

(19)



(10) **LT 6177 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **6177** (51) Int. Cl. (2015.01): **A61K 38/00**
A61L 15/00
A61K 8/00
A61K 31/00
- (21) Paraiškos numeris: **2014 115**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2014 10 10**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2015 05 25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2015 07 27**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:
Saulius GRIGIŠKIS, LT
Vilma ČIPINYTĖ, LT
Bronislovas TVASKA, LT
Ieva URBANAVIČIŪTĖ, LT
Rytis RIMDEIKA, LT
Mykolas MAURICAS, LT
- (73) Patento savininkas:
UAB „BIOCENTRAS“, V.A. Graičiūno g. 10, LT-02241 Vilnius, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Reda ŽABOLIENĖ, Advokatės Redos Žabalienės kontora METIDA, Verslo centras VERTAS, Gynėjų g. 16, LT-01109 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Fermentų kompleksų išskyrimas iš *Streptomyces gougerotii* 101, daugiafermentinių biopreparatų ruošimas bei taikymas
- (57) Referatas:

Šis išradimas priskiriamas farmacinės biotechnologijos ir biomedicinos sritims. Šio išradimo esmė yra sukurti fermentų, išskirtų iš *Streptomyces gougerotii* 101 daugiafermentinius biopreparatus, pasižyminčius proteolitinium, kolagenaziniu, esteraziniu, amilolitiniu, lipaziniu, gliukanaziniu, dezoksiribonukleaziniu ir lizuojančiu aktyvumais ir panaudoti kosmetikos, antibakterinių preparatų bei žaizdų gydymui skirtų preparatų gamyboje. Daugiafermentinių biopreparatų išskirtinė gamybos technologija pasižymi tuo, kad keičiant fermentų koncentraciją juose, keičiasi jų taikymo sritis.

TECHNIKOS SRITIS

Šis išradimas priskiriamas farmacinės biotechnologijos ir biomedicinos sritims. Jis apima fermentų iš *Streptomyces gougerotii* 101 kompleksų gavimo procesus, daugiafermentinių biopreparatų ruošimą ir praktinį pritaikymą.

TECHNIKOS LYGIS

Žaizda – odos, gleivinės ar giliau esančių audinių mechaninis, cheminis, terminis ar kitoks sužalojimas. Žaizdos gijimas, kurį inicijuoja ir reguliuoja centrinė nervų bei imuninė organizmo sistemos, turi keturias stadijas: uždegimo, migracijos (granuliavimo), epitelizavimo ir rando brendimo, pavaizduota 1 paveiksle. Minėtų žaizdų gijimo stadijų metu vyksta tie patys procesai, nepriklausomai nuo jų kilmės, audinių žaizdų užterštumo ir kitų veiksnių.

Uždegimo stadija

Pažeidus odą ir po ja esančias kraujagysles, žaizdoje susidaro išsiliejusio kraujo krešulys [3,6]. Trombocitai, esantys krešulyje išskiria citokinus ir augimo faktorius: PDGF, EGF, IGF-1, FGF, TGF – β . Šios medžiagos veikia dvejopai: aktyvuoja šalia esančias imunines ląsteles bei perduoda signalą centrinei nervų sistemai apie uždegimą, pavaizduota 2 paveiksle. [1,3]. Uždegimo stadija yra svarbus ir sudėtingas procesas. Visų pirma žaizda yra atvira ir dėl to yra didelė rizika infekcijai, kadangi pažeisti ir nekrozavę audiniai, esantys žaizdoje yra palanki terpė veistis patogeniniams mikroorganizmams. Bendras imuninis atsakas užtrunka apie 24 valandas. Nors uždegimas žaizdų gijimui yra reikalingas procesas, tačiau jis sulėtina regeneracijos procesą ir netgi gali būti kenksmingas. Kai kuriais atvejais dėl infekcijos arba ūmaus uždegimo, uždegimo stadija komplikuojasi ir gali tęstis nuo 20 dienų iki 2 metų. Užsitęsusi uždegimo stadija stabdo gijimą bei kitų stadijų procesus, todėl žaizdos tampa sunkiai gyjančios bei chroninės, gali susiformuoti hipertrofinis randas, trukdantis aplinkinių, nesužalotų audinių funkcijai.

Visiems faktoriams bei imuninėms ląstelėms per kraujotakos sistemą patekus į žaizdą prasideda uždegiminė žaizdos gijimo stadija. Pirmieji atkeliauja neutrofilai ir per pirmąsias 3 dienas dominuoja pažeidimo vietoje [3]. Jų pagrindinė funkcija yra mikrobo ir svetimkūnių fagocitozė. Po fagocitozės neutrofilai apoptuoja, tada juos

pašalina į žaizdą migruojantys makrofagai. Maksimali makrofagų koncentracija žaizdoje būna po ~24-36 val. Makrofagai, kaip ir neutrofilai fagocituoja mikrobus, kitas daleles, išvalo žaizdos paviršių. Taip pat makrofagai aktyvuoja NK ląsteles, kurios pradeda sintetinti gama interferoną IFN γ , kuris, savo ruožtu, aktyvuoja pačius makrofagus. Taip pat makrofagai atlieka dar vieną svarbią funkciją – jie pritraukia į pažeidimo vietą ir aktyvuoja įgyto imuniteto ląsteles, T ir B limfocitus. Aktyvuoti T-limfocitai atkeliavę į pažeidimo vietą pradeda sintetinti IFN γ , kuris, kaip jau buvo rašyta, aktyvuoja makrofagus ir sustiprina jų poveikį. Reikia paminėti, kad imuninė sistema įveikia ne visus mikroorganizmus ir infekcija gali išplisti toliau nuo pirminės infekcijos vietos, o tai gali sukelti sepsį – ūmų viso organizmo uždegiminį atsaką.

Yra sukurta visa eilė preparatų kovai su infekcija žaizdose. Tai jodo tirpalai, kaip BETADINE® aprašytas patente US 5986162 A, antiseptinės priemonės, kaip SSD su antibakterine medžiaga sidabro sulfadiazinu, aprašytos patente US5514657 A, arba antibakterinis medicininis medus Medihoney®, aprašytas patente EP2040721 B1. JAV maisto ir vaistinių produktų administracijos FDA patvirtino, kad sidabras yra natūralus antibiotikas, kovai su mikroorganizmais. Su sidabru yra sukurti sterilūs antibakteriniai tvarščiai aprašyti patentuose US 7704523 B2, WO 2004002384 A1, US 7005556 B1, US 20070275043 A1. Sidabras naudojamas ir kituose priemonėse: koloidiniuose tirpaluose, hidrogeliuose ir t.t. aprašyti patente WO 2005018543 A2, US 6706279 B1. Patente WO 2002100448 A1 naudojama antibakterinė medžiaga yra triklozanas, tačiau laboratorinių testų metu įrodytas šios medžiagos neigiamas poveikis žmogaus endokrininei sistemai. Patente WO 2013109004 A1 aprašyta žaizdos dengimo medžiaga iš chitozano – sidabro nanodalelių, kurios turi antibakterinę ir lėto atpalaidavimo charakteristiką, tačiau lėtas antibakterinis poveikis prailgina ir kovos su infekcija laiką. Yra sukurta antibakterinių medžiagų, kurių poveikis pagrįstas patogeninių mikroorganizmų sintetinamų fermentų inhibicija, nes jie skaido antibiotikus, pvz., patente US 20140194386 A1 aprašytas beta – laktamazės, kurį skaido peniciliną, inhibitorius. Kita antibakterinė medžiaga aprašyta patente US 20140163038 A1, kuri inhibuoja Fab fermentą, kuris dalyvauja bakterijų riebalų rūgščių sintezės cikle, taip slopindama mikroorganizmų dauginimąsi ir vystymąsi. Patente US 20140134210 A1 aprašytas priešinfekcinio gydymo būdas, naudojant antibiotikus kartu su imunostimuliuojančia medžiaga – lizofosfatidilcholinu, kuris stimuliuoja imunines ląsteles: monocitus, makrofagus, T limfocitus ir neutrofilus. Tyrimai parodė,

kad šių medžiagų sinergetinis poveikis efektyvesnis infekcijos gydymui, nei veikiant atskirai. Patente US 20140171358 A1 aprašytos antibakterinės kompozicijos susidedančios iš vienos ar daugiau riebalų rūgščių: DGLA, 15-OHEPA ir/arba 15-HETrE, kurios naudojamos vienos arba kompozicijoje su antibiotikais. US 2014/0193889 A1 patente aprašytas lipazių antimikrobinis poveikis. Lipazės degraduoja mikroorganizmų ląstelių sienelės bei ląstelių membranų komponentus, taip stabdydamos jų augimą ir dauginimąsi. Žinomas antibakterinis medicininis preparatas Flaminal® savo sudėtyje turintis fermentus gliukozės oksidazę ir laktoperoksidazę. Priešinfekcinį poveikį turintis preparatas SertaSil™, savo sudėtyje turi fermentą seratiopeptidazę, aprašytas patente WO2010079209 A2.

Visų šių preparatų trūkumas yra tas, kad jie atlieka tik vieną funkciją, o norint pasiekti efektyvų žaizdos gydymą, būtina pašalinti visas įmanomas priežastis, apsunkinančias žaizdų gijimą. Riebaliniai tepalai ir antibiotikų preparatai nenaudotini, nes riebaliniai tepalai skatina uždegimą ir pūliavimą, antibiotikas nepatenka į nekrozę, žaizdoje nepakankama antibiotiko koncentracija. Antibiotikai būna siauro spektro – neveikia grybelių ir virusų, greitai išsivysto atsparios antibiotikui mikrobu padermės. Pagrindinės priežastys trikdančios žaizdų gijimo procesus – negyvybingi, nekrotiniai audiniai žaizdoje bei bakterijos, sukeliančios infekciją [3]. Mokslinės literatūros duomenimis ankstyvas ir pilnavertis negyvybingų audinių pašalinimas sąlygoja greitesnę žaizdų epitelizaciją, sumažina randėjimo riziką bei užtikrina geresnį funkcinį atsistatymą [5,8].

Uždegiminės žaizdos gijimo fazės rezultate makrofagai ir neutrofilai išvalo žaizdos paviršių nuo mikrobu, ląstelių nuolaužų ir inicijuoja audinio reparacijos stadiją [7]. Augimo faktorius TNF- α stimuliuoja neutrofiluose ir makrofaguose proteazių sintezę: elastazę, mieloperoksidazę, rūgštinę hidrolazę, lizosomas ir kolagenazę, kurios skaido nekrotinius audinius [1]. Taip pat į žaizdą išskiriami šių proteazių inhibitoriai, kurie stabdo proteazių veikimą žaizdos dugne, kad nepakenktų gyvybingiems audiniams [3]. Dėl šios inhibicijos užtrunka nekrotinių audinių pašalinimas iš žaizdos, taip prailgindamas ne tik uždegimo stadiją, bet ir visą žaizdos gijimo laikotarpį. Prie šių apsauginių funkcijų, uždegiminės ląstelės yra svarbus augimo faktorių ir citokinų šaltinis, inicijuojantis žaizdos gijimo proliferacijos fazę [2, 3].

Žaizdų gydymo būdai yra įvairūs. Patente US 20140207050 A1 aprašytas metodas, kai su anestetikais naudojama elektrostimuliacija, sukelianti vietinį ir gilų

raumenų susitraukimą, kuris savo ruožtu pagerina kraujo apykaitą bei padidina deguonies koncentraciją žaizdoje, taip pagerinant žaizdos gijimo procesą bei išvengiant komplikacijų.

Kad žaizda gytų ir nekiltų komplikacijų, uždegimo stadijoje būtina skatinti negyvų audinių pašalinimą. Audinių pašalinimas – medicininis negyvo, apmirusio, pažeisto ar užkrėsto audinio pašalinimas, siekiant pagerinti ir paskatinti žaizdos gijimą bei sveiko audinio atsistatymą. Nekrektomijos būdai yra keli: chirurginis, mechaninis, autolitinis, fermentinis ir kt. Autolitinė nekrektomija sustiprina natūralius autolitinius procesus vykstančius žaizdoje, palaiko drėgną aplinką bei reguliuoja eksudato perteklių. Autolitinė nekrektomija yra ilgas procesas, kuris negali būti taikomas infekuotoms žaizdoms [2]. Mechaninis nekrotinių audinių pašalinimas gali pažeisti sveikus audinius tiek žaizdoje, tiek esančius šalia, ir yra neselektyvus. Chirurginė nekrektomija yra skausminga, gali sukelti kraujavimą, naudojami skausmą malšinantys vaistai bei yra prarandama dalis sveikų audinių. Fermentinė nekrektomija yra ypatingai selektyvus ir lokalus metodas taikomas žaizdų ir sunkiai gyjančių žaizdų gydymui. Šio metodo metu naudojami egzogeniniai fermentai, dažniausiai proteazės, veikiantys kartu su endogeniniais fermentais, susidaranciais žaizdose.

