

(19)



(10) **LT 5079 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5079**

(51) Int. Cl.⁷: **A61K 35/76**

(21) Paraiškos numeris: **2003 009**

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

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2003 08 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2003 12 29**

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

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/EP01/07991**

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

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

(30) Prioritetas: **10033582.9, 2000 07 11, DE**
10122451.6, 2001 05 09, DE

(72) Išradėjas:

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

(73) Patent savininkas:

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, 51368 Leverkusen, DE

(74) Patentinis patikėtinis:

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

(54) Pavadinimas:

Avies pararaupų viruso kamienų panaudojimas antivirusinių ir priešvėžinių vaistų gamybai

(57) Referatas:

Šis išradimas yra susijęs su avies pararaupų viruso kamienų panaudojimu gamyboje imuninių vaistų, skirtų gydyti žmones ir gyvūnus nuo auglių ir virusinių infekcijų.

Šis išradimas yra susijęs su avies pararaupų viruso (*Parapoxvirus ovis*) kamienų, kaip imunoterapinių agentų infekcinės arba neinfekcinės kilmės imunodeficitiniams susirgimams, panaudojimu, su avies pararaupų viruso kamienų panaudojimu augliams ir virusinėms infekcijoms, bei ligoms, kurias lydi tokios infekcijos, gydyti ir su avies pararaupų viruso kamienų panaudojimu vaistų žmonėms ir gyvūnams gamyboje.

Be to, šis išradimas yra susijęs su avies pararaupų viruso kamienų ir iš jų išvestų jų medicininių formų panaudojimu imunoterapiniais agentais arba imunoprofilaktiniais agentais streso metafilaksijai, norint apsisaugoti arba norint išvengti po streso (pvz. operacijos) pasitaikančių ligų; su jų panaudojimu infekcijos profilaktikai, norint apsisaugoti arba norint išvengti infekcinių ligų, skiriant juos prieš operacijas arba intervencijas (pvz. prieš protezų implantavimą arba prieš dantų taisymą); su jų panaudojimu infekcijų metafilaksijai arba ūmių arba chroniškų virusinių infekcijų, pavyzdžiui, kvėpavimo trakto, papilomos viruso infekcijų, herpeso viruso infekcijos, ŽIV infekcijos ir vidaus organų infekcijos, kaip antai hepatito viruso infekcijos, gydymui; su jų panaudojimu žaizdų gydymui, norint pagreitinti žaizdų gijimo procesus; ir su jų panaudojimu žaizdų, kurios blogai gyja arba visai negyja (pvz. kojos opa) gijimui palaikyti; su jų panaudojimu gydyti ligoms, tokioms kaip išsėtinė sklerozė, astma, karpos ir kiti odos augliai; su jų panaudojimu alerginių ligų spektro ligų gydymui; su jų panaudojimu sisteminių alergijų priepuoliui sulaikyti, su jų panaudojimu vietinėms alergijoms stabdyti ir su jų panaudojimu sveikatos stoviui pagerinti, pavyzdžiui, pagyvenusiems pacientams; o šio išradimo kontekste naudojami avies pararaupų viruso kamienai yra NZ2, NZ-7, NZ-10 ir orf-11.

Taip pat galima naudoti šių kamienų palikuonis, kurie buvo gauti persėjant ir/arba adaptuojant prie tam tikrų ląstelių, pavyzdžiui, WI-38, MRC-5 arba Vero ląstelių, arba virusų iš šių kamienų arba jų palikuonių fragmentus arba dalis. Dalimis yra laikomi genominiai arba subgenominiai fragmentai, kurie yra ekspresuojami tam tikrų vektorių, pavyzdžiui, vakcinijos, pagalba tinkamose sistemose, pavyzdžiui, fibroblastų ląstelių kultūrose. Fragmentais

yra laikomos frakcijos, kurios gaunamos biochemiškai gryninant, pavyzdžiui, chromatografijos būdu, daleles, kurios buvo fiziškai suardytos, pavyzdžiui, ultragarsu.

Be to, šis išradimas yra susijęs su minėtų avies pararaupų viruso kamienų panaudojimu vaistų ir farmacinių preparatų gamyboje. Apart to, šis išradimas yra susijęs su minėtų avies pararaupų viruso kamienų panaudojimu, derinyje su kitais vaistais, vaistų ir farmacinių preparatų priešvirusinei terapijai arba vėžio terapijai gamyboje.

Žinoma, kad latentines ir chroniškai pasireiškiančias virusines infekcijas gali aktyvuoti arba reaktyvuoti imunosupresija arba, atvirkščiai, kad imuninė sistema slopina ūmią ligą, kurią galėjo sukelti virusas, kuris yra latentinis (pvz. latentinė herpeso viruso infekcija pasikartoja ryšium su imunoslopinimu: pūslelės ant lūpų ryšium su stresu arba kortizono vartojimu). Taip pat yra žinoma, kad chroniškai pasireiškiančias ir latentines virusines infekcijas yra sunku ar netgi neįmanoma gydyti naudojant įprastas priešvirusines mažos molekulinės masės medžiagas.

To priežastis gali būti nebuvimas virusinio fermentinio aktyvumo susijusio su tokiomis infekcijomis (pavyzdžiui, nebuvimas virusinio polimerazinio aktyvumo, kuris pirmiausia turi įterpti nukleozidinį inhibitorių į virusinę nukleorūgštį taip, kad šis inhibitorius, pavyzdžiui, gali sukelti virusinės DNR grandinės nutraukimą; pavyzdžiui, nebuvimas virusinės timidinkinazės aktyvumo, kuri pirmiausia, pavyzdžiui, turi fosforilinti priešvirusinį junginį taip, kad šis junginys galėtų pasidaryti aktyvus) arba taip pat šeimininko imuninė sistema negali atpažinti infekuotų arba išsigimusių ląstelių, pavyzdžiui, vėžinių ląstelių arba virusinių antigenų.

Taip pat yra žinoma, kad kartu su chroniškai pasireiškiančiomis virusinėmis infekcijomis superinfekcija kitu virusu gali sukelti priešvirusinius efektus, kurie yra nukreipti prieš chroniškai pasireiškiantį virusą (Guidotti, L.G., Borrow, P., Hobbs, M.V., Matzke, B., Gresser, I., Gidstone, M.B.A., and Chisari, F.V. (1996): Viral cross talk: Intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:4589-4594). Autoriai galėjo parodyti šį poveikį interferonų, tokių kaip

IFN- γ ir TFN- α , atveju, kuriuos išskiria T-ląstelės – gamtinės ląstelės-kileriai ir makrofagai.

Šių autorių gautas rezultatas patvirtina kitą, ankstesnį tyrimą, kuris parodė, kad I klasės restriktuotos citotoksinės T ląstelės gali inhibuoti hepatoląstelinio HBV geno ekspresiją HBV-trasgeninėse pelėse, kad šis procesas vyksta be kepenų ląstelių destruktijos ir kad šį procesą iššaukia TFN- α ir IFN- γ (Guidotti, L.G., Ando, K., Hobbs, M.V., Ishikawa, T., Runkel, L., Schreiber, R.D., and Chisari, F.V. (1994): Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:3764-3768.)

Produktas "paraspecifiniam imuniškumui" sukelti, t.y. toks, kuris vadinamas paraimuniniu induktoriumi, buvo naudotas terapiškai, metafilaktiškai ir profilaktiškai veterinarijos praktikoje gana ilgą laiką. Paraimuniniai induktoriai susideda, pavyzdžiui, iš chemiškai inaktyvuotų avies pararaupų virusų (D 1701 kaminenas) (DE 3 504 940). Šio viruso (avies pararaupų virusas, D 1701 kamienas) pagrindu pagamintas produktas yra BAYPAMUN®.

Gyvūnams inaktyvuotas pararaupų virusas indukuoja nespecifinę apsaugą nuo infekcijos, kurią sukelia daugybė patogenų. Manoma, kad šioje apsaugoje tarpininkauja įvairūs mechanizmai, sudarantys dalį endogeninės apsaugos sistemos.

[Šiuos mechanizmus įeina interferono indukcija, gamtinių ląstelių-kilerių aktyvavimas, "telkinio stimuliavimo aktyvumo" (CSA) indukavimas ir limfocitų proliferacijos stimuliavimas. Ankstesni veikimo mechanizmo tyrimai parodė interleukino 2 ir α -interferono stimuliacinį poveikį (Steinmassl G., G. Wolf (1990): Bildung von Interleukin 2 und Interferon- durch mononukleäre Leukozyten des Schweines nach in vitro-Stimulation mit verschiedenen Viruspräparaten. *J. Vet. Med.* B37, 5, 321-331.)

