktoje grupėje rodo, kad abiejose grupėse yra toksinių reaktingų deguonies laisvųjų radikalų, atsirandančių dėl apnuodijimo anglies tetrachloridu (1 ir 2 lentelės). Todėl Baypamun® "priešfibrozinio" poveikio galimybė dėl jo detoksikacinio poveikio gali būti atmesta.

Serumo modelyje Baypamun® rodo beveik pilną fibrozės slopinimą (Fig.4): Baypamun® paveiktose žiurkėse ir hidroksiprolino kiekis, ir sirius raudonuojų nusidažantys plotai kepenyse yra faktiškai tokie patys, kaip ir sveikuose kontroliniuose gyvūnuose, tuo tarpu jie yra padidėję 7 kartus serumu paveiktose kontrolinėse žiurkėse. Baypamun® grupėje kolageno kiekio padidėjimas, kurį sukelia poveikis kiaulės serumu yra tik 10 % atitinkamos kontrolinės grupės reikšmės.

2 pavyzdys

Avies pararaupų viruso NZ2 kamienas

Metodika:

NZ2 virusas buvo replikuotas talpų serijose. Šiam tikslui BK 3A klonų ląstelės buvo auginamos 3-5 dienas ląstelių auginimo lėkštėse (37 °C) EMEM

2 g + 10 % FCS, kol ląstelių kolonijos buvo 90-100 % susiliejusios. Keturios ląstelių auginimo lėkštės buvo naudotos kaip inokuliantas kiekvienai talpos serijai, o pastaroji buvo užpildyta terpe (EMEM 2 g + 10 % FCS) iki 2,5 l tūrio. Po inkubavimo 37 °C temperatūroje 3-5 dienas (90-100 % susiliejusių kolonijų), terpė buvo pakeista EMEM 2 g be serumo ir kultūra buvo užkrėsta NZ2 virusu (MOI, 0,001-0,01).

Kai buvo pasiekta 100 % CPE (inkubuojama 37 °C temperatūroje maždaug 7-8 dienas), buvo išskirtas virusas. Šiam tikslui viruso suspensija buvo padalinta alikvotomis į sterilius terpės maišelius ir užšaldyta -80 °C temperatūroje. Po to suspensija buvo atšildyta 37 °C temperatūroje inkubavimo kameroje ir atskirtos ląstelės panaudojant giliają filtraciją (porų dydis 5 µm). Po to viruso suspensija buvo sukonzentruojama 20-40 kartų padidinant koncentraciją ultrafiltravimo būdu (100 kDa galutinė riba). Kitu atveju, virusas gali būti sukonzentruojamas ultracentrifuguojant (Ti45, 30000 aps./min., 4 °C, 60 min.).

Suspensijoje esančio viruso titras, gautas koncentruojant, buvo nustatytas titruojant BK 3A klonų ląstelėmis. Suregulius viruso titrą iki 6,0 reikšmės, skiedžiant EMEM terpe be FCS, virusas buvo inaktyvuotas šiluma 58 °C temperatūroje 2 val. Inaktyvacija buvo tikrinama panaudojant inaktyvavimo kontrolę BK 3A klonų ląstelėmis.

Avies pararaupų viruso NZ2 kamienas buvo tiriamas panaudojant kiaulės serumu indukuotą žiurkių kepenų fibrozės modelį, jau naudotą 1 pavyzdyje:

Sprague-Dawley žiurkių patelės buvo veikiamos 2x per savaitę po 0,5 ml sterilaus kiaulės serumo (Sigma)/gyvūnui, o kontroliniai gyvūnai gavo sterilaus fiziologinio natrio chlorido tirpalo (2x per savaitę, 0,5 ml/gyvūnui, i.p.). NZ2 kamienas buvo leidžiamas i.p. 3x per savaitę imant atitinkamai $1,1 \times 10^5$ ir $5,0 \times 10^5$ TCID₅₀/gyvūnui dozes (įleidžiamas kiekis: 0,5 ml/gyvūnui). Mažesnės dozės atveju pradinė medžiaga buvo praskiesta ląstelių auginimo terpe (Eagle's minimali pagrindinė terpė, Sigma). Kontroliniams gyvūnams buvo suleista ląstelių auginimo terpė. Nors NZ2 kamienas buvo leidžiamas lygiagrečiai su serumu, bet niekada nebuvo leidžiamas tą pačią dieną. Po septynių savaikių gyvūnai buvo numarinti, išimtos kepenys ir kepenų fibrozės

apimtis buvo kiekybiškai įvertinta ir morfometriškai, ir nustatant OH-proilno kiekį. Nustatymo metodika aprašyta 1 pavyzdyje.