Fermentai atliekantys nekrektomijos funkciją, gali būti iškirti iš augalų, mikroorganizmų bei gyvūnų. Medicininuose preparatuose, skirtuose nekrektomijai, kaip veiklioji medžiaga dažnai naudojama augalinės kilmės proteazė bromelainas, aprašyta patentuose : US 2013/0156745 A1, US 8119124 B2 ir US 8,128,589 B2. Bromelainas yra cisteino endopeptidazė, išskirta iš ananasų. Preparatas „NexoBrid“ savo sudėtyje turintis bromelainą, naudojamas gydyti odos nudegimus.

Preparato Accuzyme® sudėtyje yra veiklioji medžiaga fermentas papainas, kuris atlieka nekrektomijos funkciją. Papainas – proteinazė išskirta iš papajos vaisių. Jos privalumas prieš kitas proteinazes yra tas, kad veikia plačiame pH diapazone - nuo 3 iki 12. Tačiau vienas papainas yra neveiksmingas, todėl naudojamas kartu su karbamidu, kuris denatūruodamas negyvybingus baltymus, padeda papainui juos skaidyti. Atlikti klinikiniai tyrimai neparodė reikšmingo poveikio žaizdų gijimo greičiui [9].

Gyvūninės kilmės fermentai aprašomi patente RU 2280076 C1. Iš Kamčiatkos krabo išskirti fermentai pasižymi kolagenaziniu, proteaziniu, ribonukleaziniu, deoksiribonukleaziniu, fosfodiesteraziniu, fosfataziniu, amilaziniu, lipaziniu ir

gliukanaziniu aktyvumais. Dėl šios priežasties šių fermentų mišiniai arba pavieniai fermentiniai preparatai gali būti plačiai pritaikomi biotechnologijoje, medicinoje, kosmetologijoje. Patento autoriai teigia, kad šis daugiafermentinis preparatas tinka pūlingų žaizdų gydymui ir yra efektyvesnis už preparatus, kurių sudėtyje yra tik kolagenazės ar proteazės, tačiau nėra aprašytas joks preparatas bei jo taikymo tyrimai.

Dviejų fermentų fibrinolizino ir dezoksiribonukleazės derinys yra naudojamas preparate Elase®. Fibrinolizinas skaido fibriną ir tirpina kraujo krešulį, taip pat inaktyvuoja fibrinogeną bei keletą krešėjimo faktorių. Šis fermentas plečia kraujagysles žaizdos dugne. Skaidydamas fibriną ir nekrotinius audinius žaizdoje, padeda patekti makrofagams į žaizdą. Sauso pavidalo fibrinolizinas yra stabilus, tačiau ištirpęs po 6 – 8 valandų praranda savo aktyvumą. Fibrinolizino reakcijos produktai nėra rezorbuojami, todėl turi būti pašalinami nuo žaizdos paviršiaus [2].

Dezoksiribonukleazė išgaunama iš galvijų kasos. Šis fermentas skaido nukleino rūgštis bei mažina eksudato klampumą. Jis tirpus vandenyje ir aktyvus plačiame pH diapazone, tačiau kambario temperatūroje praranda aktyvumą [2].

Teoriškai šie fermentai turėtų pagerinti žaizdų gijimą, kadangi eksudatą daugiausia sudaro fibrinas ir nukleoproteinai. Klinikinių tyrimų metu buvo tiriamas šio preparato veiksmingumas šalinant nekrotinius audinius bei skatinant granuliaciją, o kontrolei buvo naudotas fiziologinis tirpalas. Gydymo rezultatai šio preparato pranašumą įrodė tik 19 pacientų iš 34 [4].

Iš kasos sulčių išskirta endopeptidazė tripsinas atlieka nekrotinių audinių pašalinimą, nedarydama žalos gyvybingiems audiniams. Klinikinių tyrimų metu buvo nustatyta, kad šis fermentas gali padidinti reepitelizaciją, padidinti kraujo cirkuliaciją bei sumažinti edemų susidarymą žaizdose. Tačiau reikėtų atlikti daugiau išsamesnių klinikinių tyrimų, kad būtų nustatytas šio fermento veiksmingumas žaizdos gijimo procesuose. Žinomiausi preparatai su tripsinu yra Xenaderm® ir Granulex® [2].

Taip pat yra žinoma nemažai mikrobiologinės kilmės fermentinių preparatų, kurie naudojami žaizdoms gydyti.

Santyl® preparato, skirto žaizdų valymui ir gydymui, sudėtyje yra mikrobiologinės kilmės kolagenazės, iškirtos iš *Clostridium histoliticum*. Ši proteazė selektyviai skaido skirtingo tipo kolageną, esantį žaizdos nekrotiniuose audiniuose,

tačiau yra neveiksminga prieš keratiną, riebalus ir fibriną. Šios kolagenazės optimalus veikimo pH yra nuo 6 iki 8 [10].

Preparatas Varidase® sudėtyje taip pat yra du fermentai: streptokinazė ir streptodornazė. Streptokinazę produkuoja β -hemoliziniai streptokokai. Šis fermentas transformuoja plazminogeną į plazminą, tokiu būdu skatindamas žaizdos eksudato fibrinolizę. Streptodornazę produkuoja hemoliziniai streptokokai. Šis fermentas yra dezoksiribonukleazė, kuri atlieka DNR hidrolizę, nedarydama jokios žalos gyvybingoms ląstelėms [2].

Patente US 2003/0198631 A1 aprašomas medicininis fermentinis preparatas skirtas nekrectomijai, kurio sudėtyje yra ekstraląstelinė metalendopeptidazė „Thermolysin“, iškirta iš mikroorganizmo *Bacillus thermoproteolyticus*. Ši proteazė pasižymi dideliu savitumu dviem baltymams: kolagenui ir fibrinui. Dėl šio savitumo, šis preparatas sudėtingame žaizdos gijimo procese atlieka tik kelias funkcijas.

Šiuo metu rinkoje esančių produktų, naudojamų žaizdoms valyti ir gydyti, fermentų selektyvumas substratui gali lemti lėtesnį ir nevisešią nekrotinių audinių pašalinimą. Be to, jų poveikis yra ribotas atsižvelgiant į visus žaizdų gijimo stadijose vykstančius procesus.

Migracijos (granuliavimo) ir epitelizacijos stadijos

Kai žaizda išvalyta nuo mikrobų ir nekrozavusių audinių, fibroblastai, keratinocitai ir endotelinės ląstelės sintetina augimo faktorius.

1 lentelė. Ląstelių sintetinami augimo faktoriai.

Ląstelė	Sintetinamas augimo faktorius
Keratinocitai	TGF – β , TGF – α , IL - 1
Fibroblastai	IGF – 1, bFGF, TGF – β , PDGF, KGF, CTGF
Endotelinės ląstelės	bFGF, PDGF, VEGF

Šios sintetintos medžiagos skatina ląstelių migraciją, proliferaciją, naujų kapiliarų susidarymą ir ekstraląstelinį baltymų sintezę [3,8].

Pažeistoje vietoje formuojasi taip vadinamas granuliacinis audinys. Jis

formuojasi iš endotelio ląstelių, fibroblastų, keratinocitų uždegiminių makrofagų, limfocitų ir tarpląstelinio matrikso. Proteazės atlieka svarbų vaidmenį ląstelių migracijos stadijoje. Kolagenazė, elastazė ir tripsinas degraduoja desmosomas ir hemidesmosomas ir taip padeda fibroblastams ir endotelinėms ląstelėms atsiskirti nuo pamatinės membranos esančios žaizdos dugne ir laisvai migruoti į žaizdos ertmę [2,3]. Taip pat į žaizdą išskiriami šių proteazių inhibitoriai, kurie slopina proteazių veikimą žaizdos dugne, kad jos nepakenktų gyvybingiems audiniams [3]. Dėl šio slopinimo užtrunka nekrotinių audinių pašalinimas iš žaizdos, taip prailgindamas ne tik uždegimo stadiją, bet ir visą žaizdos gijimo laikotarpį. Kolageno fibrilės yra nuolat remodeliuojamos proteazių, kurias išskiria neutrofilai, makrofagai, fibroblastai, endotelio ir epitelio ląstelės. Lygiagrečiai vyksta reepitelizacija – žaizdos padengimas epitelio ląstelių sluoksniu bei naujų kraujagyslių formavimasis [3,6,7]. Fibroblastai sintetina kolageną, elastiną ir proteoglikanus, kurie formuoja pirminį randą.

Rando brendimas

Rando brendimas tęsiasi nuo kelių mėnesių iki kelerių metų, priklausomai nuo žaizdų kilmės ir dydžio. Paprastų pjautinių ar kirstinių žaizdų randas bręsta 1 ar 2 mėnesius, o nudegimų atvejais gali užtrukti nuo 30 iki daugiau mėnesių. Dėl sutrikusios audinių defektus užpildančių fibroblastų funkcijos padidėja kolageno sintezė, tas nulemia hipertrofinių ir keloidinių randų atsiradimą. Todėl šios stadijos metu tikslinga naudoti preparatus, turinčius kolagenazes.

Patente WO2010079209 A2 aprašoma kompozicija – preparatas SertaSil™ skirta įvairioms žaizdoms gydyti, kurios pagrindinė veiklioji medžiaga yra proteolitinis fermentas seratiopeptidazė. Ši proteazė išskirta iš nepatogeninio mikroorganizmo *Serratia E 15*. Patente aprašomos šio preparato funkcijos žaizdose: kovoja su infekcija, efektyviai šalina nekrotinius audinius, malšina skausmą, reguliuoja eksudato kiekį, reguliuoja žaizdos drėgmės balansą, mažina žaizdos uždegimą ir edemas, mažina kraujavimą.

Patente WO 2011104630 A1 aprašomas fermentų kompleksas, sudarytas iš proteazių, karbohidrolazių ir lipazių, išskirtų iš grybų *Conidiobolus brefeldianus* kultūros. Šie fermentai gali būti naudojami atskirai arba jų deriniai. Autoriai pateikia galimas panaudojimo sritis: odos (gyvūnų kailių) apdirbimui, plovikliams, maistui,

tekstilei, šilko gamybai bei jos proceso metu susidariusių atliekų utilizavimui, analitinėms priemonėms, farmacijai, kosmetikai, molekulinei biologijai ir kt. Tačiau šiuo metu nėra žinomas nei vienas preparatas skirtas žaizdoms gydyti, kurio sudėtyje būtų šie fermentai ar jų deriniai.

Patente US 2013/0202581 A1 aprašytos kompozicijos žaizdų gydymui, kuriose naudojamos trys iš kasos išskirtos hidrolazės: proteazė, lipazė ir amilazė. Autoriai aprašo, kad šie fermentai gali būti naudojami skirtingomis koncentracijomis kuriant preparatus žaizdų gydymui. Taip pat minima, kad šios hidrolazės stimuliuodamos epidermio ląsteles pagreitina žaizdų gijimą be to, po gijimo proceso nesusidaro randai. Nurodoma ir tai, kad šių fermentų kompozicijos nėra veiksmingos prieš *Staphylococcus aureus* ir *Escherichia coli* sukeltas infekcijas.

Taip pat fermentai naudojami kosmetikos gaminiuose, dažniausiai odos šveitiklių sudėtyje. Fermentų pagrindu veikiančiuose odos valikliuose nėra rūgščių ir grandomųjų granulių, kurios gali sudirginti odą. Šių šveitiklių veikimo principo esmė yra tame, kad negyvas odos ląsteles ištirpdo fermentai. Odos priežiūros priemonių rinkoje yra produktų, veikiančių panašiu principu. Kosmetikos gamyboje naudojami fermentai gali būti išskirti iš skirtingų šaltinių. Toliau pateikti keli šių šaltinių pavyzdžiai. Patentuose US 5,705,166, US 6,416,769 B1 ir US 8,377,434 B2 aprašomi odos šveitiklių gamybai naudojami fermentai, išskirti iš neprinokusių papajos vaisių. Patente CA 2377357 aprašomi kosmetikos gaminių gamybai naudojami fermentai, išskirti iš atlantinių menkių (*Gadus morhua*). Patente US 4,556,554 ir US 2010/0080787 A1 aprašomi fermentų kompleksai naudojami odos priežiūros kosmetikos gaminiuose. Patente US 6,551,606 B1 aprašomas naudojamas fermentų kompleksas, išskirtas iš kokoso (*Cocos nucifera*) pieno. Patente US 2005/0249720 aprašomi kosmetikos gaminiams naudojami fermentų kompleksai, išskirti iš ananasų, mango ir papajų vaisių.