Remiantis šiais duomenimis atsiranda tikslas dar labiau pagerinti puikaus avies pararaupų viruso efekto terapinį naudingumą taip, kad būtų galima kokybiškai padidinti aukščiau aprašytą apibendrintą avies pararaupų viruso D 1701 kamieno paraspecifinę indukciją ir ją pagerinti taip, kad būtų pasiektas geresnis priešvirusinis arba priešvėžinis poveikis naudojant

mažesnes dozes. Tada galima laukti, kad terapinis poveikis turės mažiau šalutinių efektų.

Todėl šio išradimo tikslas buvo pagerinti pararaupų viruso imunologinį efektą. Šis tikslas buvo pasiektas naudojant aukščiau minėtus pararaupų viruso kamienus vietoj paprastai naudojamo D1701 kamieno.

Šis išradimas yra susijęs su virusų, kurie taksonomiškai priklauso vienam iš avies pararaupų viruso kamienų NZ2, NZ-7, NZ-10 arba orf-11, panaudojimu vaistų prieš žmonių ir gyvūnų virusines infekcijas ir vėžį gamyboje.

Be to, šis išradimas yra susijęs su šio išradimo kamienų palikuonių panaudojimu, kur palikuonys yra gaunami persėjant arba adaptuojant prie tinkamų ląstelių sistemų, pavyzdžiui, žmogaus ląstelių, tokių kaip WI-38, MRC-5, beždžionės ląstelių, pvz. Vero ląstelių, jaučio ląstelių, tokių kaip BK-K13A47/Reg arba MDBK, ir avies ląstelių, tokių kaip MDOK, vaistų prieš žmonių ir gyvūnų virusines infekcijas ir vėžį gamyboje ir taip pat yra susijęs su minėtų kamienų ir jų palikuonių bei adaptuotų variantų dalių arba fragmentų, kur dalimis yra laikomi genominiai arba subgenominiai fragmentai, kurie yra ekspresuojami tam tikrų vektorių, tokių kaip vakcinijos virusai, pagalba tinkamose sistemose, kaip antai fibroblastų ląstelių kultūrose, o fragmentais yra laikomos frakcijos, kurios gaunamos biochemiškai gryninant, pavyzdžiui, chromatografijos būdu, ekspresuotas arba fiziškai suardytas daleles, panaudojimu vaistų prieš žmonių ir gyvūnų virusines infekcijas ir vėžį gamyboje, ir taip pat yra susijęs su vieno iš avies pararaupų viruso kamienų ir darinių, kurie yra išvesti aukščiau aprašytu būdu, panaudojimu vaistų ir farmacinių preparatų, kaip imunoterapinių agentų arba imunoprolifaktinių agentų autoimuninėms ligoms ir ūmioms ir chroniškoms kvėpavimo trakto ir vidaus organų virusinėms infekcijoms, gamyboje, ir taip pat yra susijęs su vieno iš kamienų ir išvestinių darinių panaudojimu vaistų ir farmacinių preparatų streso metafilaksijai ir prevencijai arba apsaugai nuo infekcinių ligų po streso ir taip pat ryšium su infekcijos profilaktika operacijų ir dantų taisymo kontekste, gamyboje, ir taip pat yra susijęs su vieno iš kamienų ir išvestinių darinių panaudojimu vaistų ir farmacinių preparatų, skirtų infekcijos metafilaksijai arba ūmių ir chroniškų virusinių infekcijų, pavyzdžiui, kvėpavimo trakto, papilomos viruso infekcijų, herpeso grupės viruso infekcijų, ŽIV

infekcijų arba vidaus organų virusinių infekcijų, tokių kaip infekcija hepatito virusais, gydymui, gamyboje, ir taip pat yra susijęs su panaudojimu ryšium su ligomis, tokiomis kaip išsėtinė sklerozė, astma, karpos ir kiti odos augliai, ir taip pat yra susijęs su vieno iš kamienų ir išvestinių darinių panaudojimu vaistų ir farmacinių preparatų, skirtų dėti ant žaizdų gijimo procesams pagreittinti ir palaikyti žaizdų gijimui, kurios blogai gyja arba išvis negyja, ir kojos opoms gydyti, gamyboje, ir taip pat vieno iš kamienų ir išvestinių darinių panaudojimu vaistų ir farmacinių preparatų, skirtų alerginių ligų spektro ligoms, psoriazei, neurodermatitui ir kitoms autoimuninėms ligoms, tokioms kaip raudonoji vilkligė, gydymui ir taip pat sveikatos stovio pagerinimui, pavyzdžiui, pagyvenusiems pacientams, gamyboje, ir taip pat yra susijęs su vieno iš kamienų ir išvestinių darinių panaudojimu vaistų ir farmacinių preparatų, skirtų panaudoti prieš uždegimines, degeneracines ir proliferacines vidaus organų ligas, pavyzdžiui, Krono ligą, odos ligas, kraujo ligas, centrinės nervų sistemos ir jos pridėtinių struktūrų ligas, įskaitant akis, įskaitant vėžį, gamyboje, ir taip pat yra susijęs su vieno iš kamienų ir išvestinių darinių panaudojimu deriniuose su kitais vaistais, vaistų ir farmacinių preparatų, skirtų žmonių ir gyvūnų priešvirusinei terapijai arba vėžio terapijai, gamyboje.

Labiausiai šis išradimas yra susijęs su vienu iš avies pararaupų viruso kamienų panaudojimu derinyje su kitais vaistais, vaistų ir farmacinių preparatų peroraliniam vartojimui ir/arba skrandžio sultims atsparių kompozicijų gamyboje.

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.

Kaip pavyzdys buvo atrasti tokie reiškiniai:

1. **Terapinio aktyvumo parodymas bandyme su hepatito B virusa turinčiomis transgeninėmis pelėmis**

“Mintį pagrindžiančiame” eksperimente buvo naudojamos hepatito B virusą turinčios transgeninės pelės (HBV 1.3 X'tg kamienas). Vienoje grupėje

buvo naudojami 7 nuo 8 iki 10 savaičių amžiaus patinėliai. Pirmą dieną (eksperimento pradžioje) ir 4-tą dieną buvo suleistos įvairios dozės į pilvą 0,15 ml tūryje.

Atskirų dozių įvedimui į grupes buvo pagamintos tokios kiekvieno viruso kamieno koncentracijos:

1 dozė	$1,5 \times 10^6$ TCID ₅₀
2 dozė	5×10^5 TCID ₅₀
3 dozė	$1,5 \times 10^5$ TCID ₅₀
4 dozė	5×10^4 TCID ₅₀

Sterilus, neturintis pirogenų PBS buvo naudojamas kaip placebo kontrolė.

Virusai buvo sukonzentruoti tokiu būdu: 500 ml nuopilo, gauto iš avies pararaupų viruso NZ2 kamieno (titras maždaug 2×10^5 TCID₅₀/ml) ir avies pararaupų viruso D1701 kamieno (titras 1×10^7 TCID₅₀/ml) titrai buvo suvienodinti. Šiam tikslui buvo panaudota Beckmano ultracentrifuga (SW28 rotorius, 28000 aps./min., 4 °C temp. 3 val.). Nucentrifugavus nuosėdos buvo praskiestos iki 1×10^7 TCID₅₀/ml titro, naudojant atitinkamus praskiedimo terpės tūrius.

Atitinkamų dozių alikvotos buvo panaudotos patikrinimui atvirkštinio titravimo būdu, kuris patvirtino šiuos dozių titrus. Patikrinus, alikvotos buvo perkeltos, atitinkamos dozės buvo inaktyvuotos 56 °C temperatūroje 1 val.