Rezultatai:

Kolageno nustatymo rezultatai yra pavaizduoti Fig.5. Netikėtai rasta, kad paveikus NZ2 kamienu galima nuslopinti kepenų fibrozės atsiradimą: lyginant su sveikais gyvūnais, serumu paveikti kontroliniai gyvūnai turėjo labai padidintą OH-proilno kiekį ir sirius raudonuoju nudažomo kolageno kiekį. Ši padidėjimą sumažino NZ2 nuo dozės priklausančiu būdu. Poveikio dydis taip pat yra netikėtas: 5×10^5 TCID₅₀ dozė sumažino kolageno kiekio padidėjimą kepenyse iki mažiau nei 10 % kontrolinės reikšmės. Kokybinis histologinių preparatų įvertinimas parodė, kad gyvūnų, turinčių kolageno pertvaras, dalis yra sumažinta nuo 93 % (14/15) iki 33 % (5/15) $1,5 \times 10^5$ TCID₅₀ grupėje ir iki 0 % $5,0 \times 10^5$ TCID₅₀ grupėje.

3 pavyzdys

PPVO priešfibrozinis poveikis, įvedus peroraliniu būdu

PPVO buvo sudėtas kaip sausas liofilizatas į skrandžio sultims atsparias kapsulės (Elanco, Indianapolis, JAV).

Keturios grupės po 6 eksperimentinius gyvūnus buvo veikiamos taip: viena kontrolinė grupė (1 grupė) gavo tik skrandžio sultims atsparią kapsulę (be PPVO), kuri buvo įvesta peroraliniu būdu, ir dar buvo suleistas i.p. sterilus natrio chlorido tirpalas (0,5 ml/gyvūnui). Antra grupė gavo skrandžio sultims atsparią kapsulę (be PPVO) peroraliniu būdu su 0,5 ml anglies tetrachlorido/gyvūnui, ir buvo suleista i.p. 0,5 ml fiziologinio natrio chlorido tirpalo. Trečios grupės gyvūnai vėl gavo peroraliniu būdu skrandžio sultims atsparią kapsulę (be PPVO) kartu su 0,5 ml anglies tetrachlorido gyvūnui. Be to, 3 grupės gyvūnai gavo PPVO D1701 (5×10^6 TCID₅₀/gyvūnui dozė) 0,5 ml injekcijoms skirtu vandeniu, suleidžiant tirpalą i.p. būdu. Ketvirta grupė gavo peroraliniu būdu PPVO D1701 (5×10^6 TCID₅₀/gyvūnui dozė, sudėta į skrandžio sultims atsparią kapsulę) kartu su 0,5 ml anglies tetrachlorido.

Ketvirtos grupės gyvūnai taip pat gavo 0,5 ml sterilaus natrio chlorido tirpalo, kuris buvo suleistas i.p. būdu.

Po 48 valandų buvo išimtos kepenys ir α -lygiųjų raumenų aktino (α -SMA)-teigiamas centrinių skiltelių plotas buvo nustatytas histochemiškai kiekvienam gyvūnui, kaip bendro ploto, išmatuoto atitinkamose audinių išpjovose, procentai (Johnson S.J., Hines J.E., Burt A.D. Phenotypic modulation of perisinusoidal cells following acute liver injury: a quantitative analysis. *Int. J. Exp. Path.* 1992; 73:765-772). Ši reikšmė yra kepenų žvaigždinių ląstelių transformacijos matas.

Pagal aukščiau duotą aprašymą buvo atliktos dvi eksperimentų serijos. Pirmos eksperimentų serijos rezultatai yra pateikti 3 lentelėje, o antros eksperimentų serijos rezultatai yra pateikti 4 lentelėje.