Aukščiau aprašyti žaizdų gydymo ir odos priežiūros būdai pilnai neišsprendžia visų su jų terapija susijusių problemų:

nėra universalių kompleksinių preparatų, turinčių antibakterinį poveikį, selektyviai šalinančių nekrotinius audinius, stimuliuojančių organizmo imuninę sistemą, mažinančių randų susidarymą ir veikiančių visų gijimo stadijų metu;

nėra kompleksinių biopreparatų, kurių pritaikymas priklauso nuo fermentų

koncentracijos;

nėra kompleksinių biopreparatų, skirtų žaizdų gijimo greičiui valdyti;

nėra kompleksinių biopreparatų, skirtų odos priežiūrai bei odos susirgimams gydyti.

Todėl mūsų išradimo tikslas – sukurti tokį veiksmingą daugiafermentinį biopreparatą, kuris neturėtų anksčiau išvardintų trūkumų, būtų lengvai pritaikomas tiek skirtingų žaizdų gydymui, tiek odos priežiūros gaminiams, tiek antibakteriniams preparatams. Be to, funkciškai veiktų visose žaizdos gijimo procesuose kartu su imunine sistema, turėtų plataus spektro antibakterinį poveikį, selektyviai šalintų nekrotinius audinius, mažintų randų susidarymą, pagreintų gijimo laiką ir tiktų įvairios kilmės bei pobūdžio žaizdų gydymui. Taip pat daugiafermentinį biopreparatą pritaikyti odos priežiūrai bei odos susirgimams gydyti.

IŠRADIMO ESMĖ

Išradimo tikslas yra sukurti fermentų, išskirtų iš *Streptomyces gougerotii* 101 mikroorganizmo, kompleksų gamybos technologiją ir jų panaudojimą daugiafermentinių biopreparatų gamyboje.

Šio išradimo esmė yra sukurti fermentų kompleksų, išskirtų iš *Streptomyces gougerotii* 101, daugiafermentinius biopreparatus, padedančius žmogaus imuninei sistemai bei pasižyminčius proteolitiniu, kolagenaziniu, esteraziniu, amilolitiniu, lipaziniu, gliukanaziniu, dezoksiribonukleaziniu ir lizuojančiu aktyvumais ir skirtus panaudoti žaizdų gydymui, patogeninių mikroorganizmų pašalinimui bei odos priežiūrai.

Šiame išradime aprašytas odos susirgimų ir žaizdų gydymo būdas nuo žinomų skiriasi tuo, kad tam panaudojami daugiafermentiniai biopreparatai, sudaryti iš proteolitiniu, kolagenaziniu, esteraziniu, amilolitiniu, lipaziniu, gliukanaziniu, dezoksiribonukleaziniu ir lizuojančiu aktyvumais pasižyminčių fermentų, produkuojamų *Streptomyces gougerotii* 101.

Antras skirtumas pasireiškia tuo, kad *Streptomyces gougerotii* 101 produkuojamų fermentų kompleksų sudėtį ir aktyvumą galima keisti auginimo terpėje naudojant skirtingus induktorius: mieles (A) arba kolageną (B).

Trečias skirtumas pasireiškia tuo, kad *Streptomyces gougerotii* 101 produkuojamų fermentų sudėtį ir aktyvumą galima keisti auginimo terpėje keičiant induktorių koncentracijas.

Ketvirtas skirtumas pasireiškia tuo, kad daugiafermentinio biopreparato gamybai, fermentų kompleksai A ir B gali būti naudojami kartu ir atskirai.

Penktas skirtumas pasireiškia tuo, kad daugiafermentiniame biopreparate naudojamų fermentų kompleksų A ir B koncentracijos gali variuoti nuo 0 iki 100 procentų.

Šeštasis skirtumas pasireiškia tuo, kad daugiafermentinio biopreparato gavimo būdas gali apimti šias pakopas:

- a) A ir B fermentų kompleksų paruošimą;
- b) A ir B fermentų kompleksų koncentravimą ir frakcionavimą;
- c) A ir B fermentų kompleksų apdorojimą pagrindiniais baltymų išsodinimo agentais, tokiais kaip neorganinėmis druskomis (pvz. NH_4SO_4 , CaCl_2), ketonais (pvz. CH_3COCH_3), sočiais alifatiniais alkoholiais (pvz. $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) ir kt.;
- d) A ir B kompleksų chromatografinį atskyrimą;
- e) A ir B kompleksų stabilizavimą sočiais alifatiniais polihidroksiliais alkoholiais, kurių anglies skeleto ilgis ne trumpesnis negu C_3 (pvz. gliceroliu, sorbitoliu, polivinilo alkoholiu);
- f) pasirinktinai A ir B kompleksų maišymą.

Septintas skirtumas pasireiškia tuo, kad ruošiant daugiafermentinį biopreparatą, jis gali būti koncentruojamas ultrafiltracijos arba vakuuminio garinimo būdu.

Aštuntas skirtumas pasireiškia tuo, kad ruošiant daugiafermentinį biopreparatą, jis gali būti frakcionuojamas ultrafiltracijos būdu, tam panaudojant 5, 10, 15 ir 50 kDa membranas.

Devintas skirtumas pasireiškia tuo, kad daugiafermentinis biopreparatas lizuoja eilę mikroorganizmų: *Micrococcus lysodeicticus*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus haemolyticus*, *Streptococcus paracitrovorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* 078, *Escherichia coli* 12K, *Pseudomonas*

fluorescens, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces vini*, *Candida utilis*.

Dešimtas skirtumas pasireiškia tuo, kad daugiafermentinis biopreparatas gali būti panaudojamas farmacinėms arba kosmetinėms kompozicijoms kartu su farmaciniu arba kosmetiniu požiūrių priimtinu užpildu, skatinančiu žaizdų gijimą ir gerinančiu odos būklę.

Vienuliiktas skirtumas pasireiškia tuo, kad daugiafermentinis biopreparatas gali būti panaudojamas imuninės sistemos stimuliavimui skirtingų žaizdų gydyme, tiek odos priežiūroje ir gydyme, tiek bakterinių ligų gydyme.

Dvyliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad daugiafermentinis biopreparatas su padidintu lipaziniu aktyvumu, gali būti naudojamas kompozicijoje, kuri yra skirta chroninėms ir sunkiai gyjančioms žaizdoms gydyti.

Tryliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad daugiafermentinis biopreparatas su padidintu lizuojančiu ir gliukanaziniu aktyvumais, gali būti naudojamas kompozicijoje, kuri yra skirta infekuotoms žaizdoms gydyti.

Keturioliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad daugiafermentinis biopreparatas su padidintu proteolitiniu ir kolagenaziniu aktyvumais, gali būti naudojamas kompozicijoje, kuri yra skirta nekrotinėms žaizdoms gydyti.

Penkioliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad daugiafermentinis biopreparatas su pamažintu fermentiniu aktyvumu gali būti naudojamas kompozicijoje, kuri yra skirta odos priežiūrai ir odos susirgimų gydymui.

Šešioliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad daugiafermentinis biopreparatas gali būti naudojamas kompozicijoje, kuri yra skirta antibakterinių ligų gydymui.

Septinioliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad kompozicijos su daugiafermentiniu biopreparatu, gali būti skystos, tepalo ir hidrogelio konsistencijos.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

Fig. 1. Žaizdų gijimo fiziologinių ir biocheminių procesų principinė schema;

Fig. 2. Pagrindinio ir darbinio *Streptomyces gougerotii* 101 kultūros bankų paruošimas (I etapas);

Fig. 3. *Streptomyces gougerotii* 101 kamieno fermentų biosintezė, induktorius

mielės (II etapas);

Fig. 4. *Streptomyces gougerotii* 101 kamieno fermentų biosintezė, induktorius kolagenas (III etapas);

Fig. 5. Daugiafermentinio komplekso A gavimas iš kultūrinio skysčio (IV etapas);

Fig. 6. Daugiafermentinio komplekso B gavimas iš kultūrinio skysčio (V etapas);

Fig. 7. Daugiafermentinių kompleksų A ir B sudėtis po koncentravimo (SDS – PAGE elektroforėzės metodas);

Fig. 8. Fermentų kompleksų A paruošimo principinė schema (induktorius mielės);

Fig. 9. Fermentų kompleksų B paruošimo principinė schema (induktorius kolagenas);

Fig. 10. Principinė daugiafermentinių biopreparatų taikymo schema;

Fig. 11. Daugiafermentinių biopreparatų principinė panaudojimo schema.

DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Mūsų sukurta daugiafermentinio biopreparato gavimo technologija paremta, *Streptomyces gougerotii* 101 mikroorganizmo sintetinamų fermentų kompleksų gavimu ir jų panaudojimu farmacinių, kosmetinių ir antibakterinių kompozicijų gamyboje. Daugiafermentinį biopreparatą sudarantys fermentai turi poveikį:

a) proteazės pradeda veikti ankstyvoje žaizdos gijimo stadijoje ir dalyvauja visose sekančiose stadijose. Visų pirma jos atlieka nekrotozės funkciją, skaido sudėtingą kraujotakos sistemą. Proteazės taip pat lizuoja nekrotinius audinius, eksudatą ir jame esančius baltymus ir taip sutrumpina uždegiminės stadijos laiką. Jos blokuoja skausmo stimulatorius histaminą ir bradikininą, pagreitina uždegimo stimuliatorių bei toksinių medžiagų degradaciją, stimuliuoja ir reguliuoja funkcinį makrofagų aktyvumą. Šie fermentai dalyvauja migracijos stadijoje, degraduoja desmosomas ir hemidesmosomas. Tai padeda fibroblastams ir endotelinėms ląstelėms atsiskirti nuo žaizdos dugne esančios pamatinės membranos ir laisvai migruoti žaizdos ertmėje;

b) gliukanazė lizuoja mikrobų ląstelių sienelės ir tokiu būdu stabdo jų vystymąsi žaizdoje, taip užkertamas kelias infekcijai. Taip pat dėl daugiafermentiniuose biopreparatuose esančių gliukanazių poveikio susidarę β -gliukanai aktyvina fagocitus, skatina γ -interferono sintezę ir tokiu būdu stimuliuoja organizmo imuninę sistemą bei pagreitina žaizdų gijimo procesus;

c) DNRazė hidrolizuoja suirusių ląstelių DNR, tai pagreitina žaizdos išsivalymą nuo nekrotinių audinių. Šis fermentas selektyviai skaldo nukleino rūgštis bei mažina eksudato klampumą, taip palengvindamas ląstelių, dalyvaujančių žaizdos gijimo procesuose, judėjimą bei migraciją;

d) lipazė didina augimo faktorių kiekį žaizdoje, kurie pagreitina angiogenezę, keratinocitų ir fibroblastų proliferaciją ir migraciją, aktyvina endotelines ląsteles bei skatina kolageno sintezę. Lipazių veikimo pasekoje sumažėja prostaglandinų sintezė, todėl sumažėja aplink žaizdą susidaręs audinių patinimas;

e) amilazė reguliuoja EGF augimo faktoriaus išsiskyrimą, kuris aktyvina fibroblastų ir keratinocitų proliferaciją ir migraciją žaizdoje. Taip pat paspartina žaizdų užsivėrimą;

f) elastazė ankstyvosiose stadijose stimuliuoja įgimtą imuninę sistemą, o vėlyvosiose dalyvauja audinių atstatyme ir regeneracijoje;

g) kolagenazė selektyviai skaido kolageną į mažesnes molekules, kurias po to hidrolizuoja kitos proteazės. Kolagenazė efektyvi valant pažeistą vietą nuo nekrotinio audinio, pagreitina granuliacinio audinio formavimąsi. Kolagenazė pagerina keratinocitų ir epitelio ląstelių migraciją į pažeidimo vietą ir jų proliferaciją, kas pagreitina žaizdos padengimą epiteliumu ir naujų audinių formavimąsi. Dėl kolagenazės poveikio sumažėja rando brendimo metu fibroblastų sintetiamo kolageno kiekis ir tokiu būdu užkertamas kelias iškilusio ir grublėto rando susiformavimui, t.y. normalizavus kolageno kiekį, randas minkštėja ir plokštėja;

h) lizuojančiu aktyvumu pasižymintys fermentai dalyvauja mikroorganizmų ląstelių sienelės ardyme, tokiu būdu stabdo jų vystymąsi žaizdoje ir užkertamas kelias infekcijai bei komplikacijoms.