Skiedimo terpė: 10 ml EMEM 10x

2,7 ml 2 g/l rūgščiojo karbonato

1 ml 1 % glutamino

86,3 ml du kartus distiliuoto vandens

Penktą dieną gyvūnai buvo neskausmingai numarinti, išimtos kepenys ir paimta kraujo. Maždaug 20 mg kepenų iš kiekvieno gyvūno buvo apdorota naudojant QIAmp audinių rinkinį (Quiagen, Hilden), fotometriškai nustatyta DNR koncentracija, o jos vientisumas buvo patikrintas elektroforezės būdu 1 % agarozės gelyje. Ši DNR buvo hibridizuota su HBV-specifiniu zondų taškinių blotų hibridizacijos metodu. Norint išvengti RNR sukeltų signalų, prieš tai DNR buvo paveikta RNRaze A (Qiagen, Hilden). 200 µl DNR (10 µg) buvo uždėta ant nailono membranos (Boehringer Mannheim) ir buvo paveikta 4

kartus (kiekvieną atvejų 3 min.) Soak I (0,5 N NaOH; 1M NaCl) ir du kartus Soak II (3M NaCl; 0,5 M tris-HCl, pH 7,4); tada DNR buvo kepinama 120 °C temperatūroje pusę valandos ir po to prehibridizuota 60 °C temperatūroje 30 min. su standartiniu hibridizavimo buferiu (5xSSC, N-lauroilsarkozinas, 0,1 masės/tūrio %; SDS, 0,02 %; blokavimo reagentas, 1x ir 100 µg žuvies spermos DNR/ml), kuriame nėra zondo. Po šios stadijos DNR buvo hibridizuota su atsitiktiniu nukleotidu primuotu zonu, turinčiu visą HBV genomą (20-40 ng/ml hibridizavimo buferio). po to filtras buvo plaunamas 64 °C temperatūroje 10 min. 4xSSC/0,1%SDS, 2xSSC/0,1%SDS ir 1xSSC/0,1%SDS.

Imunologinis detektavimas buvo vykdomas naudojant CDP-Star® sistemą (Boehringer Mannheim) pagal gamintojo instrukcijas. [vertinimui buvo naudojamas Lumilmager® (Boehringer Mannheim). HBV-specifinės DNR kiekis kraujyje buvo nustatytas kiekybinės PGS metodu. Pirmiausia, centrifuguojant EDTA kraują, buvo išskirta plazma. DNR buvo išgryninta naudojant HighPure 16 System Viral Nucleic Acid rinkinį (Boehringer Mannheim) ir panaudojant kiekybinę PGS, ištirta su ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems), nustatant HBV-specifinius signalus. Buvo naudoti tokie pradmenys ir zondai:

ayw-570f (prasminis) 5'-CTGTACCAAACCTTCGGACGG-3'

ayw-670r (antiprasminis) 5'-AGGAGAAACGGGCTGAGGC-3'

Zondas:

ayw-613t 5'-CCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATT-3'

DNR buvo amplifikuota 50 µl reakcijos tūryje (reakcijos mišinyje buvo 1,4 mM kiekvieno dNTP, 4,75 mM MgCl₂, 15 pmol kiekvieno pradmens ir zondo, 5 µl 10x PGS buferio (visi PGS reagentai pagaminti iš TaqMan pagrindinio reagentų rinkinio; Perkin Elmer/Roche Molecular Systems Inc.) ir 1,25 U Taq DNR polimerazės ir 0,25 U AmpErazės). Po pradinės denatūracijos stadijos (10 min. 95 °C temperatūroje) mėginiai buvo paleisti į 40 ciklų denatūraciją (95 °C, 30 sek.) ir atleidimą/išplėtimą (56 °C, 1 min.). Produktai buvo analizuojami naudojant ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System standartinę programą.

Histocheminė analizė buvo vykdoma naudojant antikūnus prieš hepatito B viruso šerdies antigeną (Dako). Šiam tikslui vienos kepenų skilties dalys buvo fiksuotos per naktį 4 % formaldehyde, įtvirtintos parafine ir supjaustytos (5 μ m). Pašalinus parafiną ir rehidratavus, naudojant H₂O₂ 20 minučių buvo stabdomas endogeninės perosidazės aktyvumas. Nespecifinis surišimas buvo blokuojamas normaliu avies serumu. Po to nuopjovos buvo inkubuojamos kambario temperatūroje 30 minučių su antikūnu, kuris buvo praskiestas 1:500. Visos tolimesnės stadijos buvo vykdomos naudojant Vectastain ABC rinkinį (Vector Laboratories) pagal gamintojo aprašymą.

Imuninė reakcija buvo išryškinta naudojant 3,3'-diaminobenzidino tetrachloridą ir vandenilio peroksida. Nuopjovos buvo kontrastiškai nudažytos hematoksilinu/eozinu.

Rezultatai buvo statistiškai analizuoti variacinės analizės būdu ir post hoc palyginimu.

Rezumuojant, netikėtai buvo rasta, kad kai yra naudojamas NZ2 kamienas, yra pasiekiamas priešvirusinio poveikio sustiprinimas, lyginant su poveikiu, gautu su žinomu avies pararaupų viruso D 1701 kamieniu. Tai duoda galimybę pirmą kartą panaudoti avies pararaupų virusą sudėtingam imuninės sistemos sugebėjimui indukuoti tokiu intensyvumu, kuris labai skiriasi nuo efekto intensyvumo, pasiekto su anksčiau žinomais paraimuniškumo induktoriais.

Netikėtai buvo gauti tokie rezultatai:

Kepenys: Buvo pastebėta žymiai didesnis HBV specifinės DNR sumažėjimas gyvūnuose, paveiktuose NZ2, lyginant su gyvūnais, paveiktais D 1701. Priešvirusinis NZ2 aktyvumas yra stipresnis nei D 1701: didesnės dozės grupėje NZ2 įvedimas sumažina HBV-specifinę DNR daugiau nei 45 kartus efektyviau, nei to paties kiekio D 1701 įvedimas, o mažiausios dozės grupėje jis sumažina ją 57 kartus efektyviau. Plazmoje mažiausios dozės grupėje NZ2 įvedimas sumažina HBV-specifinę DNR daugiau nei 10 kartus efektyviau, nei to paties kiekio D 1701 įvedimas. Tai rodo, kad avies pararaupų viruso NZ2 kamienas yra daug pranašesnis už D 1701 kamieną.

Figūrose yra parodytas HBV-specifinių signalų sumažėjimas lyginant su placebo grupe (ji prilyginta 100 %).

Fig.1 rodo D1701 arba NZ2 poveikio į HBV-transgenines peles rezultatus. Nors HBV-specifinė DNR yra žymiai sumažinta kepenyse, lyginant su placebo grupe, naudojant abu kamienus visose dozių grupėse, sumažėjimas yra didesnis, kai yra naudojamas NZ2 kamienas. Abiejų žemiausių NZ2 dozių atveju HBV-specifinės DNR sumažėjimas yra daug didesnis nei ekvivalentinių D 1701 dozės grupių atveju.

Fig.2 rodo rezultatus, gautus plazmoje, veikiant HBV-transgenines peles D 1701 arba NZ2 kamieniu. Nors HBV-specifinė DNR yra žymiai sumažinta plazmoje, lyginant su placebo grupe, naudojant abu kamienus visose dozių grupėse, sumažėjimas yra didesnis, kai yra naudojamas NZ2 kamienas. Priešingai mažiausiai NZ2 dozei, mažiausia D 1701 kamieno dozė nebeturi žymaus priešvirusinio poveikio.

2. Citokinių indukavimas:

Septynių-aštuonių savaičių amžiaus Balb/c pelių patelės buvo laikomos steriliomis sąlygomis ir naudojamos eksperimente. Gyvūnai buvo atsitiktinai pasiskirstyti grupėmis po 6 gyvūnus. Buvo naudojama tokia poveikio schema:

- 1 grupė: Placebas
- 2 grupė: Avies pararaupų viruso D 1701 kamienas; 5×10^4 TCID₅₀/dozė
- 3 grupė: Avies pararaupų viruso NZ2 kamienas; 5×10^4 TCID₅₀/dozė
- 4 grupė: Placebas
- 5 grupė: Avies pararaupų viruso D 1701 kamienas; 5×10^4 TCID₅₀/dozė
- 6 grupė: Avies pararaupų viruso NZ2 kamienas; 5×10^4 TCID₅₀/dozė

Įvedamas kiekis buvo 10 ml/kg, įvedama intraperitoniniu būdu.

1-3 grupės gyvūnai buvo numarinti praėjus 6 valandoms po įvedimo, o 4-6 grupių gyvūnai – praėjus 12 valandų po įvedimo; pilvaplėvės ląstelės buvo gautos plovimo būdu, naudojant ledo temperatūros PBS, ir buvo išimti vartų ir pasaitinis limfmazgiai.

Pilvaplėvės ląstelės buvo sukonzentruotos centrifuguojavimo stadijoje (5 min. esant 3000 aps./min. ir kambario temperatūroje Eppendorf'o staline centrifuga) ir po to ištirpinant 0,2 ml lizavimo buferio (lizavimo tirpalas: 25 mM natrio citrato, 4 M guanidinio izotiocianato, 0,5 % N-lauroilsarkozino), staigiai sušaldomos ir laikomos -75 °C temperatūroje iki RNR paruošimo laiko.