Pirmoje eksperimentų serijoje α -SMA-teigiamas centrinių skilčių plotas gyvūnų, kurie gavo PPVO D1701 i.p. suleidimo būdu, kepenyse (3 grupė), buvo nepaaiškinamai (ir priešingai kitai eksperimento patirčiai) didesnis nei gyvūnų, kurie negavo PPVO. Dėl šios priežasties buvo atlikta 2 eksperimentų serija kaip pakartotinas eksperimentas.

Abiejose eksperimentinėse serijose buvo stebimas maždaug 50 % transformacijos inhibicija, lyginant su kontroline grupe (kiekvieną atvejų 2 grupe) netikėtu ir besiderinančiu būdu po peroralinio PPVO D1701 įvedimo (abiem atvejais 4 grupė). Antroje eksperimentų serijoje šis transformacijos inhibavimas po peroralinio PPVO D1701 įvedimo (4 grupė) yra panašaus dydžio, kaip ir tuo atveju, kai PPVO D1701 buvo suleistas į pilvaplėvę (3 grupė).

Iš šių rezultatų galima daryti išvadą, kad po peroralinio įvedimo PPVO taip pat turi priešfibrozinį poveikį.

1 lentelė

Baypamun® įtaka į kepenų būklės parametrus, kaip intoksikacijos rodiklius, serume							
	ALT U/l	AST U/l	AP U/l	GGT U/l	GLDH U/l	TBIL μmol/l	EROD nmol g/min.
Kontrolė	49,1	45,7	162,8	0,8	12,5	1,6	0,30
SNV	3,7	8,7	14,76	0,2	7,9	0,2	0,02
CCl ₄	95,6	92,4	392,7	6,1	37,1	2,9	0,15
SNV	14,7	14,1	43,0	1,3	14,8	0,3	0,01
CCl ₄ +Baypamun®	72,0	65,9	329,5	4,5	18,2	1,9	0,17
SNV	9,9	9,1	26,9	0,8	4,0	0,2	0,03

ALT: alaninaminotransferazė; AST: aspartataminotransferazė; AP: šarminė fosfatazė; GGT: γ-glutamilttransferazė; GLDH: glutamatdehidrogenazė; TBIL: bendras bilirubinas; EROD: 7-etoksirezorufindeetilazė.

2 lentelė

Baypamun® įtaka į kepenų α-tokoferolį	
	α-tokoferolis nmol/ audinių g
Kontrolė	73,1
SNV	2,2
Anglies tetrachloridas	35,7
SNV	2,3
Anglies tetrachloridas+ Baypamun®	38,5
SNV	6,1

3 lentelė

PPVO įtaka, suleidus jį į pilvaplėvę arba įvedus peroraliniu būdu, į kepenų žvaigždinių ląstelių transformaciją po fibrogeninės anglies tetrachlorido dozės įvedimo (1 eksperimentų serija)

Fibrozę	Įvedimas	Dozė	α -SMA (%)
1 grupė nepaveikta	tuščia kapsulė peroraliniu būdu + vanduo injekcijoms i.p.	---	0,28±0,79
2 grupė CCl ₄	tuščia kapsulė peroraliniu būdu + vanduo injekcijoms i.p.	---	2,76±0,79
3 grupė CCl ₄	PPVO vandenyje injekcijoms i.p. + tuščia kapsulė peroraliniu būdu	5x10 ⁶ TCID ₅₀ /gyvūnui	5,05±2,0
4 grupė CCl ₄	PPVO kapsulėje peroraliniu būdu + vanduo injekcijoms i.p.	5x10 ⁶ TCID ₅₀ /gyvūnui	1,46±0,34

4 lentelė

PPVO įtaka, suleidus jį į pilvaplėvę arba įvedus peroraliniu būdu, į kepenų žvaigždinių ląstelių transformaciją po fibrogeninės anglies tetrachlorido dozės įvedimo (2 eksperimentų serija)