Žaizda yra atviras kelias patogeniniams mikroorganizmams, be to joje esantys nekrotiniai audiniai ir eksudatas sudaro palankias sąlygas joms veistis. Bendras imuninis atsakas užtrunka apie 24 valandas, per šį laiką žaizdoje vykstantys procesai

gali komplikuo­ti negrįžtamai ir prasidėti infekcija. Todėl tikslinga žaizdas gydyti iš­karto po sužeidimo daugiafermentinio biopreparato kompozicijomis, kuris pašalina visus veiksmius stabdančius ar komplikuojančius žaizdų gijimą. Visų pirma daugiafermentinio biopreparato kompozicijos pasižymi plačiu lizuojančiu aktyvumu, ardo žaizdoje esančius patogeninius mikroorganizmus. Taip pat hidrolizuoja denatūruotus baltymus, skystina žaizdos nekrozavusius audinius, stimuliuoja granuliacinio audinio augimą ir greitina žaizdos išvalymą bei gijimą, mažina greta esančių audinių patinimą ir uždegimą. Daugiafermentinio biopreparato sudėtyje esanti kolagenazė tirpina sukietėjusį sukrešėjusio kraujo sluoksnį, nekrotinius audinius ir skaido perteklinį kolageno kiekį, kas leidžia išvengti odos randų susidarymo tikimybės, gydant pūliuojančias žaizdas. Pašalinus nekrozavusius audinius daugiafermentinio biopreparato kompozicijomis, panaikinama baltyminga ir kraujotakos neturinti terpė, palanki veistis mikrobams ir taip sumažinamas bakterinis žaizdos užteršimas bei sustabdomas infekcijos procesas. Tokiu būdu sudaromos sąlygos tolimesniam žaizdos gijimo etapui - audinių regeneracijai ir lokaliai kraujotakos pagerėjimui.

Taip pat daugiafermentinio biopreparato kompozicijoje esančios papildomos medžiagos, tokios kaip natrio alginatas padidina eksudato absorbciją. Polietilenglikolis sudaro polimerines gardeles, kurios imobilizuoja fermentus ir stabdo fermentų aktyvumo sumažėjimą, kas leidžia sumažinti tvarstymų kiekį per dieną. Glicerolis pritraukia, išlaiko ir pririša vandenį. Kompozicijos, kuriose yra didesnė glicerolio koncentracija, sukuria ilgiau išsilaikančią drėgną aplinką žaizdoje, visose gijimo stadijose. Epitelio ląstelėms drėgmė reikalinga tam, kad jos galėtų lengviau judėti nuo reepitelizacijos židinių, esančių žaizdos kraštuose ir užpildyti žaizdos plotą. Sausose žaizdose šios ląstelės juda žaizdos dugnu. Palaikant žaizdose drėgną aplinką, ląstelės gali migruoti visu žaizdos plotu, todėl žaizdos gyja sparčiau.

TINKAMIAUSI ĮGYVENDINIMO VARIANTAI

PRODUCENTO *Streptomyces gougerotii* 101 APRAŠYMAS

Proteolitiniu, kolagenaziniu, esteraziniu, amilolitiniu, lipaziniu, gliukanaziniu, dezoksiribonukleaziniu ir lizuojančiu aktyvumais pasižymintys fermentų kompleksai gaunami iš aktinomiceto *Streptomyces gougerotii* 101 kamieno, auginant jį giluminiu

būdu. *Streptomyces gougerotii* 101 kamienas (UAB „Biocentras“ mikroorganizmų kolekcijos registracijos numeris K-91) buvo išskirtas iš dirvos pietryčių Lietuvoje. Jo charakteristikos yra:

Morfologinės

Kultūros paviršinis micelis baltas arba bespalvis, vidutinis hifų storis 0,6 – 0,8 mikronų. Sporos ovalios arba pailgos, paviršius lygus.

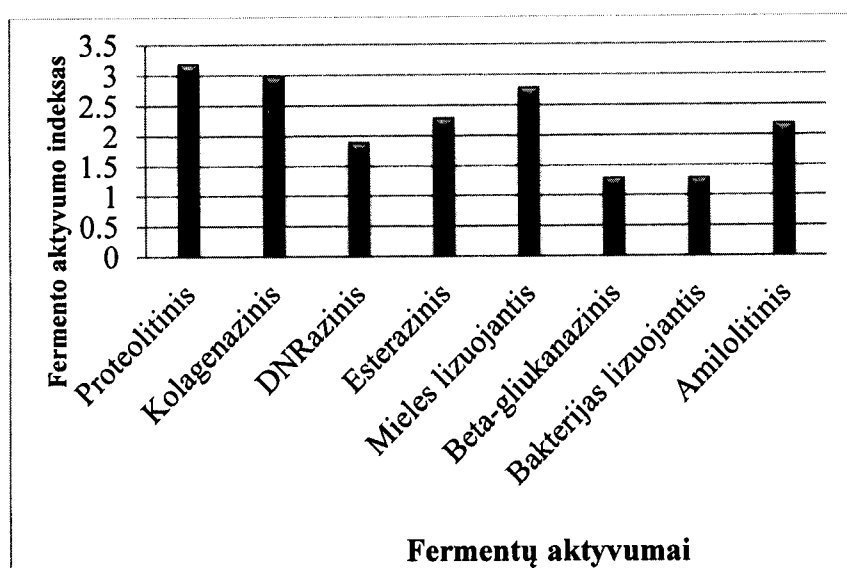
Kultūrinės

Auginant kultūrą *Streptomyces gougerotii* 101 ant agarizuotos kukurūzinės Nr. 2, susiformuoja gausus micelis (paviršinis baltas, o substratinis – šviesiai rudas). Ant agarizuotos avižinės terpės formuojasi baltas paviršinis ir smėlio spalvos substratinis micelis.

Fiziologinės ir biocheminės

Aerobas, optimali augimo temperatūra $+(28-30) ^\circ\text{C}$, pH (7,0–7,5). Hidrolizuoja krakmolą, kazeiną, kolageną, tviną 80, β -gliukanus ir DNR. Sutraukia ir peptonizuoja pieną, skystina želatiną, lizuoja mielių ir bakterijų ląstelių sienelės. Asimiliuoja gliukozę, sacharozę, fruktozę, ksilozę, neįsisavina arba tik silpnai – manitą ir rafinozę. *S. gougerotii* 101 kamieno sintetinių fermentų hidroliziniui aktyvumui įvertinti buvo išmatuotas proteolitinio, kolagenazės, DNRazės, esterazės, mieles lizuojančio, beta-gliukanazės, bakterijas lizuojančio ir amilolitinio aktyvumų indeksai. Šių fermentų aktyvumo indeksui nustatyti kamienas buvo išsėtas į Petri lėkštes su standžia terpe, į kurias buvo papildomai pridėta natrio kazeinato, kolageno, DNA, Tvino 80, kepimo mielių ląstelių, kepimo mielių beta-gliukano, *Mycrococcus lysodeikticus* ląstelių ir krakmolo. Fermentų aktyvumo indeksai apskaičiuoti po 96 h inkubacijos $30 ^\circ\text{C}$ temperatūroje, atitinkamų substratų hidrolizės zonų skersmenį padalinant iš kolonijų skersmens. Rezultatai pateikti 2 lentelėje.

Lentelė 2. *S. gougerotii* 101 kamieno sintetinių hidrolizinių fermentų aktyvumo indeksai



Streptomyces gougerotii 101 kamieno 16S rRNR geno konsensuso seka (SEQ ID Nr. 1)

GGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAG
 CCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCC
 CTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACyGGATATGACCGTCC
 ATCGCATGGTGGrTGGTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCT
 ATCAGCTAGTTGGTGAGGTAGTrGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCC
 TGAGAGGGCGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGC
 CGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAG
 CGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGT

FERMENTŲ KOMPLEKSŲ, GAUNAMŲ IŠ *Streptomyces gougerotii* 101, GAMYBOS ETAPAI

I etapas

Pirmiausia, siekiant gauti fermentų kompleksus, turinčius optimalius proteolitinį, kolagenazinį, esterazinį, amilolitinį, lipazinį, gliukanazinį, dezoksiribonukleazinį ir lizuojantį aktyvumus, yra atliekama *Streptomyces gougerotii*

101 kamieno selekcija ir kultūros saugojimui paruošiami ląstelių bankai.

II ir III etapai

Daugiafermentinių biopreparatų gamyba prasideda nuo *Streptomyces gougerotii* 101 fermentų biosintezės, kurios metu gaunamas kultūrinis skystis. *Streptomyces gougerotii* 101 biosintezės metu produkuoja fermentus, pasižyminčius proteolitinio, kolagenazinio, esterazinio, amilolitinio, lipazinio, gliukanazinio, dezoksiribonukleazinio ir lizuojančio aktyvumais. Sintetinių fermentų sudėtis ir jų aktyvumas reguliuojami terpėje keičiant induktorius (mieleles A arba kolageną B) bei jų kiekius.

IV ir V etapai

Po *Streptomyces gougerotii* 101 fermentų biosintezės gauti kultūriniai skysčiai A ir B yra centrifuguojami, filtruojami, koncentruojami: vakuuminio išgarinimo arba ultrafiltracijos būdu. Gauti koncentratai A ir B yra išsodinami naudojant pagrindinius baltymų išsodinimo agentus. Po papildomo centrifugavimo gautos nuosėdos ištirpinamos, o gauta suspensija dar kartą nucentrifuguojama.

2 lentelė. Daugiafermentinių kompleksų A ir B fermentiniai aktyvumai.

Nr.	Fermentinis aktyvumas	Daugiafermentinis kompleksas A (induktorius mielės)	Daugiafermentinis kompleksas B (induktorius kolagenas)
1.	Proteolitinis aktyvumas, v/cm ³	10–22	5–7,5
2.	Kolagenazinis aktyvumas, v/cm ³	700–1180	700–930
3.	Lipazinis aktyvumas, v/cm ³	100–145	10–20
4.	Gliukanazinis aktyvumas, v/cm ³	5–7,5	2–3,4
5.	DNRazinis aktyvumas, v/cm ³	0.21	–
6.	Amilazinis aktyvumas, v/cm ³	2–5	1–3
7.	Esterazinis aktyvumas, v/cm ³	15000–18000	12000–16000
8.	Lizuojantis aktyvumas, v/cm ³	20–60	80–100

Proteolitinio aktyvumo vienetas – fermentinio preparato kiekis, kuris, hidrolizuodamas kazeiną arba natrio kazeinatą per minutę, esant pH = 8,0 ir 37 °C temperatūrai, išskiria 1 mikromolį tirozino.

Kolagenazės aktyvumo vienetas – tai fermento kiekis, kuris, hidrolizuodamas kolageną per 5 valandas, esant pH- 7,5 ir 37°C temperatūrai, išskiria vieną mikromolį α -leucino.

Lipazinio aktyvumo vienetas – fermento kiekis, kuris 40°C temperatūroje, esant pH 8,0 iš substrato p-nitrofenil palmitato per 1 minutę atpalaiduoja 1 nanomolį p-nitrofenolio.

Gliukanazinio aktyvumo vienetas - toks preparato aktyvumas, kuris per 1 min suskaido 0,1 μ mol netirpaus β -1,3-gliukano, esant optimalioms sąlygoms (pH = 7,0; 50 °C temperatūra).

DNRazinio aktyvumo vienetas – tai toks fermento kiekis, kuris esant 37 ° C temperatūrai per 10 min suskaido 1 μ g DNR.

Amilazinio aktyvumo vienetas – bakterinės α – amilazės (S.A. Rapidaz) vienetas yra fermento kiekis, kuris per 1 min suskaido 1mg krakmolo iki eritrodekstrinų, esant pH 5,6 – 5,8 ir temperatūrai 30 $\pm$ 0,2 °C.