Visa RNR buvo paruošta panaudojant rūgštinę fenolio/chloroformo ekstrakciją. Šiam tikslui užšaldyti lizavimo buferyje mėginiai buvo atšildyti kambario temperatūroje ir paveikti ekstrakcijai tokiais tirpalais: 2 M natrio acetato 1/10 lizavimo buferio tūrio (pH 4,0), vandenyje prisotinto fenolio 1 lizavimo buferio tūriu ir chloroformo/izoamilio alkoholio (24:1) 1/5 lizavimo buferio tūrio. Šie ingredientai buvo maišyti maišykle 10 sekundžių ir tada suvienodintos jų temperatūros palaikant 10 minučių leduose. Fazės buvo atskirtos centrifuguojant, esant 15365 g ir 4 °C, 30 minučių. Po to vandeningą fazę buvo perkelta į naują indą ir, norint išskirti šioje fazėje esančią RNR, pridėta 8 ml RNA-MATRIX iš Rnaid™ plius rinkinio (DIANOVA) ir visas mišinys inkubuotas kambario temperatūroje 15 minučių. Gautas RNR/RNA-MATRIX kompleksas buvo suspaustas centrifuguojant esant 7000g, o nuopilas išpiltas. Po to suspaustos nuosėdos buvo plautos 2 x po 250 ml RNA-WASH (DIANOVA) ir po paskutinio plovimo išdžiovintos vakuminio centrifugavimo būdu. RNR buvo eliuuota pridėdant 20-30 ml neturinčio RNAzės distiliuoto vandens ir kaitinant visumą 55 °C temperatūroje 15 minučių. Po centrifugavimo, esant 7000 g, kambario temperatūroje 1 min. matrica buvo atskirta perpilant RNR tirpalą į naują indą.

RNR kokybė buvo tikrinta gel-elektroforezės metodu. RNR buvo laikoma -70 °C temperatūroje.

kDNR buvo sintezuota atvirkščiai transkribuojant iRNR naudojant oligo(dT) pradmenis kaip startines molekules polimerizacijai. Sintezės mišinyje buvo tokios komponentės: 200 ng-2 µg pilnos RNR, 2 µl M-MLV atvirkštinės transkriptazės (200 U/µl) (GIBCO/BRL), 8 µl tinkamo 5xRT buferio (GIBCO/BRL), 1 µl DTT (0,1 M) (GIBCO/BRL), 4 µl dNTP (2,5 mM) (SIGMA), 2 µl oligo(dT)₁₂₋₁₈ pradmens (100 µg/m;) (PROMEGA), 1 µl žmogaus placentinės RNAzės inhibitoriaus (10000 U/ml) (GIBCO/BRL) ir vandens iki 40 µl bendro tūrio. Mišinys buvo laikomas kambario temperatūroje 10 minučių ir po to inkubuojamas 37 °C temperatūroje 45 minutes; po to jis buvo kaitintas 95 °C temperatūroje 3 minutes ir tuoj pat atšaldytas ledu. Šiuo būdu susintetinta kDNR buvo laikoma -20 °C temperatūroje.

kDNR kiekiai buvo standartizuoti naudojant "namudinį" geną (β -aktiną). Kiekybinė PGS buvo vykdoma naudojant ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems). Buvo naudoti tokie pradmenys:

β -aktinas	prasminis:	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'
	antiprasminis:	5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'
γ -IFN	prasminis:	5'-AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG-3'
	antiprasminis:	5'-GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG-3'
α -TFN	prasminis:	5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C-3'
	antiprasminis:	5'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G-3'
IL-15	prasminis:	5'-GCC AAC TGG ATA GAT GTA AGA TAT GAC CT-3'
	antiprasminis:	5'-CGT GTT GAT GAA CAT TTG GAC AAT GCG TAT-3'

DNR buvo amplifikuota 25 μ l reakcijos tūryje (reakcijos mišinyje buvo 1,4 mM kiekvieno dNTP, 4 mM $MgCl_2$, 0,3 μ mol kiekvieno pradmens ir zondo, 2,5 μ l 10x PGS buferio, turinčio SYBR Green (visi PCR reagentai pagaminti iš SYBR Green PCR pagrindinio reagentų rinkinio; Perkin Elmer/Roche Molecular Systems Inc.) ir 1,25 U Taq DNR polimerazės ir 0,25 U AmpErazės). Po pradinės denatūracijos stadijos (10 min. 95 °C temperatūroje) mėginiai buvo paleisti į 40 ciklų denatūraciją (95 °C, 30 sek.) ir atleidimą/išplėtimą (60 °C, 1,30 min.). Produktai buvo analizuojami naudojant ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System standartinę programą. Rezultatai buvo analizuojami statistiškai, panaudojant variacinę analizę ir post hoc palyginimą.

Netikėtai buvo gauti tokie rezultatai:

1. Paveikus D 1707 arba NZ2 kamienu, γ -interferono ekspresija yra indukuota ir po 6, ir po 12 val. nuo įvedimo (Fig.3). NZ2 kamieno atveju ši indukcija yra žymiai didesnė ir lyginant su placebo, ir lyginant su D 1701 kamienu. γ -Interferono ekspresijos dydis, kuris yra stebimas po D

1701 įvedimo, nedaug skiriasi nuo placebo kontrolės dydžio. Ši figūra rodo reikšmes, kurios buvo išmatuotos ląstelėse, gautose iš pilvaplėvės plovimo.

2. Paveikus D 1707 kamienų, α -TNF ekspresija yra indukuota po 12 val. nuo įvedimo, o paveikus NZ2 kamienų ji yra indukuota ir po 6, ir po 12 val. nuo įvedimo (po 12 val. jau buvo galima stebėti sumažėjimą lyginant su 6 val. reikšme; Fig.4). NZ2 kamieno atveju ši indukcija po 6 val. nuo įvedimo yra žymiai didesnė nei D 1701 kamieno atveju. Ši figūra rodo reikšmes, kurios buvo išmatuotos ląstelėse, gautose iš pilvaplėvės plovimo.
3. Paveikus D 1707 arba NZ2 kamienų, IL-15 ekspresija yra indukuota ir po 6, ir po 12 val. nuo įvedimo (Fig.5). NZ2 kamieno atveju ši indukcija yra žymiai didesnė po 6 val. nuo įvedimo nei D 1701 kamieno arba placebo atveju. IL-15 ekspresijos dydis, kuris yra stebimas po D 1701 įvedimo, nedaug skiriasi nuo placebo kontrolės dydžio. Ši figūra rodo reikšmes, kurios buvo išmatuotos ląstelėse, gautose iš pilvaplėvės plovimo.

3. Terapinio poveikio parodymas bandyme su augli turinčiomis beplaukėmis pelėmis

MDA-MB231 ląstelės (ATCC#TB26) buvo auginamos 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂, pilnoje terpėje (88,5 % DMEM, 10 % PBS, 1 % penicilino/streptomicino, 1 % L-glutamino (kiekvienų atveju Gibco Life Technologies) inkubatoriuje. Transplantacijos dieną ląstelės buvo maždaug 70 % susiliejusios. Ląstelės buvo tripsinizuotos, perplautos HBSS, suskaičiuotos ir praskiestos iki $2,5 \times 10^7$ ląstelių/ml, naudojant prieš tai atšaldytą PBS. Buvo naudotos NCr beplaukių pelių (takoninių) patelės. Pelės buvo tarp 8 ir 10 savaičių amžiaus ir svėrė maždaug 22 g. Visos manipuliacijos su gyvūnais buvo atliekamos steriliose sąlygose. Po oda į šoną buvo suleista 5×10^6 ląstelių bendrame 0,2 ml tūryje. Po to pelės buvo laikomos dar 7 dienas, kol augliai pasiekė maždaug 80 mg vidutinę masę.

Augliai buvo išmatuoti ir pelės buvo atsitiktinai paskirstytos į tris grupes po 10 gyvūnų. Atskiroms grupėms buvo įvesta:

- 1 grupei: placebo (PBS)
- 2 grupei: avies pararaupų virusas, D1701 kamienas
- 3 grupei: avies pararaupų virusas, NZ2 kamienas.