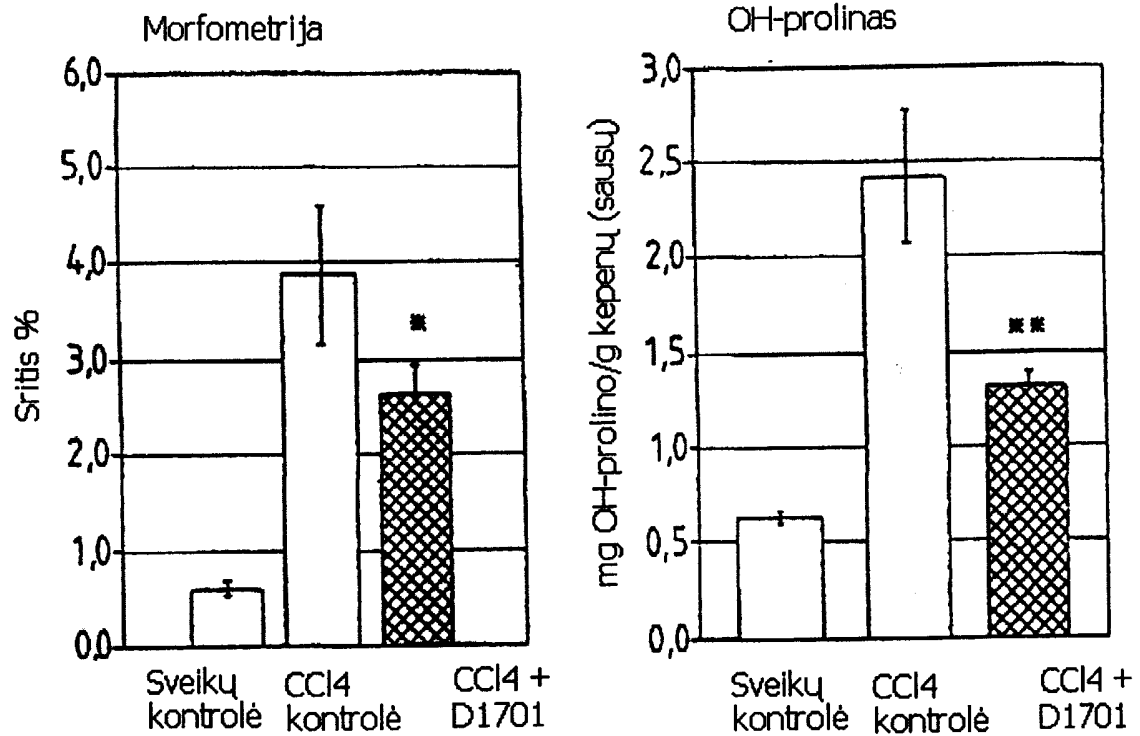
Fibrozę	Įvedimas	Dozė	α -SMA (%)
1 grupė nepaveikta	tuščia kapsulė peroraliniu būdu + vanduo injekcijoms i.p.	---	0,20±0,04
2 grupė CCl ₄	tuščia kapsulė peroraliniu būdu + vanduo injekcijoms i.p.	---	3,18±0,56
3 grupė CCl ₄	PPVO vandenyje injekcijoms i.p. + tuščia kapsulė peroraliniu būdu	5x10 ⁶ TCID ₅₀ /gyvūnui	1,22±0,35
4 grupė CCl ₄	PPVO kapsulėje peroraliniu būdu + vanduo injekcijoms i.p.	5x10 ⁶ TCID ₅₀ /gyvūnui	1,55±0,34

