



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl⁶: **A 61 K 38/46**
- (21) Patentansøgning nr: **PA 1990 00168**
- (22) Indleveringsdag: **1990-01-22**
- (24) Løbedag: **1988-05-26**
- (41) Alm. tilgængelig: **1990-01-22**
- (45) Patentets meddelelse bkg. den: **1999-12-20**
- (86) International ansøgning nr: **PCT/US88/01785**
- (86) International indleveringsdag: **1988-05-26**
- (85) Videreførelsesdag: **1988-05-26**
- (73) Patenthaver: **Nika Health Products, Ltd., 36 Staedtle, Vaduz, Liechtenstein**
- (72) Opfinder: **Witold Kiczka, 8 Lawrenceville Road, Princeton, N.J. 08540, USA**
- (74) Fuldmægtig: **Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1553 København V, Danmark**
-
- (54) Benævnelse: **Anvendelse af en lysozym-dimer og/eller en ribonuclease-dimer til fremstilling af et lægemiddel til behandling af virus- eller bakterieinfektioner**
- (56) Fremdragne publikationer:
European Journal of Cancer, vol 15, 1979, side 85-91
Chemical Abstracts, vol 81, 1974, nr. 132193x
Chemical Abstracts, vol 85, 1976, nr. 186754g
Chemical Abstracts, vol 84, 1976, nr. 173704v
Journal of the American Chemical Society, 93:18, 1971, side 4579-4585.
- (57) Sammendrag:
Der anføres en forbindelse med antivirale eller antibakterielle virkninger, der består af de dimere former af enzymer valgt fra gruppen bestående af lysozym og ribonuclease samt en farmaceutisk acceptabel bærer. Disse dimere former er mere virkningsfulde ved behandlingen af forskellige humane eller veterinære sygdomme, fordi de er meget mindre cytotoxiske end de monomere former af enzymet. En fremgangsmåde til anvendelse af disse forbindelser anføres ligeledes bestående af tilførsel af en virkningsfuld mængde af forbindelsen til det inficerede område.

Den foreliggende opfindelse angår anvendelsen af en lysozym-dimer og/eller en ribonuclease-dimer samt en farmaceutisk acceptabel bærer til fremstilling af et lægemiddel til behandling af virus- eller bakterieinfektioner, fortrinsvis i en koncentration på 0,001-20,0 mg dimer(er) pr. ml af den farmaceutisk acceptable bærer.

- 5 Det til stadighed voksende antal bakteriestammer og virussygdomme, som er resistente over for antibiotika, har gjort det nødvendigt at fremskaffe nye medikamenter for at kunne behandle mennesker og dyr. Blandt de mange kendte behandlinger og medikamenter er det kendt at anvende enzymer i monomer form for at tilejbringe en terapeutisk virkning hos patienter, som lider af forskellige sygdomme. Enzymer er katalytisk aktive
- 10 proteiner, som styrer næsten alle vigtige livsprocesser i organismer. Således er mange enzymer, enten individuelt eller i bestemte kombinationer, blevet isoleret efter deres fysisk-kemiske, fysiologiske eller biologiske virkninger.

- Blandt de forskellige enzymer, for hvilke der er blevet dokumenteret en terapeutisk virkning, er lysozym og ribonuclease. Lysozym har været kendt siden 1922, det år hvor
- 15 det blev opdaget af Fleming. Først efter 1950 blev den enzymatiske virkning af lysozym imidlertid fastslået. Siden da har stoffet været genstand for intense fysisk-kemiske, fysiologiske og kliniske undersøgelser, men udstrækningen af denne forbindelses biologiske betydning er endnu ikke blevet bestemt. Hidtil er der iagttaget forskellige terapeutiske egenskaber ved lysozym, som f.eks. antivirale, antibakterielle, antiinflammatoriske
- 20 og antihistamine egenskaber. Den antibakterielle virkning er tilsyneladende baseret på hydrolyse af β -1-4-glycosid-bindingen mellem N-acetylmuraminsyre og N-acetylglucosamin, som begge er indeholdt i bakteriecellevæggen.