Esterazinio aktyvumo vienetas – fermento kiekis, kuris 40°C temperatūroje, esant pH 8,0 iš substrato p-nitrofenil butirato per 1 minutę atpalaiduoja 1 nanomolį p-nitrofenolio.

Lizuojančio aktyvumo vienetas – fermento kiekis, kuris 37° C temperatūroje, esant pH iki 8,0, per 30 min sumažina 0,1 reakcijos mišinio optinį tankį. (substratas *Micrococcus lysodeikticus* kultūra).

Atsižvelgiant į daugiafermentinio biopreparato antibakterines savybes, jis buvo taikomas patogeninių mikroorganizmų, išskirtų iš ligonių nosiaryklės, gerklės, dantų, pūlinių žaizdų, ardymui. Daugiafermentinis biopreparatas ardo įvairių tiek patogeninių, tiek nepatogeninių mikroorganizmų ląstelių sienes, ypač gerai lizuoja streptokokus bei stafilokokus, kurie paplitę kaip infekcinių ligų sukėlėjai. Daugiafermentinis kompleksas lizuoja *Clostridium perfringens* bakterijas, kurios sukelia dujinę gangreną (3 lentelė).

3 lentelė. Daugiafermentinio biopreparato antibakterinis veikimas.

Mikroorganizmai	Lizuotų ląstelių dalis, %
	Inkubacijos laikas 15 min.
<i>Micrococcus lysodeicticus</i>	32
<i>Staphylococcus albus</i>	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	60
<i>Streptococcus haemolyticus</i>	40
<i>Streptococcus agalactiae</i>	45
<i>Streptococcus paracitrovorum</i>	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
<i>Clostridium perfringens</i>	30
<i>Escherichia coli</i>	35
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10
<i>Bifidobacterium species</i>	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
<i>Saccharomyces vini</i>	0
<i>Candida utilis</i>	20
<i>Bacillus subtilis</i>	0
<i>Aspergillus niger</i>	0
<i>Aspergillus awamori</i>	0
<i>Penicillium funiculosum</i>	0

Atlikti daugiafermentinio biopreparato ikiklininiai tyrimai. Ikiklinikinių bandymų etape buvo atlikti: toksikologiniai, farmakologiniai bei preparato efektyvumo tyrimai (valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas atlikti laboratorinius bandymus su gyvūnais Nr.0141). Visi tyrimai atlikti pagal iš anksto parengtus ir pasirašytus planus. Visi toksikologiniai tyrimai buvo atlikti pagal OECD metodikas. Tyrimams buvo naudojamos pelės, triušiai ir jūros kiaulytės. Visuose toksikologiniuose bandymuose buvo naudojamas (kaip tai nurodyta ES direktyvuose) tiriamojo daugiafermentinio preparato koncentratas, kurio proteolitinis ir kolagenazinis aktyvumas 6 kartus viršija siūlomos vaistinės preparato formos aktyvumus. Apibendrinant galima tvirtinti, kad atliktų toksikologinių tyrimų apimtis ir rezultatai leidžia daryti išvadą, kad tiriamas preparatas toksiškumo atžvilgiu yra saugus.

Išvados :

Odos sensibilizacijos tyrimas jūrų kiaulytėms - išvada - paraudimo, patinimo nenustatyta, reakcija į provokacinį mėginį neigiama - preparatas odos nesensibilizuoja;

Ūmaus odos dirginimo testas triušiams-išvada- vidutinis odos dirginimo balas lygus nuliui - preparatas odos nedirgina;

Ūmaus akies dirginimo testas triušiams-išvada- triušių akies dirginimas įvertintas 0,25 balo, todėl vartojant preparatą patartina saugoti, kad jis nepatektų į akis- silpnai degina akis;

Kartotinių dozių (28 dienų) toksiškumo per odą testas - tiriant kartotinių dozių preparato toksiškumą C57W pelėms nustatyta, kad 0,8 v/cm koncentracijos preparatas yra netoksiškas.

Ūmaus toksiškumo per virškinamąjį traktą tyrimas C57W pelėms - preparatas yra mažai pavojinga medžiaga.

Ištirtas nudegimų gydymo efektyvumas, naudojant skirtingas tiriamojo preparato koncentracijas: 0,5 v/cm³, 0,8 v/cm³, 1,0 v/cm³, 1,6 v/cm³ pagal proteolitinį aktyvumą. Tyrimui buvo naudojami sveiki, suaugę Wistar populiacijos žiurkių patinėliai. Tyrimų rezultatai parodė, kad optimaliausias tiriamojo vaisto proteolitinis aktyvumas gydant terminius odos nudegimus yra 0,8 v/cm³. Tiriamojo kompleksinio fermentinio preparato su proteolitiniu aktyvumu 0,8 v/cm³ naudojimas I-III laipsnio terminių odos nudegimų gydymui leidžia sumažinti gydymo trukmę vidutiniškai 20%. Gydant nudegimus preparatu nelieka randų, kas gali būti labiau aktualu gydant veido, rankų, kojų nudegimus.

Ikiklinikinių tyrimų apimtis ir rezultatai rodo, kad toksiškumo požiūriu daugiafermentinis biopreparatas yra saugus ir gali būti naudojamas farmacinių, kosmetinių ir antibakterinių kompozicijų gamyboje.

Daugiafermentinių kompleksų panaudojimas

Daugiafermentinio biopreparato taikymas išskiriamas į tris dalis. Šie biopreparatai gali būti panaudojami farmacinių, antibakterinių ir kosmetinių kompozicijų gamyboje. Taikymas priklauso nuo daugiafermentinių biopreparatų aktyvumo koncentracijos bei nuo pasirinkto fermento komplekso A arba B. Pirmuoju atveju kuriamos daugiafermentinio biopreparato kompozicijos, skirtos įvairios kilmės ir pobūdžio žaizdų gydymui. Antruoju kuriamos daugiafermentinio biopreparato kompozicijos, skirtos antibakterinių preparatų gamybai. Trečiuoju kuriamos daugiafermentinio biopreparato kompozicijos, skirtos odos priežiūrai ir odos susirgimų gydymui.

Daugiafermentinio biopreparato kompozicijų, skirtų žaizdų gydymui fermentų kompleksų A ir B koncentracijos gali varijuoti. Fermentų komplekso A ir B koncentracija gali būti 0 – 100 %.

Daugiafermentinio biopreparato kompozicijos žaizdų gijimui:

1. Hidrogelis nekrotinėms žaizdoms

Ingredientai	Koncentracija, %
Fermentų kompleksas A (70 %)+ B (30 %)	20
Natrio alginatas	3
Polietilenglikolis	20
Glicerolis	7
Vanduo	50

2. Hidrogelis III laipsnio nudegimams

Ingredientai	Koncentracija, %
Fermentų kompleksas A (50 %)+ B (50 %)	30
Natrio alginatas	3
Polietilenglikolis	20
Glicerolis	6
Vanduo	40
Šaltalankių aliejus	1

3. Hidrogelis I ir II laipsnio nudegimams

Ingredientai	Koncentracija, %
Fermentų kompleksas A (60 %)+ B (40 %)	20
Natrio alginatas	3
Polietilenglikolis	20
Glicerolis	6
Vanduo	50
Šaltalankių aliejus	1

4. Hidrogelis opoms ir praguloms

Ingredientai	Koncentracija, %
Fermentų kompleksas A (20 %)+ B (80 %)	20
Natrio alginatas	3

Polietilenglikolis	20
Glicerolis	5
Vanduo	50
Šaltalankių aliejus	1
Medetkų tinktūra	1

5. Hidrogelis infekuotom žaizdoms

Ingredientai	Koncentracija, %
Fermentų kompleksas A (90 %)+ B (10 %)	30
Natrio alginatas	3
Polietilenglikolis	20
Glicerolis	7
Vanduo	40

DAUGIAFERMENTINIO BIOPREPARATO KOMPOZICIJOS ŽAIZDŲ GIJIMUI EFEKTYVUMAS

Buvo atliktas daugiafermentinio biopreparato kompozicijų – hidrogelių, skirtų žaizdų gydymui randomizuotas, kontroliuojamas, viengubai aklas, paralelinių grupių klinikinis tyrimas. Buvo atrinkti 80 pacientų patyrę dilbių ir plaštakų 2B° odos storio nudegimus. Nudegimai gydyti daugiafermentinio biopreparato kompozicijų – hidrogelių aplikacijomis ant žaizdos paviršiaus, perrišimai su marliniais tvarsčiais kiekvieną dieną iki visiškos nudegimo žaizdos epitelizacijos. Pacientai apžiūrimi ir žaizdos buvo vertinamos šiomis dienomis (nuo nudegimo dienos): 0-3 (patekimas į ligoninės stacionarą); 7(±1); 14(±1); 21(±1). Šiomis dienomis buvo įvertinti klinikiniai reiškiniai žaizdoje (žaizdos ilgis, plotis, gylis, išskyros, eritema, fliktacija, karštis lokaliai žaizdoje, skausmas/jautrumas palpuojant, patinimas/induracija, nekrozė, fibrinas, granuliacijos, epitelizacija) bei nufotografuota žaizda. Praėjus šešiams mėnesiams po nudegimo atliktas rezultatų įvertinimas praėjus aktyviam randų remodeliavimo procesui. Daugiafermentinio biopreparato kompozicijų – hidrogelių, skirtų žaizdų gydymui klinikinių tyrimų išvados:

Efektyviai absorbuoja eksudato perteklių;

Efektyviai valo žaizdos paviršių nuo negyvybingų audinių;

Efektyviai slopina infekcija;

Palaiko drėgną aplinką žaizdoje;

Sukuria optimalų mikroklimatą;

Neleidžia žaizdoms išdžiūti;

Nebūna žaizdos kraštų paraudimo;

Nesukelia skausmo tarp tvarstymų;

Skatina greitesni žaizdos užsivėrimą;

Nesukelia šalutinio poveikio;

Po gydymo nesusidaro randai;

Bet kurio tipo ir dydžio žaizdos vidutiniškai epitelizuojasi per 18 dienų.

Daugiafermentinio biopreparato kompozicijų, skirtų odos priežiūrai bei odos susirgimų gydymui, fermentų kompleksų A ir B koncentracijos gali varijuoti. Fermentų komplekso A ir B koncentracija gali būti 0 – 100 %.

Daugiafermentinio biopreparato kompozicijos odos priežiūrai ir gydymui:

1. Losjonas nušalimams/nudegimams

Ingredientai	Koncentracija, %
Fermentų kompleksas A (50 %)+ B (50 %)	10
Glicerolis	60
Šaltalankių aliejus	5
Vanduo	25

2. Losjonas nuospaudoms

Ingredientai	Koncentracija, %
Fermentų kompleksas A (50 %)+ B (50 %)	10
Glicerolis	60
Vanduo	30

3. Losjonas nuo randų

Ingredientai	Koncentracija, %
Fermentų kompleksas A (10 %)+ B (90 %)	10

Glicerolis	60
Medetkų tinktūra	5
Vanduo	25

Kremai:

5. Odos šveitiklis

Ingredientai	Koncentracija %
Fermentų kompleksas A (20 %)+ B (80 %)	5
Glicerolis	4
Vanduo	70
Polietilenglikolis	1
Sorbitano stearatas	5
Sorbitano oleatas	5
Kokosų aliejus	10

6. Išsausėjusiai odai

Ingredientai	Koncentracija, %
Fermentų kompleksas B (100 %)	10
Glicerolis	20
Vanduo	40
Polietilenglikolis	2
Sorbitano stearatas	6
Sorbitano oleatas	6
Kokosų aliejus	10
Šaltalankių aliejus	6

7. Pėdų priežiūrai

Ingredientai	Koncentracija, %
Fermentų kompleksas A (20 %) + B (80 %)	20
Glicerolis	20
Vanduo	30
Polietilenglikolis	1,5
Sorbitano stearatas	10
Sorbitano oleatas	10

Kokosų aliejus	5
Mėtų aliejus	3,5

8. Randams šalinti

Ingredientai	Koncentracija, %
Fermentų kompleksas B (100 %)	30
Glicerolis	20
Vanduo	20
Polietilenglikolis	1
Sorbitano stearatas	10
Sorbitano oleatas	10
Kokosų aliejus	8
Medetkų tinktūra	1

Daugiafermentinio biopreparato antibakterinė kompozicija:

1. Antibakterinis burnos gleivinės purškiklis

Ingredientai	Koncentracija, %
Fermentų kompleksas A (100 %)	10
Glicerolis	15
Vanduo	70
Šaltalankių aliejus	0,5
Mėtų aliejus	0,5
Medetkų tinktūra	4

SANTRUMPOS

B ląstelės – kraujo ląstelės, baltieji kraujo kūneliai, lemiantys organizmo humoralinį atsaką.