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Pararaupų virusų izoliatų panaudojimas vaistų, turinčių prevencinį arba gydomąjį poveikį į žmonių organų fibrozę, gamyboje.
2. Pararaupų virusų, pavyzdžiui D1701, orf-11 kamienų, graikų 176 kamieno, graikų 155 kamieno ir Naujosios Zelandijos (NZ) kamienų, izoliatų panaudojimas vaistų, turinčių prevencinį arba gydomąjį poveikį į žmonių organų fibrozę, gamyboje.
3. Pararaupų virusų izoliatų panaudojimas pagal 1 - 2 punktus, besiskiriantis tuo, kad Naujosios Zelandijos (NZ) kamieniai, naudojami vaistų, turinčių prevencinį arba gydomąjį poveikį į žmonių organų fibrozę, gamyboje, yra NZ2, NZ7 ir NZ10 kamieniai.
4. Pararaupų virusų panaudojimas pagal 1 - 3 punktus, besiskiriantis tuo, kad pararaupų virusai buvo modifikuoti persėjant arba adaptuojant prie tinkamų ląstelių, vaistų, turinčių prevencinį arba gydomąjį poveikį į žmonių organų fibrozę, gamyboje.
5. Pararaupų virusų panaudojimas pagal 1 - 3 punktus, kuriame pararaupų virusai buvo modifikuoti persėjant arba adaptuojant prie tinkamų ląstelių, vaistų, turinčių prevencinį arba gydomąjį poveikį į žmonių organų fibrozę, gamyboje, besiskiriantis tuo, kad persėjimui arba adaptacijai yra naudojamos žmogaus ląstelės, tokios kaip WI-38 arba MRC-5, jaučio ląstelės, tokios kaip BK-K13A47/Reg arba MDBK, ir avies ląstelės, tokios kaip MDOK.
6. Virusų dalių arba fragmentų panaudojimas pagal 1-5 punktus vaistų, turinčių prevencinį arba gydomąjį poveikį į žmonių organų fibrozę, gamyboje, besiskiriantis tuo, kad dalimis yra laikomi genominiai arba subgenominiai fragmentai, kuriuos ekspresuoja tinkami vektoriai, tokie kaip vakcinijos virusai, tinkamose sistemose, tokiose kaip fibroblastų ląstelių kultūros, o fragmentais yra laikomos frakcijos, kurios gaunamos biochemiškai gryninant, kaip antai chromatografijos būdu, ekspresuotas arba fiziškai suardytas virusų daleles.

7. Vieno iš izoliatų panaudojimas pagal 1-6 punktus derinyje su kitais vaistais vaistų ir farmacinių preparatų, turinčių prevencinį arba gydomąjį poveikį žmonių organų fibrozę, gamyboje.
8. Avies pararaupų viruso D1701 (paties arba derinyje su kitais vaistais) panaudojimas vaistų ir farmacinių preparatų, turinčių prevencinį arba gydomąjį poveikį žmonių organų fibrozę, gamyboje.
9. Avies pararaupų viruso D1701 arba NZ2 preparatų panaudojimas etaloniniu standartu priešfibroziniams poveikiams įvertinti, identifikuojant priešfibrozines medžiagas.
10. Avies pararaupų viruso D1701 panaudojimas pagal 8 punktą, besiskiriantis tuo, kad farmaciniai preparatai ir vaistai yra tinkami peroraliniam vartojimui.

Fig. 1



PPVO D1701 (Baypamun®) poveikis į CCl₄ sukeltą kepenų fibrozę, Dozė: 5x10⁶ TCID₅₀/gyvūnui
 Gyvūnų skaičius: n = 6 sveikų kontrolė, n = 12 CCl₄ kontrolė, n = 13 CCl₄+D1701
 *p<0,02; **p<0,01 (Kolmogorovo-Smirnovo testas) lyginant su CCl₄