- Tilstedeværelsen af lysozym i fagocytiske celler er ligeledes veldokumenteret. Forskning på dette område har vist, at det intracellulære lysozym, som er indeholdt i fagocyter, er
- 25 ansvarligt for fordøjelse af fagocytiserede bakterier. Hos mennesker er det blevet iagttaget, at lysozym stimulerer fagocytosen ved en fysiologisk koncentration på 10-400 mg/ml.

Der er blevet dokumenteret andre egenskaber for lysozym. For eksempel ser det ud til, at lysozym reducerer legemstemperaturen under en infektionsproces, hvor temperaturen er en reaktion på endogene feberfremkaldende stoffer, som er frigjort af toksiner. Tilsyneladende deltager lysozym også i immunologiske processer ved at stimulere syntesen af gammaglobuliner, opsoniner og andre antistoffer. Det er yderligere blevet foreslået, at lysozym har en stærkt antiinflammatorisk virkning. Trods disse kendte bedrende egenskaber ved lysozym og trods talrige forskningsprojekter baseret på lysozym har anvendelsen af dette enzym til terapeutiske formål imidlertid været stærkt begrænset.

En anden gruppe af enzymer, som er blevet undersøgt for deres forskellige biologiske virkninger, er ribonucleaserne. Disse er en gruppe enzymer, som i almindelighed findes i mange dyre- og planteorganismer samt i bakterieceller. Undersøgelsen af deres egenskaber og forskning i isolationsmetoder blev påbegyndt i 1955 af Schmidt og McDonald. Blandt resultaterne baseret på dette enzym blev det påvist, at aktiviteten af ribonuclease i cancervæv blev stærkt reduceret. Det blev for eksempel påvist, at leukæmogene vira drastisk mindskede aktiviteten af sur ribonuclease i mus. Hos mus med viral leukæmi påvistes også en bemærkelsesværdig mindskelse af ribonucleaseaktiviteten i mitochondria og mikrosomale dele udtaget fra miltvæv i disse dyr.

De ovenfor anførte undersøgelser antyder, at nedgangen i ribonucleaseaktiviteten på en eller anden måde er tæt forbundet med de virusfremkaldte infektioner. Det er således blevet foreslået, at ribonucleaseenzymer kan være i besiddelse af nogen antiviral aktivitet. Hidtil er der imidlertid ikke fremkommet nogen rapporter om fremstilling af forbindelser under anvendelse af dette enzym som et antiviralt middel.

En af hovedårsagerne til, at sådanne potentielt gavnlige enzymeres terapeutiske virkning ikke er blevet anvendt, er de iagttagne cytotoxiske virkninger af de monomere former af disse og andre enzymer. I undersøgelser med dyrkede fibroblaster er der iagttaget cytotoxiske virkninger både fra lysozym- og ribonucleasemonomerer selv i meget små mængder. De potentielt gavnlige virkninger af disse og andre enzymer kunne klart

opnås, hvis der kunne udvikles en effektiv måde til at kontrollere disse cytotoxiske virkninger. Det er derfor ønskeligt at udvikle forbindelser baseret på lysozym, ribonuclease eller andre lignende enzymer, der effektivt kan anvendes til behandling af virale eller bakterielle sygdomme eller andre skadelige tilstande uden de cytotoxiske virkninger, som normalt iagttages, når enzymer anvendes i den monomere form.

I overensstemmelse med den foreliggende opfindelse er det blevet påvist, at der kan fremstilles en antiviral eller antibakteriel forbindelse, som alligevel ikke har en cytotoxisk virkning, ved anvendelse af de dimere former af enzymerne. Ved at fremstille forbindelser, der som aktive ingredienser har en lysozym- eller ribonucleasedimer og en farmaceutisk acceptabel bærer, kan et antal infektionssygdomme behandles med succes uden væsentlige cytotoxiske virkninger.