T ląstelės – kraujo ląstelės, priklausančios leukocitų agranulocitų grupei, viena iš limfocitų populiacijų.

NK ląstelės – pakitęs limfocitas, savo paviršiuje neturintis T ir B ląstelėms būdingų determinančių.

PDGF – trombocitų išskiriamas augimo faktorius.

EGF – epidermio augimo faktorius.

IGF-1 – į insuliną panašus augimo faktorius.

FGF – fibroblastų augimo faktorius.

TGF – β – transformuojantis augimo faktorius – β .

TGF – α – transformuojantis augimo faktorius – α .

IL – 1 – interleukinas 1 šeima (IL-1 šeima) yra 11 citokinų grupė, kuri vaidina pagrindinį vaidmenį imuninių ir uždegiminių reakcijų procesuose.

IFN γ – gama interferonas yra dimerizuotas tirpus citokinas.

bFGF – pagrindinis fibroblastų augimo faktorius.

KGF – keratinocitų augimo faktorius.

CTGF – jungiamojo audinio augimo faktorius.

VEGF – kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus.

Literatūros sąrašas

1. Schultz, Gregory S., et al. "Wound bed preparation: a systematic approach to wound management." *Wound repair and regeneration* 11.s1 (2003): S1-S28.
2. Falabella, Anna F. "Debridement and wound bed preparation." *Dermatologic Therapy* 19.6 (2006): 317-325.
3. Werner, Sabine, and Richard Grose. "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." *Physiological reviews* 83.3 (2003): 835-870.
4. Püllen, Rupert, et al. "Prospective randomized double-blind study of the wound-debriding effects of collagenase and fibrinolysin/deoxyribonuclease in pressure ulcers." *Age and ageing* 31.2 (2002): 126-130.
5. Ramundo, Janet, and Mikel Gray. "Enzymatic wound debridement." *Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing* 35.3 (2008): 273-280.
6. Wang, Xiao-Jing, et al. "Role of TGF β -mediated inflammation in cutaneous wound healing." *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Vol. 11. No. 1. Nature Publishing Group, 2006.
7. Tsirogianni K. A., Moutsopoulos N. M, Moutsopoulos H. M. Wound healing: Immunological aspects, *Injury, Int. J. Care Injured*, 2006, 37S:S5 – S12.
8. Martin, Paul. "Wound healing-aiming for perfect skin regeneration." *Science* 276.5309 (1997): 75-81.
9. Curtis, R., et al. "Accuzyme (R) Papain-Urea Ointment versus Collagenase Santyl (R) Ointment in the Treatment of Partial Thickness Burn Wounds: 191." *Journal of Burn Care & Research* 23 (2002): S136.
10. Shi, Lei, and Dennis Carson. "Collagenase Santyl ointment: a selective agent for wound debridement." *Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing* 36.6S (2009): S12-S16.
11. Kang, Jeehoon, et al. "Activated platelet supernatant can augment the angiogenic potential of human peripheral blood stem cells mobilized from bone marrow by G-CSF." *Journal of molecular and cellular cardiology* (2014).
12. Van Meijer, M., and H. Pannekoek. "Structure of plasminogen activator

inhibitor 1 (PAI-1) and its function in fibrinolysis: an update." *Fibrinolysis* 9.5 (1995): 263-276.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Daugiafermentinis biopreparatas, besiskiriantis tuo, kad jis apima *Streptomyces gougerotii* 101 produkuojamus fermentus, kurie pasižymi proteolitiniu, kolagenaziniu, esteraziniu, amilolitiniu, lipaziniu, gliukanaziniu, dezoksiribonukleaziniu ir lizuojančiu aktyvumais ir jų kompleksus.

2. Daugiafermentinis biopreparatas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad auginimo terpė apima *Streptomyces gougerotii* 101 produkuojamus fermentus pagal vieną iš induktorių, susidedančių iš mielių (fermentų kompleksas A) arba kolageno (fermentų kompleksas B).

3. Daugiafermentinis biopreparatas pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad auginimo terpė susideda iš skirtingų induktorių koncentracijų.

4. Daugiafermentinis biopreparatas pagal bet kurį iš 1-3 punktų, besiskiriantis tuo, kad preparatas apima A ir B kompleksus kartu arba atskirai.

5. Daugiafermentinis biopreparatas pagal bet kurį iš 1-4 punktų, besiskiriantis tuo, kad A ir B kompleksų koncentracijos yra nuo 0 iki 100%.

6. Daugiafermentinio biopreparato pagal bet kurį iš 1-5 punktų gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad apima šias pakopas:

- a) A ir B fermentų kompleksų paruošimą;
- b) A ir B fermentų kompleksų koncentravimą ir frakcionavimą;
- c) A ir B fermentų kompleksų apdorojimą pagrindiniais baltymų išsodinimo agentais, tokiais kaip neorganinėmis druskomis (pvz. NH_4SO_4 , CaCl_2), ketonais (pvz. CH_3COCH_3), sočiais alifatiniais alkoholiais (pvz. $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) ir kt.;
- d) A ir B kompleksų chromatografinį atskyrimą;
- e) A ir B kompleksų stabilizavimą sočiais alifatiniais polihidroksiliais

alkoholiais, kurių anglies skeleto ilgis ne trumpesnis negu C₃ (pvz. gliceroliu, sorbitoliu, polivinilo alkoholiu);

f) pasirinktinai A ir B kompleksų maišymą.

7. Daugiafermentinio biopreparato gavimo būdas pagal 6 punktą, besiskiriantis tuo, kad A ir B fermentų kompleksai b) pakopoje koncentruojami ultrafiltracijos arba vakuuminio garinimo būdu.

8. Daugiafermentinio biopreparato gavimo būdas pagal 6 punktą, besiskiriantis tuo, kad A ir B fermentų kompleksai frakcionuojami ultrafiltracijos būdu, tam panaudojant 5, 10, 15 ir 50 kDa membranas.

9. Daugiafermentinis biopreparatas pagal bet kurį iš 1-5 punktų, besiskiriantis tuo, kad jis lizuoja mikroorganizmus: *Micrococcus lysodeicticus*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus haemolyticus*, *Streptococcus paracitrovorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* 078, *Escherichia coli* 12K, *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*.

10. Kosmetinė arba farmacinė kompozicija, apimanti daugiafermentinį biopreparatą pagal bet kurį iš 1-5 ir 9 punktų ir kosmetiniu arba farmaciniu požiūriu priimtina užpildą, skirta panaudoti žaizdų gijimo skatinimui ir odos būklės gerinimui.

11. Kosmetinė arba farmacinė kompozicija pagal 10 punktą, skirta panaudoti imuninės sistemos stimuliavimui, skirtingų žaizdų gydymui, odos priežiūrai ir gydymui ir bakterinių ligų gydymui.

12. Kompozicija, skirta panaudoti pagal 10 ir 11 punktus, besiskirianti tuo, kad kompozicija su padidintu lipaziniu aktyvumu yra skirta chroninėms ir sunkiai gyjančioms žaizdoms gydyti.

13. Kompozicija, skirta panaudoti pagal 10 ir 11 punktus, besiskirianti tuo, kad kompozicija su padidintu lizuojančiu ir gliukanaziniu aktyvumais yra skirta infekuotoms žaizdoms gydyti.

14. Kompozicija, skirta panaudoti pagal 10 ir 11 punktus, besiskirianti tuo, kad kompozicija su padidintu proteolitiniu ir kolagenaziniu aktyvumais yra skirta nekrotinėms žaizdoms gydyti.

15. Kompozicija, skirta panaudoti pagal 10 ir 11 punktus, besiskirianti tuo, kad kompozicija su pamažintu fermentinių aktyvumu yra skirta odos priežiūrai ir odos susirgimų gydymui.

16. Kompozicija, skirta panaudoti pagal 10 ir 11 punktus, besiskirianti tuo, kad kompozicija yra skirta antibakterinių preparatų gamybai.

17. Kompozicija, skirta panaudoti pagal bet kurį iš 10 – 16 punktų, besiskirianti tuo, kad kompozicija yra skystos, tepalo ir hidrogelio formos.