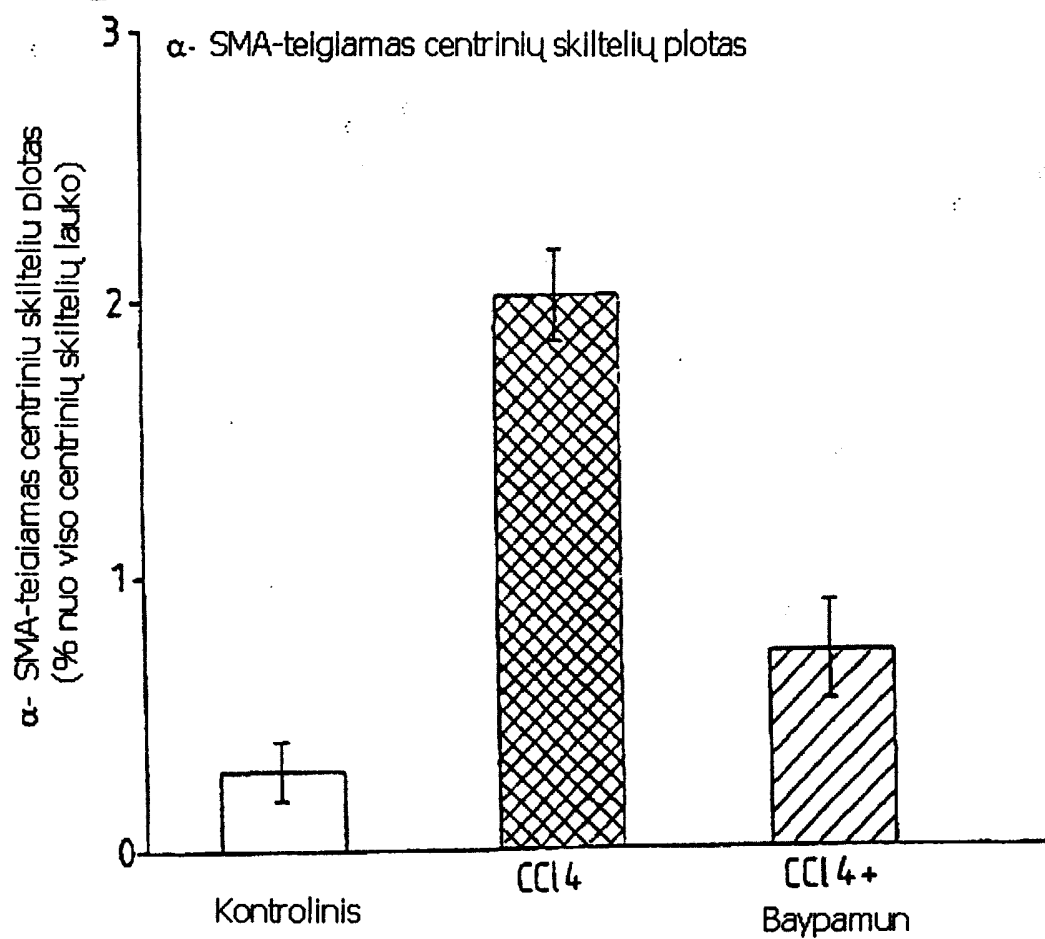
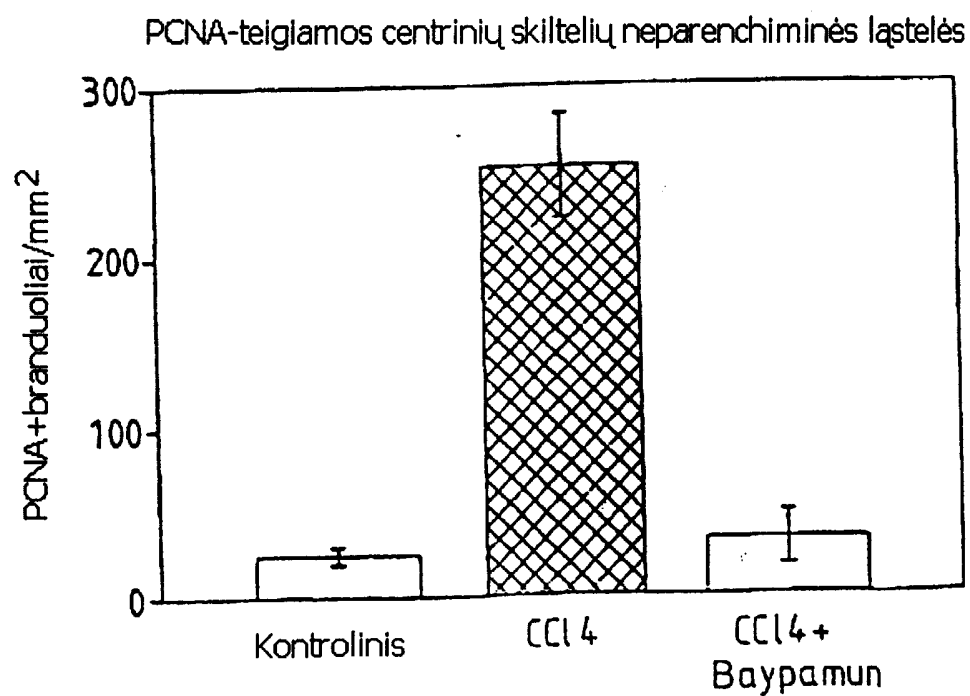