De antivirale og antibakterielle forbindelser, som anvendes ifølge den foreliggende opfindelse, kan fremstilles ved først at tilvejebringe lysozym og ribonuclease i deres monomere form. Lysozym-monomeren (katalog nr. 28260) og ribonuclease-monomeren (katalog nr. 34388), der anvendes til fremstilling af forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse, blev fremskaffet fra Serva Feine Biochemica, GmbH und Co., D-69000 Heidelberg. Disse enzymmonomerer kan polymeriseres til dimerer ved en hvilken som helst kendt fremgangsmåde. Særlig foretrukket er enzympolymerisationen udført og angivet i Carlson et al., *Biochemistry Journal*, 173: 723-737 (1978). Andre fremgangsmåder kan ligeledes anvendes, som f.eks. beskrevet i Sorrentino et al., *Eur. J., Biochem.*, 124: 183-189 (1982). Det er iagttaget, at en særlig anvendelig ribonucleasedimer, som kan benyttes i de ifølge den foreliggende opfindelse anvendte forbindelser, er en dimer fremstillet af pancreatisk ribonuclease A, isoleret fra animalsk pancreasvæv.

Det er blevet iagttaget, at forbindelser, der som den aktive ingrediens indeholder en lysozym- eller ribonucleasedimer og en farmaceutisk aktiv bærer, er virkningsfulde ved behandling af forskellig bakterielle og virale sygdomme uden uønskede cytotoxiske effekter. Disse potentielle skadelige virkninger af enzymerne blev kontrolleret ved

sammenlignende undersøgelser under anvendelse af både de monomere og dimere former af lysozym og ribonuclease. Ved disse undersøgelser blev der administreret forskellige koncentrationer af monomerer og dimerer af lysozym og ribonuclease til kulturer af nyrefibroblaster fra en grøn marekat (Green Monkey Kidney; GMK). Det fandtes, at lysozym-monomeren var cytotoxisk for fibroblasterne efter 24 timer ved koncentrationer mellem 0,1 mg/ml og 1,0 mg/ml. Efter tre dages inkubation fandtes en cytotoxisk virkning på fibroblaster selv ved koncentrationer på 0,01 mg/ml, hvilket påvirkede 50% af de inkuberede celler. Efter tre dage var 75% af de dyrkede celler påvirket af den cytotoxiske virkning af lysozym-monomeren ved koncentrationer mellem 1,0 og 0,1 mg/ml. Til sammenligning udviste lysozym-dimeren ingen cytotoxisk virkning i nogen af de koncentrationer, som anvendtes ved disse undersøgelser, selv ikke efter syv dage. Disse undersøgelser viste, at den dimere form af lysozym tilnærmelsesvis var 100 gange mindre toksisk for GMK-fibroblaster end den monomere form.

Undersøgelsen med hensyn til ribonuclease viste en lignende mangel på cytotoxisk virkning af den dimere form. Ribonuclease viste sig i undersøgelsen at være cytotoxisk for GMK-fibroblaster i en fem dage gammel kultur i koncentrationer helt ned til 0,0001 mg/m. Efter syv dages dyrkning eliminerede cytotoxiske virkninger af ribonucleasemonomeren de dyrkede celler 100% ved koncentrationer fra 0,01 mg/ml og opefter. I modsætning hertil havde ribonucleasedimeren ingen cytotoxisk virkning overhovedet på GMK-fibroblasterne ved alle koncentrationsniveauer, selv ikke efter syv dages inkubation. Den dimere form af ribonuclease fandtes derfor at være omtrent 1000-10.000 gange mindre toksisk over for fibroblaster end den monomere form. Disse undersøgelser viste klart, at de cytotoxiske virkninger, som normalt ledsager anvendelsen af de monomere former af enzymer, som f.eks. lysozym og ribonuclease, faktisk kan elimineres, hvis disse enzymer anvendtes i deres dimere former.