Buvo įvesta D 1701 $2,5 \times 10^5$ TCID₅₀ dozė, ir NZ2 1×10^5 TCID₅₀ dozė; šios dozės buvo kiekvienu atveju įvestos keturis kartus kas trys dienos. Augliai buvo matuojami du kartus per savaitę. Rezultatų reikšmingumai buvo nustatomi naudojant Stjudento testą.

Fig.6 rodo vidutinį auglių dydį (miligramais) gyvūnuose, priklausančiuose 1-3 grupėms eksperimento laikotarpiu (dienomis).

(Simboliai: 1 grupė – apskritimai, 2 grupė – trikampiai, 3 grupė – kvadratai).

Šioje eksperimentinėje sistemoje, lyginat su kontroline grupe, netikėtai buvo rastas prieš auglius nukreiptas aktyvumas, kuris buvo reikšmingas ($p < 0,05$). Buvo rasta, kad šiuo požiūriu NZ2 kamienas yra žymiai veiksmingesnis nei D 1701 kamienas. Norint pasiekti tą patį poveikį, buvo reikalinga tik pusė kiekio NZ2, lyginant su D 1701.

Šis faktas pateikia aiškų šio išradimo virusinių preparatų terapinio poveikio įrodymą bandyme su auglių turinčiomis beplaukėmis pelėmis.

Beplaukės pelės yra imunodeficitinės ir neturi jokių funkcinių T ląstelių. Šioje eksperimentinėje sistemoje aktyvumas, kuris yra nukreiptas prieš auglius, tikriausiai yra dėl natūralių ląstelių-kilerių (NK), dėl kitų ląstelių ir dėl tiesioginio citokinų/chemokinų poveikio. Galima laukti, kad didesnis NZ2 efektyvumas turėtų būti dar labiau išreikštas imuninės sistemos, kuri yra pilna ir nepaliesta, atveju.

4. Kiti biologiniai skirtumai tarp NZ2 ir D1701

Buvo rasta, kad priešingai nei D1701, avies pararaupų NZ2 virusas gali būti pastoviai persėjamas į žmogaus ląstelių linijas. Tai rodo esminius skirtumus tarp NZ2 ir D1701 replikacijos elgsenos ir/arba virusiniuose receptoriuose.

Adaptacija prie žmogaus ląstelių linijų yra būtina sąlyga virusinių kamienų produkavimui žmogaus ląstelių linijose.

4. a) Galimybė nuolat persėti į žmogaus MCR-5 ląsteles

Fig.7 pavaizduotas mėginimas adaptuoti NZ2 ir D1701 prie žmogaus diploidinės MRC-5 ląstelių linijos. MCR-8 yra tinkamos biologiškai aktyviems junginiams ir vakcinoms produkuoti. Abiems kamienams buvo naudojamas tas pats pradinis titras ir atitinkami ląstelių kultūros nuopilai buvo pastoviai naudojami per 5 persėjimus MRC-5 ląstelėse. Figūra rodo mėginių iš MRC-5 ląstelių nuopilų, kurie buvo kiekvienu atveju infekuoti, titro (išreikšto TCID₅₀) priklausomybę nuo persėjimų skaičiaus. Tik NZ2 kamienas buvo vėl titruotinas jaučio inkstų kultūrose (BK 3a klonas). Tai rodo, kad yra esminiai biologiniai skirtumai tarp abiejų kamienų infekavimo ir replikacijos elgsenos. Tuo pačiu metu šis rezultatas rodo, kad NZ2 gali būti replikuotas platesniame ląstelių spektre nei D1701, tokiu būdu duodantis galimybę produkcijos procesui, kuris remiasi žmogaus ląstelėmis.

4. b) Galimybė perkelti NZ2 ir D1701 į WI-38 ląsteles ir BK kloną 3a ląsteles

Esminiai biologiniai skirtumai tarp NZ2 ir D1701 kamienų taip pat yra aiškiai parodyti Fig.8 ir Fig.9 parodytuose eksperimentuose. Fig. 8 rodo viruso titro, gauto bandant persėti D1701 į jaučio BK 3a kloną ląsteles ir žmogaus WI-38 ląsteles, priklausomybę nuo persėjimų skaičiaus. Galima matyti, kad D 1701 gali būti nuolat persėjamas į BK 3a kloną ląsteles, bet negali būti persėjamas į žmogaus WI-38 ląsteles.

Skirtinga padėtis yra su NZ2 kamieniu. Šis kamienas gali būti nuolat per keletą dienų persėjamas ir į BK 3a kloną ląsteles, ir į žmogaus WI-38 ląsteles (Fig. 9).

Šie rezultatai taip pat aiškiai rodo NZ2 ir D 1701 replikacijos ir infekavimo elgsenos skirtumus.

4. c) NZ2 nuo dozės priklausantis poveikis į herpeso viruso iššaukimo testą po persėjimo į WI-38

Norint ištirti NZ2 kamienų, kurie buvo persėti į WI-38 ląsteles, imunostimuliacines savybes buvo atlikti herpeso viruso iššaukimo testai bandyme su pelėmis. Trys grupės po 10 eksperimentinių gyvūnų buvo veikiamos atitinkamai 1×10^4 TCID₅₀, 5×10^4 TCID₅₀ ir 1×10^5 TCID₅₀, o kontrolinei grupei buvo duotas placebo. Fig.10 rodo šių keturių eksperimentinių grupių išgyvenimo procentų priklausomybę nuo laiko po infekcijos herpeso virusu. Netikėtai buvo rasta, kad NZ2 nepraranda savo imunostimuliacinių savybių persėjus į WI-38 ląsteles.

Visi šio pavyzdžio eksperimentiniai rezultatai rodo esminius biologinius skirtumus tarp NZ2 ir D1701 infekavimo ir replikacijos elgsenos. Netikėtai buvo rasta, kad priešingai D1701, NZ2 preparatas, skirtas naudoti kaip imunomodulatorius, nėra surištas su jaučio inkstų ląstelių, kaip produkavimo ląstelių linijos, naudojimu.

Remiantis žinomomis Th1 imuninio atsako įtakos į latentines ir chroniškai pastovias virusines infekcijas (P. Lucin, S. Jonjic, M. Messerle, B. Polic, H. Hengel, U.H. Koszinowski (1994): Late-Phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *J. Gen. Virol.* 75:101-110; P.M.; ir Smith, R.M. Volcott, R. Chervenak, S.R. Jennings (1994): Control of acute cutaneous herpes-simplex virus-infection – T-cell mediated viral clearance is dependent upon interferon gamma. *Virology* 202 (1):76-88) ir taip pat proliferacines ligas, pvz. vėžį (J.F. Bromberg, C.M. Horvath, Z.L. Wen, R.D. Schreiber, J.E. Darnell (1996): Transcriptionally active stat 1 is required for antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *PNAS* 93(15):7673-7678; ir M. Klouche, H. Kirchner, F. Holzel (1994): Antiproliferative effects of interferon gamma in combination with alpha-difluoromethylornithine on human carcinoma cell cultures. *J. Cancer Research and Clinical Oncology* 120(12):706) galimybėmis, o taip pat ir tuo, kad avies pararaupų viruso NZ2 kamienas yra geresnis nei avies pararaupų D1701 kamienas, yra galimas imunomoduliatorių avies pararaupų viruso NZ2 kamieno arba vieno iš aukščiau minėtų kamienų pagrindu panaudojimas kaip monoterapija arba derinyje su biologiškai aktyviais, pvz. priešvirusiniais, mažos molekulinės masės junginiais žmonėms ir gyvūnams gydyti kaip hepatito B viruso arba

hepatito C viruso arba bet kurio kito patogeno iš hepatitą sukeliančių virusų grupės, bei kitų vidaus organų virusinių infekcijų, o taip pat infekcijų, lydinčių kitas ligas, įvairių tipų paprastojo herpeso infekcijų (HSV), įvairių tipų žmogaus papilomos virusų (HPV), žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV), juostinės varicelės viruso, žmogaus citomegaloviruso (HCMV) ir atitinkamų gyvūnų virusinių ligų priešvirusinė terapija.