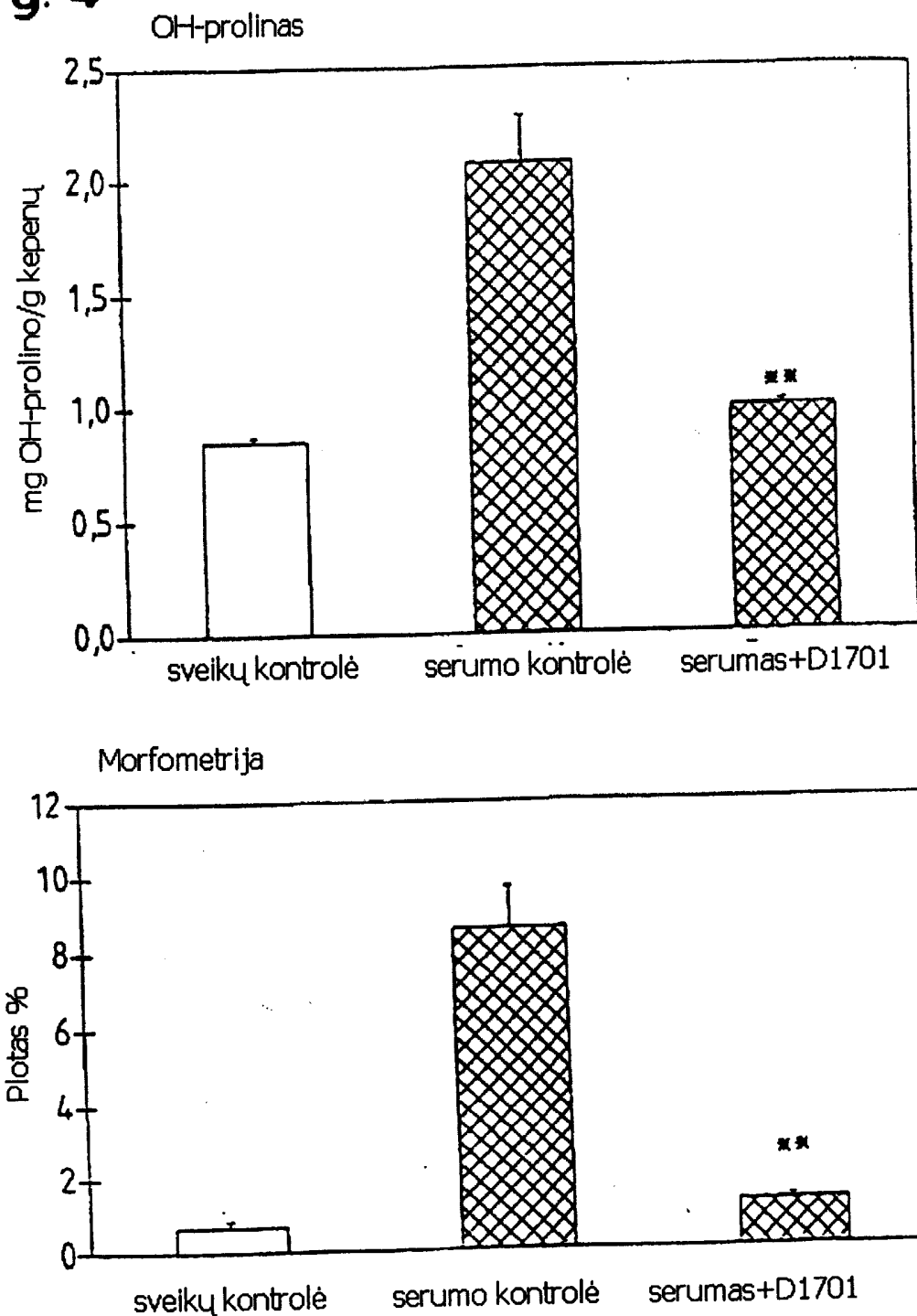
Fig. 2**Fig. 3**