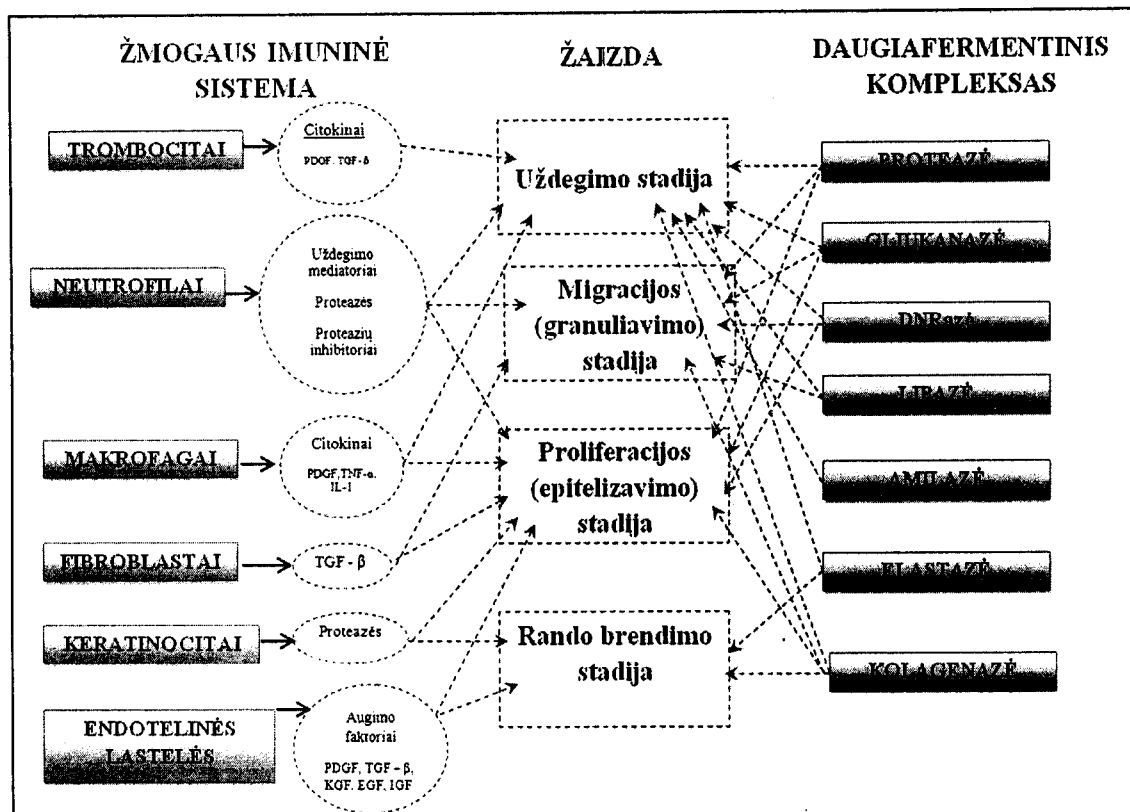


Fig. 1

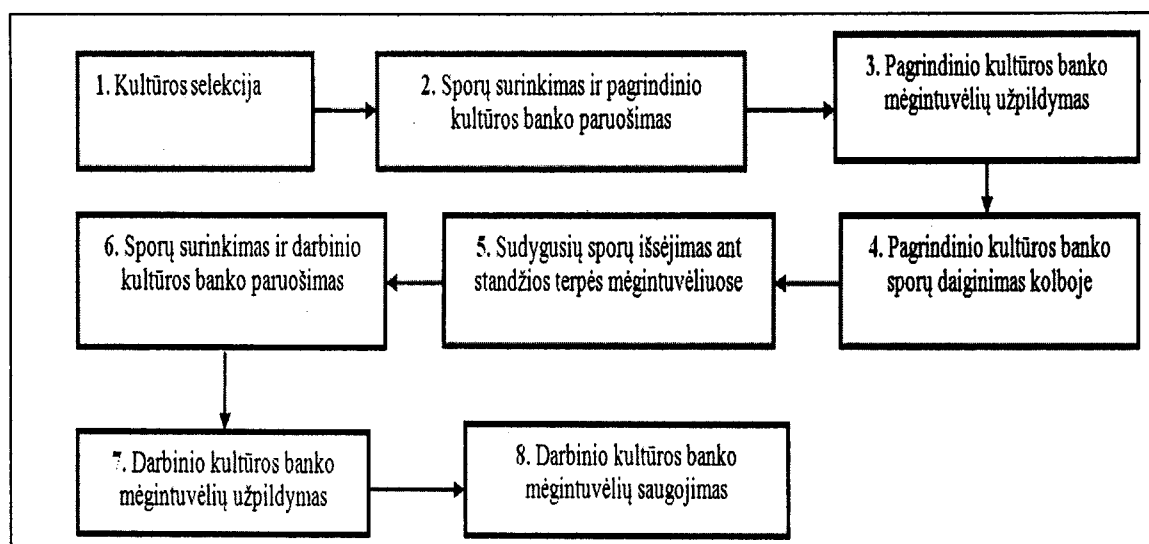


Fig. 2

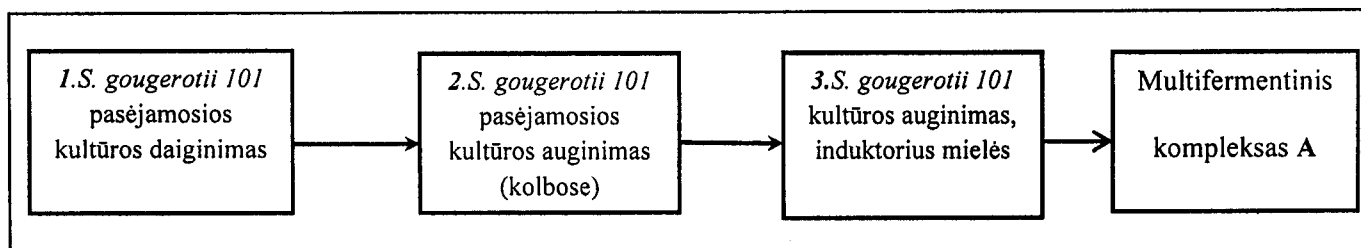


Fig. 3

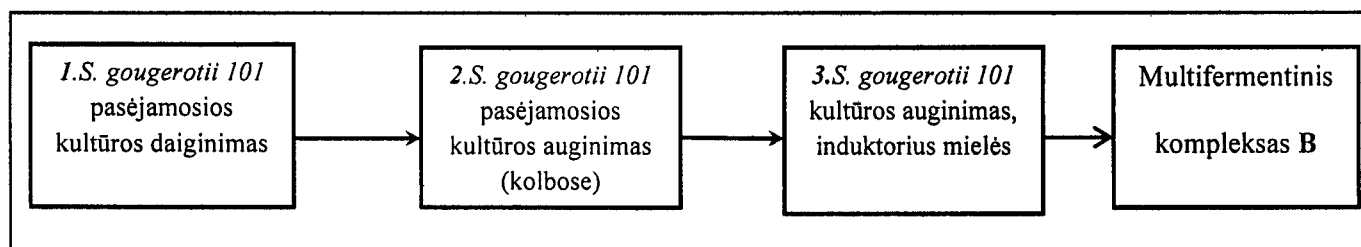


Fig. 4

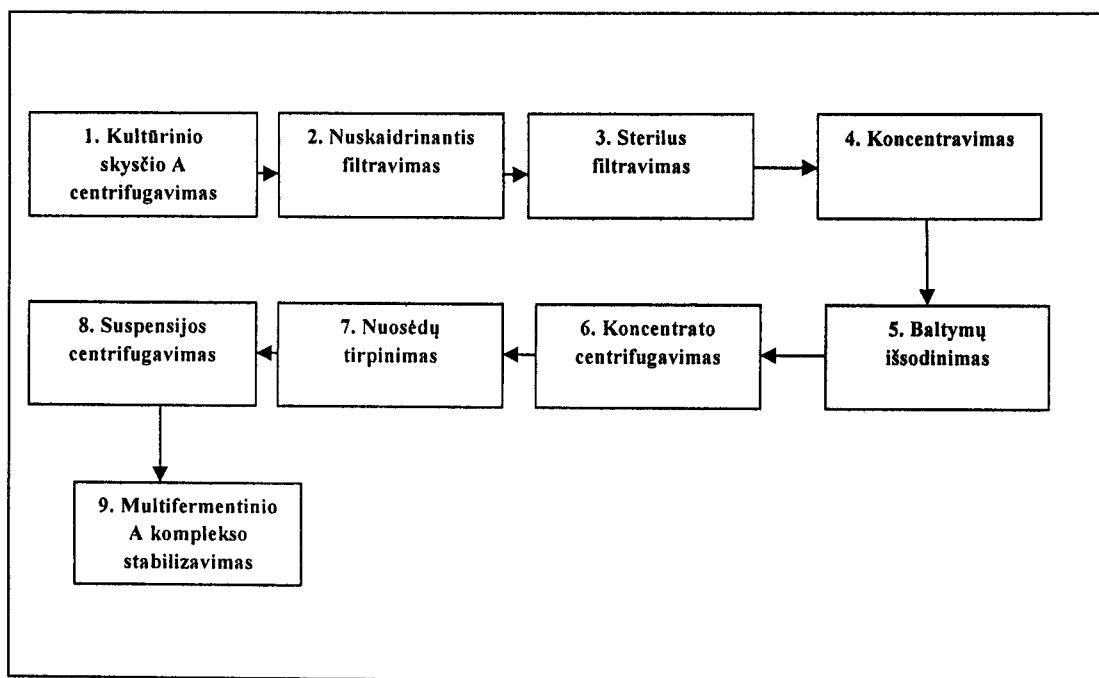


Fig. 5

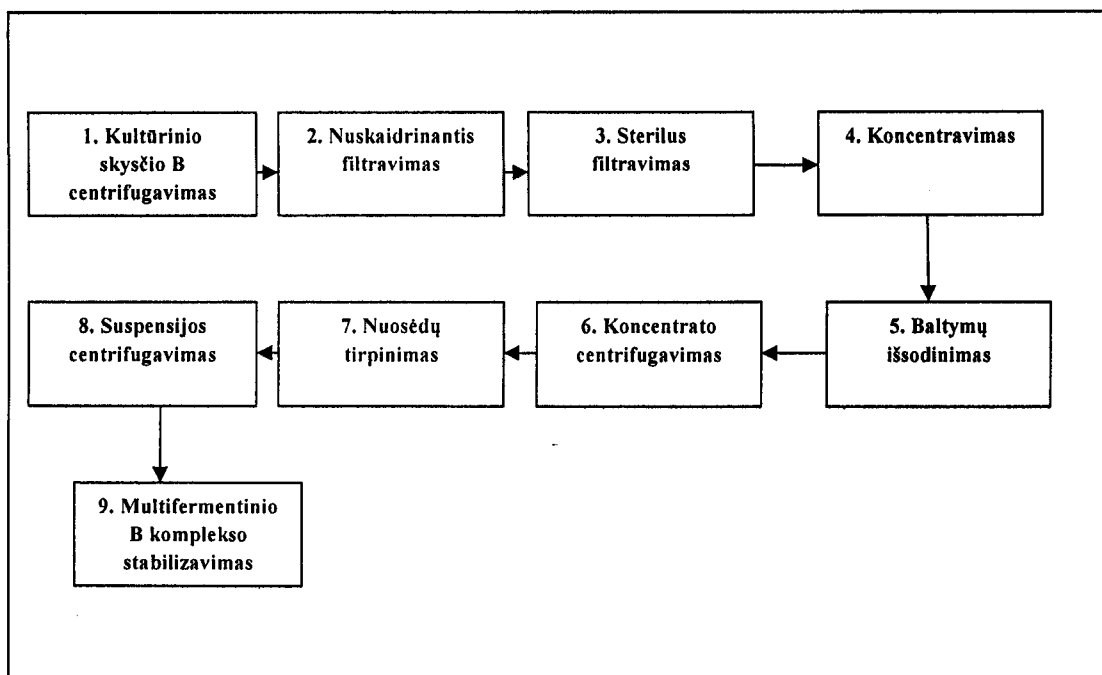