Be to, remiantis pademonstruotu veikimo mechanizmu aukščiau minėti avies pararaupų viruso kamienai su tam tikra sėkmės perspektyva gali būti naudojami vykdant profilaktiką arba ypatingai: pasikartojimų, susijusių su herpeso viruso infekcijomis, prevenciją, metafilaksiją, t.y. virusinių infekcijų (pvz. ŽIV) atsiradimo prevenciją, kai gydoma vaistais tuoj pat po galimo susidūrimo su virusu (Dhawan, S., L.M. Whal, A. Heredia, Y.H. Zhang, J.S. Epstein, M.S. Meltzer, I.K. Hewlett (1995): Interferon gamma inhibits HIV-induced invasiveness of Monocytes. *J. Leukocyte Biology*, 58 (6): 713-716). Remiantis veikimo mechanizmu, galima tikėtis, kad yra galima gydyti vėžį (J.F. Bromberg, C.M. Horvath, Z.L. Wen, R.D. Schreiber, J.E. Darnell (1996): Transcriptionally active stat 1 is required for antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *PNAS* 93(15):7673-7678; ir M. Klouche, H. Kirchner, F. Holzel (1994): Antiproliferative effects of interferon gamma in combination with alpha-difluoromethylornithine on human carcinoma cell cultures. *J. Cancer Research and Clinical Oncology* 120(12):706).

Priklausomai nuo klinikinės problemos prigimties, terapinis agentas pararaupų viruso pagrindu yra vartojamas arba sistemiškai, tai yra, pavyzdžiui, leidžiamas į raumenis, po oda, į veną arba vartojamas peroraliniu arba vietiniu būdu. Ryšium su tuo, pararaupų virusas yra arba išgrynintos ir liofilizuotos būsenos ir/arba yra suspenduojamas tinkamame tirpiklyje prieš vartojimą, arba kitu atveju yra kitoje tinkamoje kompozicijoje, arba yra skrandžio sultims atsparioje vartojimo formoje arba kitokioje peroralinio vartojimo formoje.

Tinkami preparatai taip pat gali būti pagaminami iš NZ2 palikuonių, kurie yra gauti persėjant ir/arba adaptuojant prie tam tikrų ląstelių, pavyzdžiui WI-38, MRC-5 arba Vero ląstelių, ir iš kitų aukščiau paminėtų kamienų arba NZ2 ir kitų aukščiau minėtų kamienų arba jų palikuonių dalių arba fragmentų.

Dalimis yra laikomi genominiai arba subgenominiai fragmentai, kurie yra ekspresuojami tam tikrų vektorių, pavyzdžiui, vakcinijos, pagalba tinkamose sistemose, pavyzdžiui, fibroblastų ląstelių kultūrose. Fragmentais yra laikomos frakcijos, kurios gaunamos biochemiškai gryninant, pavyzdžiui, chromatografijos būdu, daleles, kurios buvo fiziškai suardytos, pavyzdžiui, ultragarsu.

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

Taigi, panaudojimas pagal toliau duodamą schemą pasirodė esąs ypač daug žadantis vėžio terapijos atveju, pavyzdžiui (bet juo neapsiribojant):

Į raumenis kiekvienu atveju yra įleidžiama nuo 10^6 iki 10^7 TCID₅₀ (audinių kultūros infekcinė dozė) kas trečią dieną 4 savaites, po to padaroma 2 savaitių pertrauka; vėl į raumenis leidžiama nuo 10^6 iki 10^7 TCID₅₀ kas trečią dieną 4 savaites, po to padaroma 2 savaitių pertrauka; vėl į raumenis leidžiama nuo 10^6 iki 10^7 TCID₅₀ kas trečią dieną 4 savaites, po to padaroma 2 savaitių pertrauka; priklausomai nuo ligos sunkumo ir gydymo sėkmės šie ciklai gali būti papildomi kitais ciklais; kitu atveju gali būti imama schema, kurioje kompozicija yra vartojama kas ketvirtą-penktą dieną mažiausiai 3 mėnesius.

Pavyzdžiui, chroniškos virusinės infekcijos atveju nuo 10^6 iki 10^7 TCID₅₀ kompozicijos yra leidžiama po oda į pilvo sritį arba į deltinį arba keturgalvį raumenį kas trečią dieną iš viso 5 kartus. Galima nukrypti nuo šios schemos priklausomai nuo iš ligos kylančių poreikių. Peršalimo profilaktikai kompozicija turi būti vartojama skalavimui ir tai turi būti kartojama kasdien, kol yra infekcijos rizika.

Norint apsisaugoti nuo infekcijų po chirurginių intervencijų burnos srityje (pvz. dantų operacijų) skalauti kompozicija reikia 1-2 minutes vakare prieš intervenciją.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Virusų, taksonomiškai priklausančių vienam iš avies pararaupų viruso (*Parapoxvirus ovis*) NZ2, NZ-7, NZ-10 ir orf-11 kamienų, panaudojimas vaistų nuo žmonių ir gyvūnų virusinių infekcijų ir vėžio gamyboje.

2. Virusų pagal 1 punktą palikuonių, kurie yra gaunami persėjant arba adaptuojant prie tinkamų ląstelių sistemų, tokių kaip žmogaus ląstelės WI-38 ir MRC-5, Vero ląstelės, jaučio ląstelės BK-K13A47/Reg arba MDBK ir avies ląstelės MDOK, panaudojimas vaistų nuo žmonių ir gyvūnų virusinių infekcijų ir vėžio gamyboje.

3. Virusų pagal 1 ir 2 punktą dalių arba fragmentų, kur dalimis yra laikomi genominiai arba subgenominiai fragmentai, kurie yra ekspresuojami tam tikrų vektorių, tokių kaip vakcinijos virusai, pagalba tinkamose sistemose, tokiose kaip fibroblastų ląstelių kultūros, o fragmentais yra laikomos frakcijos, kurios yra gautos biochemiškai gryninant, kaip antai chromatografijos būdu, ekspresuotas arba fiziškai suardytas virusų daleles, panaudojimas vaistų nuo žmonių ir gyvūnų virusinių infekcijų ir vėžio gamyboje.

4. Virusų arba virusų palikuonių, arba virusų dalių ar fragmentų panaudojimas pagal 1-3 punktus, besiskiriantis tuo, kad yra skirtas vaistų ir farmacinių preparatų kaip imunoterapinių agentų arba imunoprolifaktinių agentų nuo autoimuninių ligų ir ūmių bei chroniškų kvėpavimo trakto ir vidaus organų virusinių infekcijų gamybai.

5. Virusų arba virusų palikuonių, arba virusų dalių ar fragmentų panaudojimas pagal 1-3 punktus, besiskiriantis tuo, kad yra skirtas vaistų ir farmacinių preparatų, skirtų streso metafilaksijai ir po streso pasitaikančių ligų prevencijai arba išvengimui bei infekcijos profilaktikai operacijų ir intervencijų taisant dantis kontekste, gamybai.

6. Virusų arba virusų palikuonių, arba virusų dalių ar fragmentų panaudojimas pagal 1-3 punktus, besiskiriantis tuo, kad yra skirtas vaistų ir farmacinių preparatų, skirtų infekcijų metafilaksijai arba ūmių virusinių infekcijų, tokių kaip kvėpavimo trakto, papilomos viruso infekcijos, herpeso viruso infekcijos, ŽIV infekcijos arba vidaus organų virusinės infekcijos, tokios kaip hepatito viruso infekcijos, gydymui ir taip pat naudojimui ryšium su

ligomis, tokiomis kaip išsėtinė sklerozė, astma, karpos ir kiti odos augliai, gamybai.

7. Virusų arba virusų palikuonių, arba virusų dalių ar fragmentų panaudojimas pagal 1-3 punktus, besiskiriantis tuo, kad yra skirtas vaistų ir farmacinių preparatų, skirtų naudoti ant žaizdų, žaizdų gijimo procesams pagreitininti ir žaizdų, kurios blogai gyja arba visai negyja, bei kojos opos gijimo procesams palaikyti, gamybai.

8. Virusų arba virusų palikuonių, arba virusų dalių ar fragmentų panaudojimas pagal 1-3 punktus, besiskiriantis tuo, kad yra skirtas vaistų ir farmacinių preparatų, skirtų alerginių ligų spektro ligoms, psoriazei, neurodermatitui ir kitoms autoimuninėms ligoms, tokioms kaip raudonoji vilkligė, gydyti, o taip pat ir pagyvenusių pacientų sveikatos stoviui pagerinti, gamybai.

9. Virusų arba virusų palikuonių, arba virusų dalių ar fragmentų panaudojimas pagal 1-3 punktus, besiskiriantis tuo, kad yra skirtas vaistų ir farmacinių preparatų, skirtų naudoti prieš vidaus organų uždegimines, degeneracines ir proliferacines ligas (tokias kaip Krono liga), odos, kraujo, centrinės nervų sistemos ir ją lydinčių struktūrų, įskaitant akis, ligas ir įskaitant vėžį, gamybai.