Fig. 4

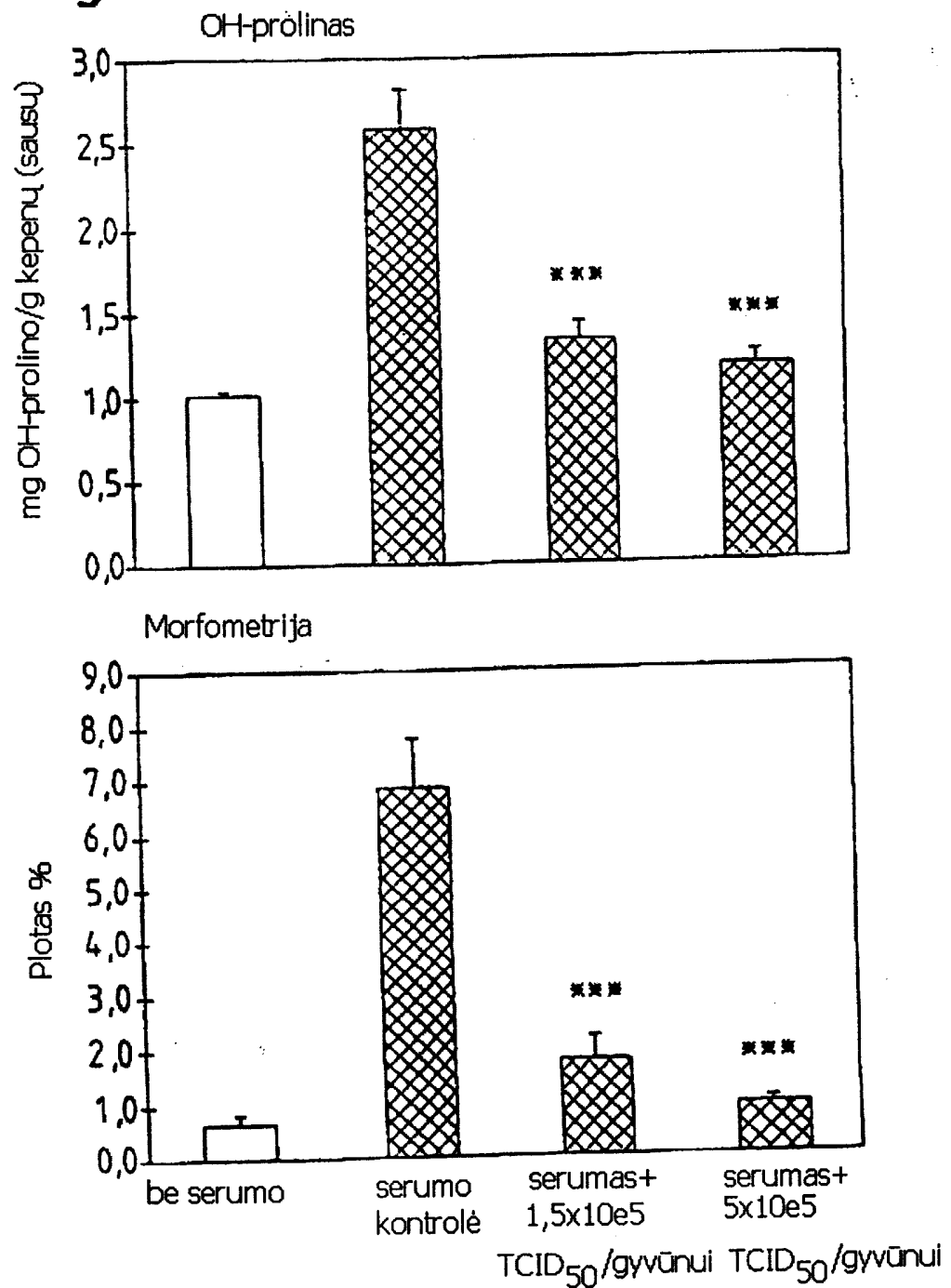


PPVO D1701 (Baypamun®) poveikis į kiaulės serumo sukeltą kepenų fibrozę, Dozė:
 5×10^6 TCID₅₀/gyvūnui

Gyvūnų skaičius: n = 15 serumo grupėje, n = 5 sveikų kontrolė

*p < 0,01 (Kolmogorovo-Smirnovo testas) lyginant su serumo kontrole

Fig. 5



PPVO NZ2 poveikis į kiaulės serumo sukeltą kepenų fibrozę

Gyvūnų skaičius: n = 15 serumo grupėje, n = 5 sveikų kontrole

*p<0,01 (Kolmogorovo-Smirnovo testas) lyginant su serumo kontrole