Fig. 6

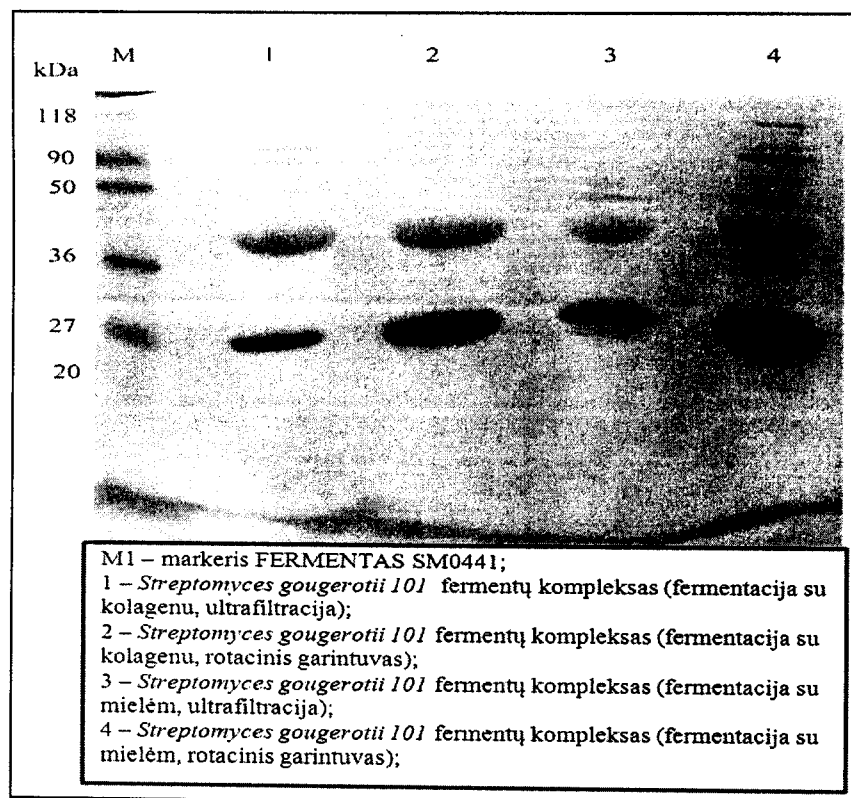


Fig. 7

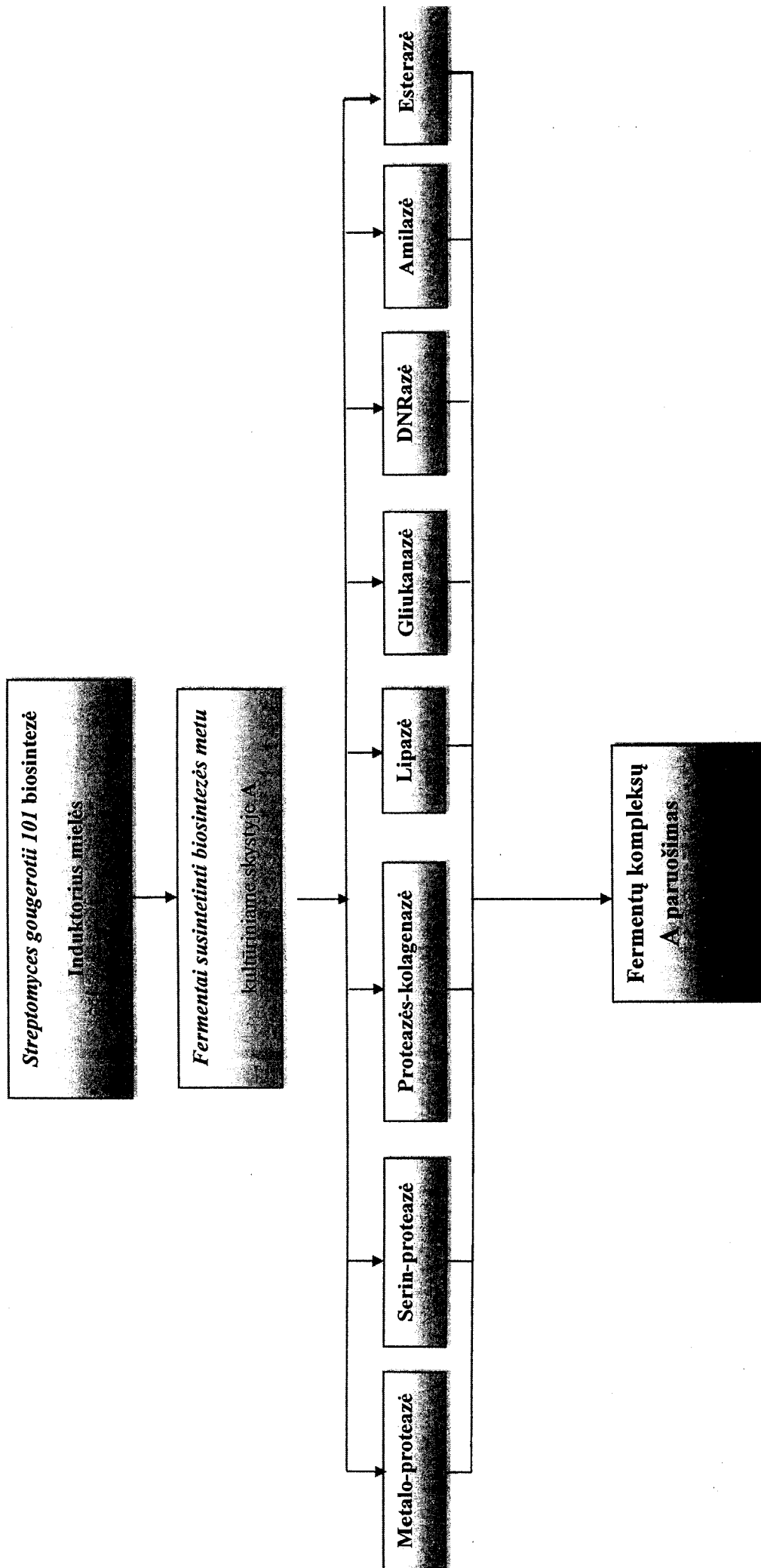


Fig. 8

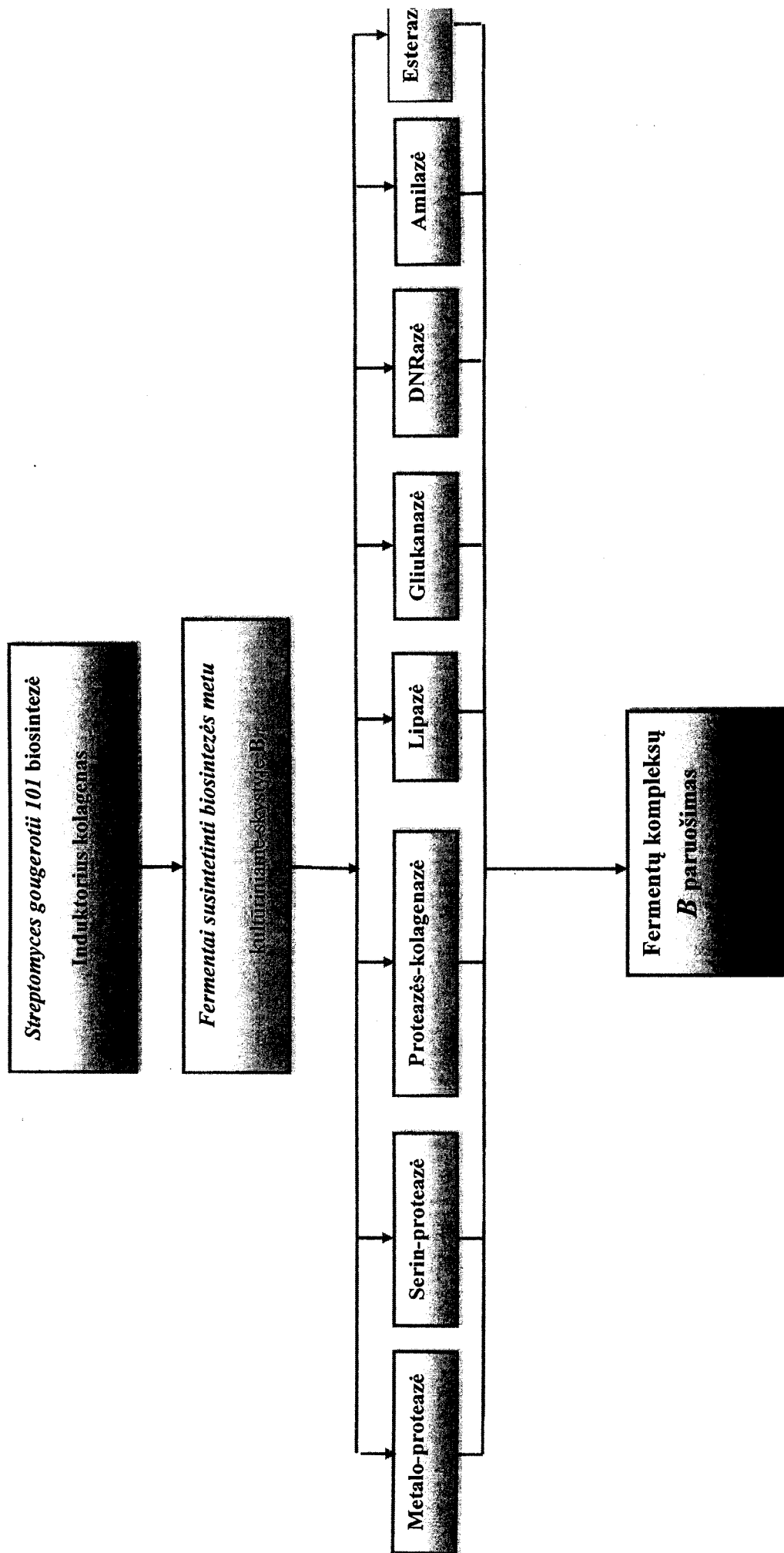


Fig. 9

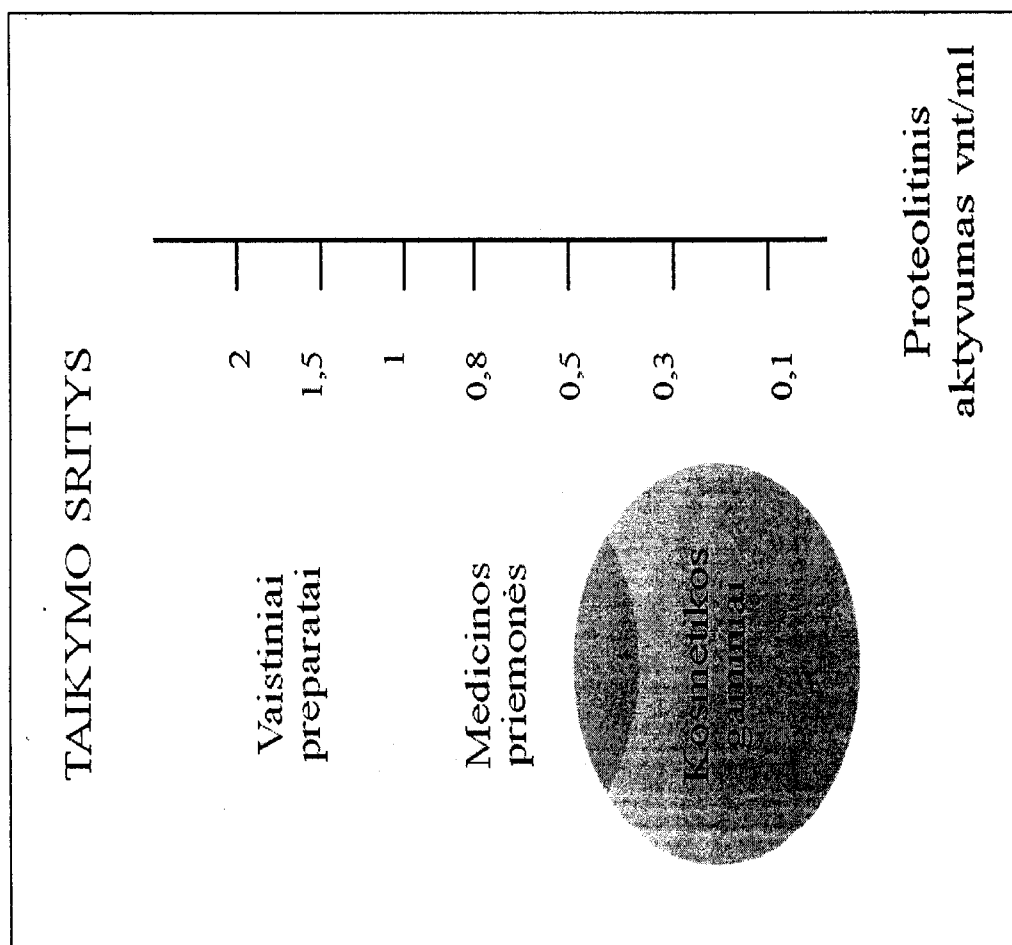


Fig. 10

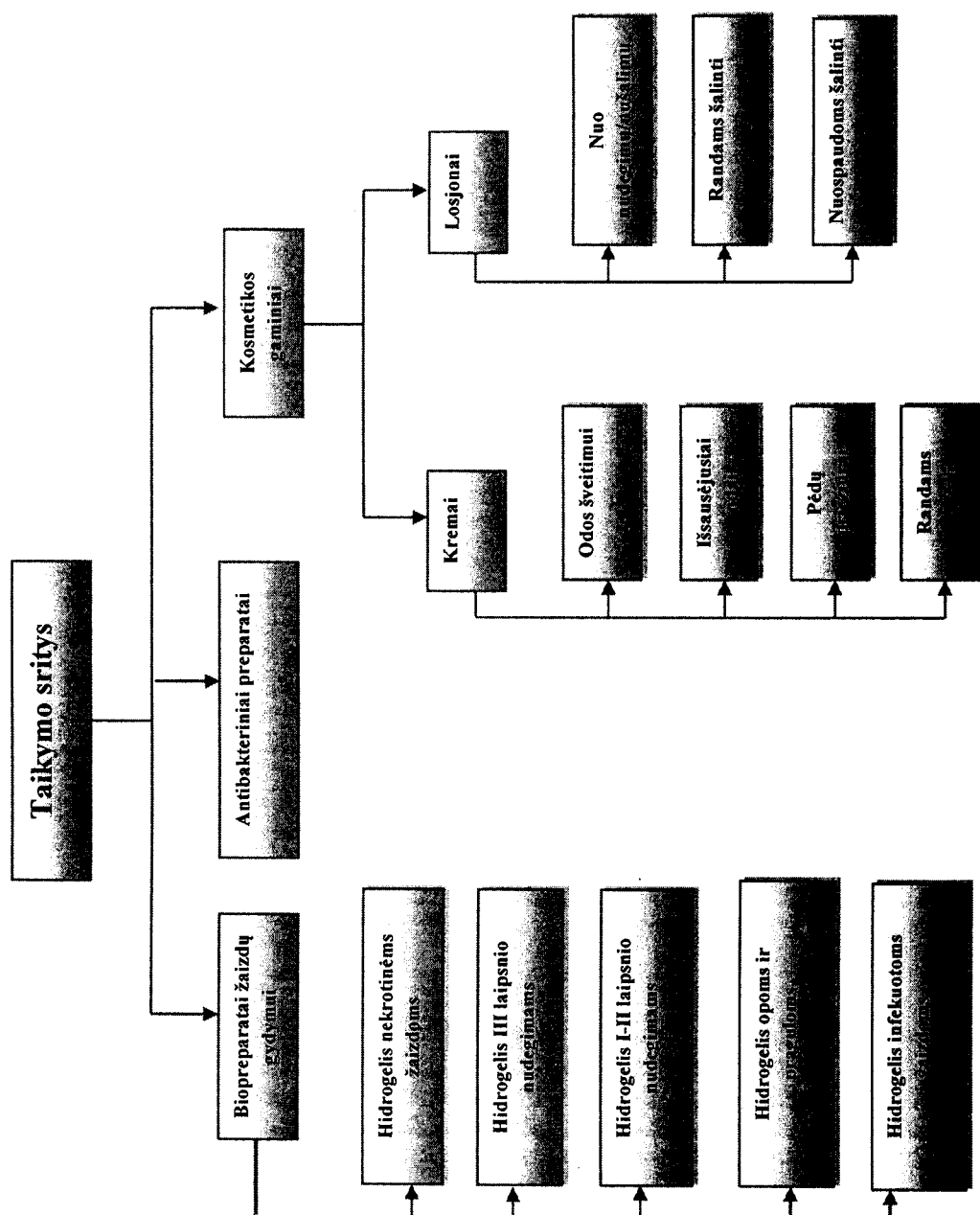


Fig. 11