10. Virusų arba virusų palikuonių, arba virusų dalių ar fragmentų panaudojimas pagal 1-3 punktus derinyje su kitais vaistais, besiskiriantis tuo, kad yra skirtas vaistų ir farmacinių preparatų žmonių ir gyvūnų priešvirusinei arba vėžio terapijai gamybai.

11. Virusų arba virusų palikuonių, arba virusų dalių ar fragmentų panaudojimas pagal 1-3 punktus derinyje su kitais vaistais, besiskiriantis tuo, kad yra skirtas vaistų ir farmacinių preparatų peroraliniam vartojimui ir/arba skrandžio sultims atsparių kompozicijų peroraliniam vartojimui gamybai.

Fig. 1

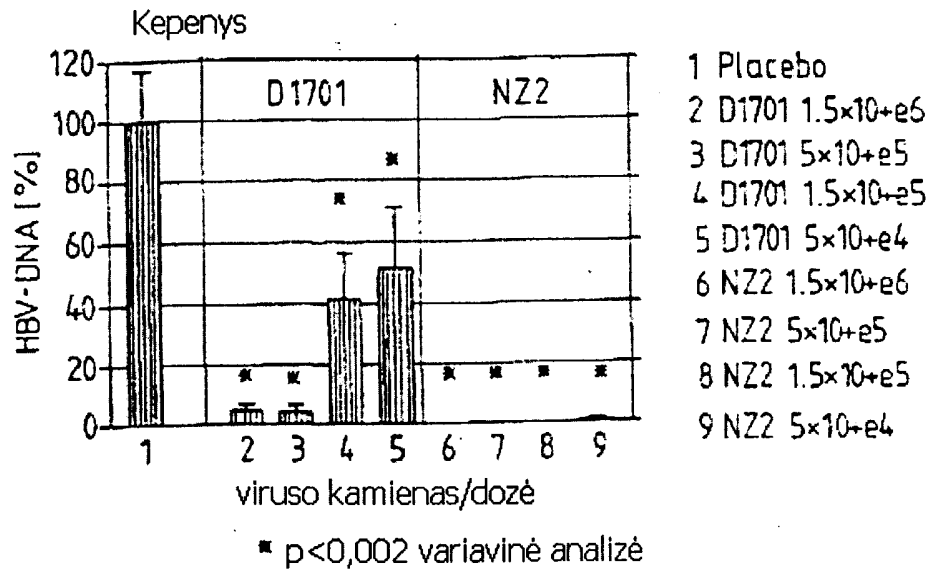


Fig. 2

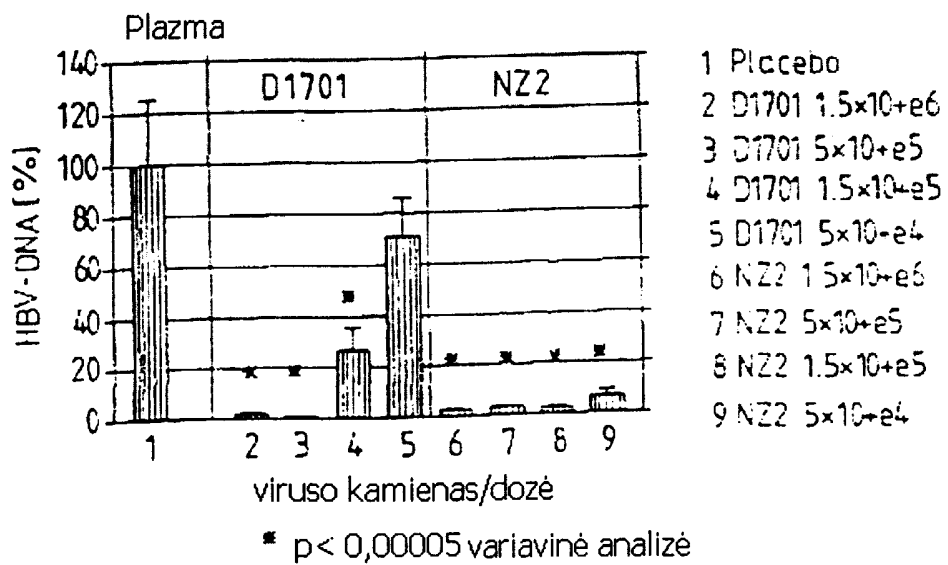


Fig. 3

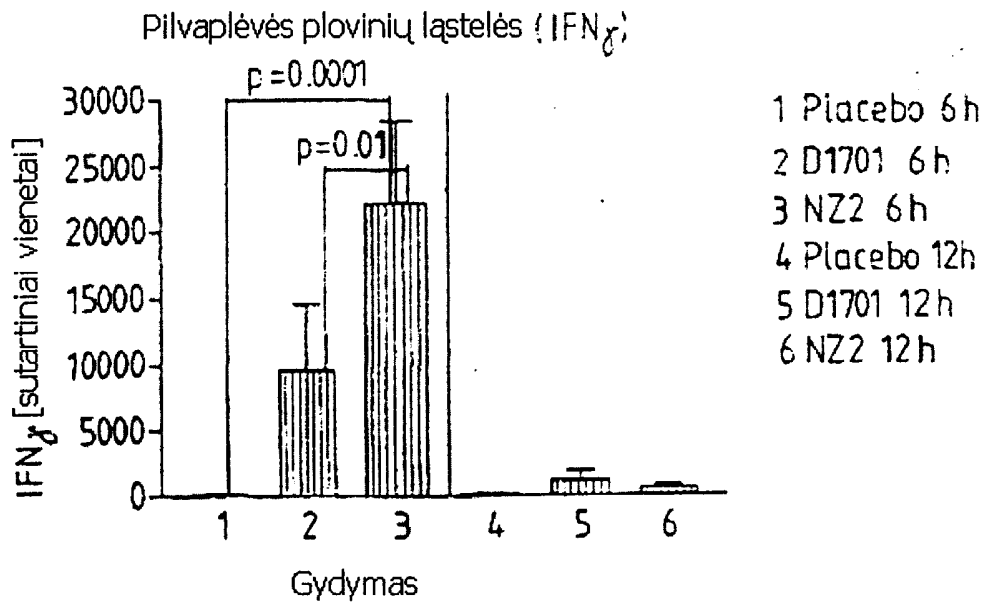


Fig. 4

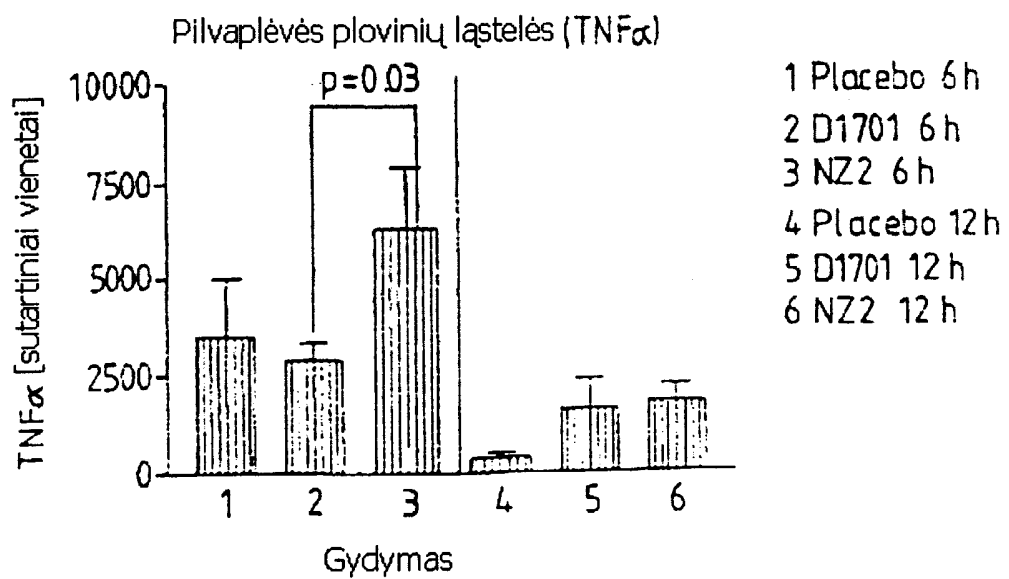


Fig. 5

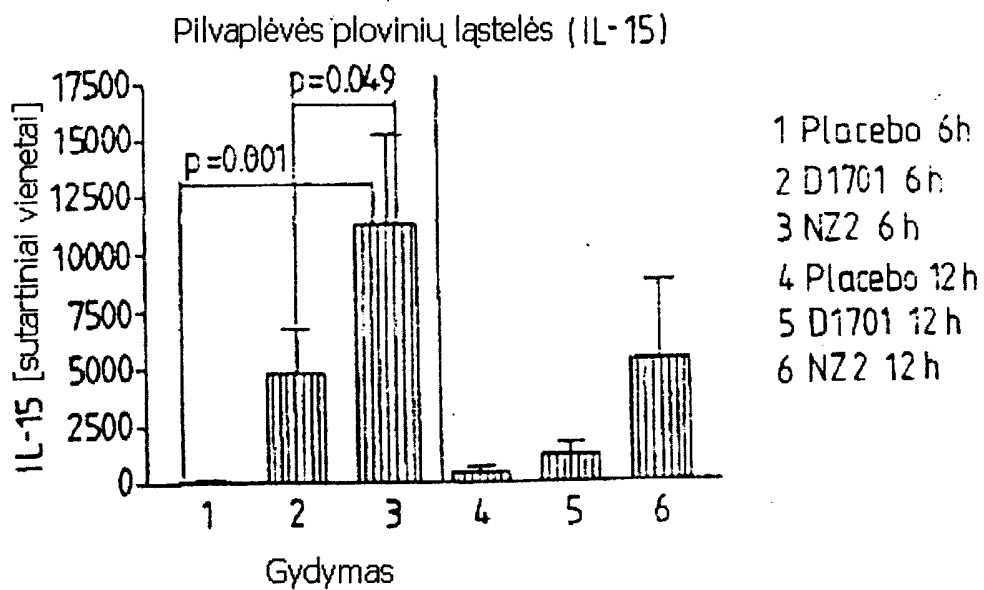


Fig. 6

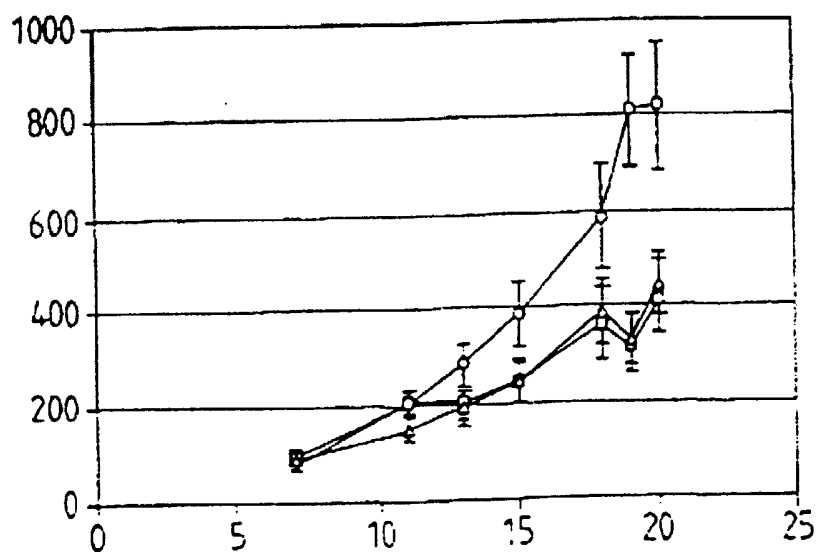


Fig. 7

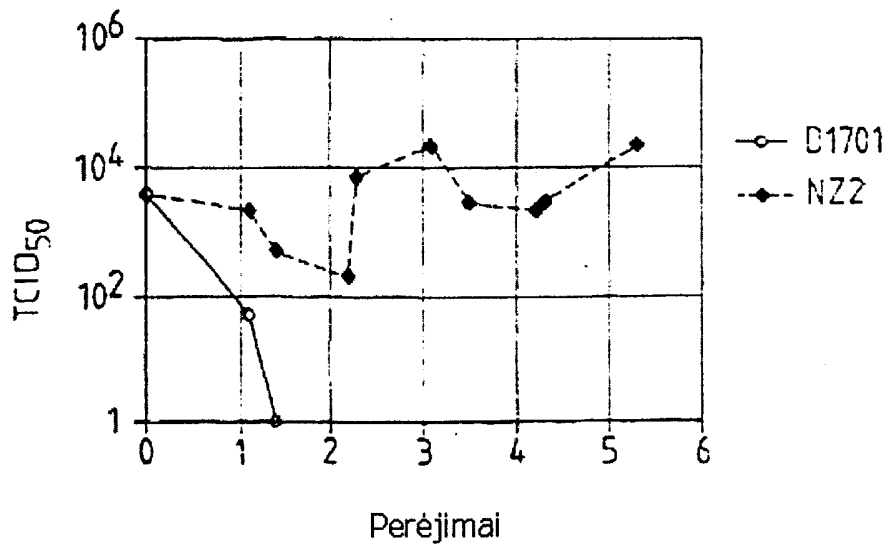


Fig. 8

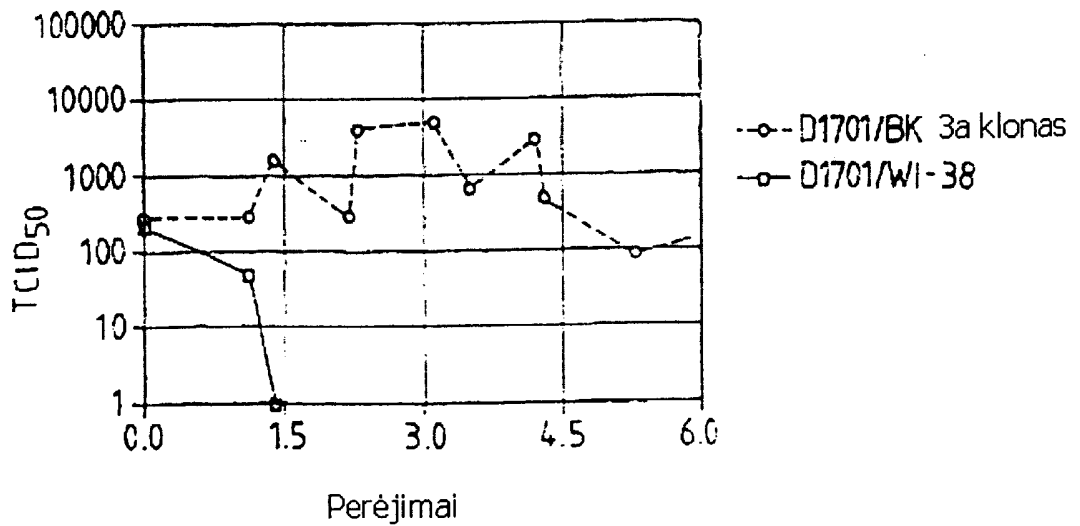


Fig. 9

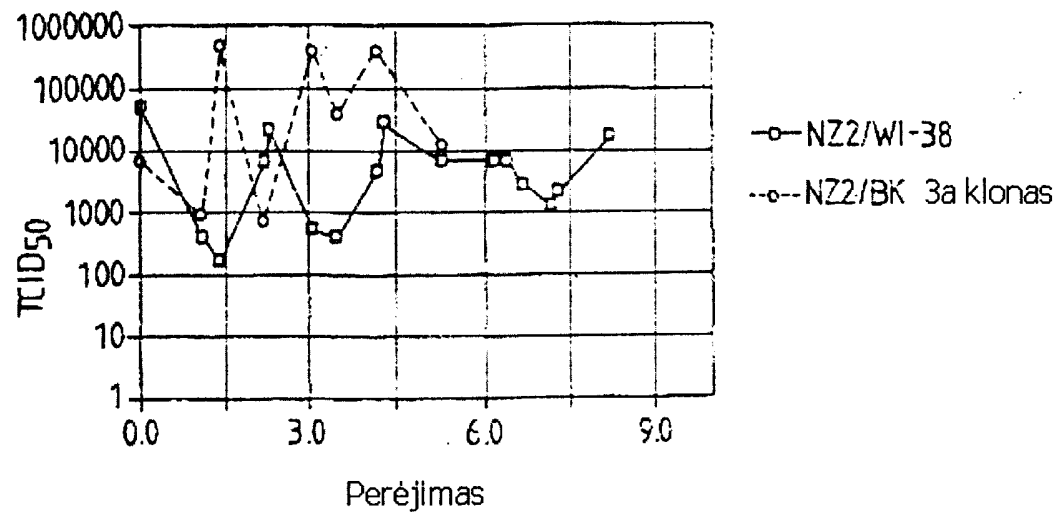


Fig. 10