Videre forskning har vist, at lysozym og ribonuclease i deres dimere former, trods manglen på nævneværdige cytotoxiske virkninger, kan være ekstremt virkningsfulde ved behandlingen af virale og bakterielle infektioner. I undersøgelser, som omfatter

befrugtede hønseæg og en Sendai-virusstamme, blev en lysozym-dimer injiceret intraamniotisk i æg i forskellige koncentrationer. Der blev også injiceret to enheder Sendai-virus i hvert æg. Efter inkubation blev amnionvæsken og den allantoiske væske indsamlet fra de smittede æg og kontrolæggen, og en sammenligning fandt sted. Disse undersøgelser indikerede, at lysozym-dimeren var i stand til at hæmme formeringen af Sendai-viruset, som dyrkedes i ti dage gamle, befrugtede hønseæg, selv ved koncentrationer så lave som 0,01 mg/ml. Lignende undersøgelser med anvendelse af lysozym- og ribonuclease-dimerer har vist en bakteriostatisk virkning af disse dimere enzymer på stammer af streptokok-bakterier. Forbindelser af lysozym- eller ribonuclease-dimerer anvendt ifølge den foreliggende opfindelse kan derfor benyttes til at behandle forskellige virale og bakterielle infektioner. Forbindelserne kan fremstilles i forskellige former, og administrationen af disse enzym-bærerforbindelser kan gennemføres internt eller eksternt for en bestemt human eller veterinær patient afhængigt af den sygdom, som skal behandles. Til interne sygdomme, som f.eks. mellemørebetændelse, mastitis, mave- eller vaginalinfektioner, kan de dimere forbindelser ifølge opfindelsen passende fremstilles og administreres oralt, intravenøst, parenteralt, via suppositorier eller på enhver anden metode, som vil gøre det muligt for den dimere opløsning at nå det inficerede område. Under eksterne forhold, som f.eks. virale eller bakterielle hudsygdomme, betændte sår, herpes eller andre kønssygdomme med eksterne virkninger, kan forbindelserne ifølge opfindelsen administreres topisk på patienten i enhver egnet form.

Den foreliggende natur af den sygdom eller infektion, som skal behandles, vil derfor bestemme den rette form af forbindelsen ifølge den foreliggende opfindelse. Til eksterne behandling kan forbindelsen administreres i så forskellige former som salver, lotioner, opløsninger, olier etc. Hvor en intern anvendelse er nødvendig, kan der anvendes et antal passende former, som f.eks. dråber, tabletter, opløsninger, kapsler, tandpastaer etc. Den foreliggende form af opfindelsen, som indgives til patienten, vil således også bestemme naturen af den farmaceutisk acceptable bærer, som anvendes i den dimere enzymforbindelse. Blandt de mange egnede bærere, som kan anvendes, er hydrofile

baser, fysiologisk acceptable saltopløsninger, vand, salver (fortrinsvis bestående af vand, paraffin og propylenglycol) og puddere.

Fysiologisk acceptable saltopløsninger foretrækkes; de mest foretrukne er sådanne, hvori saltopløsningen er en 0,5-1,5% NaCl-opløsning.

- 5 Koncentrationen af dimeren i sammensætningen er fra 0,001 til 20,0 mg/ml. De foretrukne koncentrationsområder fra dimeren er: omkring 0,02 mg/ml vand, når den farmaceutisk acceptable bærer er vand; omkring 0,02 mg/ml salve; 0,08-4 mg/ml, når den farmaceutisk acceptable bærer er en saltopløsning, og 10 mg pr. 2 ml af den hydrofile base.
- 10 Der er således med den foreliggende opfindelse tilvejebragt en enzymatisk behandling af virale eller bakterielle infektioner uden cytotoxiske virkninger ved til en human eller veterinær patient at administrere en effektiv mængde af de ovennævnte dimere forbindelser. Med en effektiv mængde skal der forstås den mængde, som er nødvendig til at tilvejebringe antivirale eller antibakterielle virkninger. Den nødvendige mængde til at
- 15 udvirke en behandling vil variere i det enkelte tilfælde afhængigt af den behandlede sygdoms natur og formen af den anvendte dimere forbindelse. I almindelighed administreres forbindelsen ifølge opfindelsen i et dosisniveau fra 0,01 til 50,0 mg/kg legemsvægt, med et særligt foretrukket interval mellem 1,0 og 2,0 mg/kg legemsvægt. I tilfælde med topisk behandling er salver, som er fremstillet under anvendelse af ca. 4,0 mg
- 20 dimer i 200 ml af en opløsning af vand, paraffin og propylenglycol, virkningsfulde, hvis de påføres 4-5 gange om dagen. Doser inden for disse intervaller skulle være tilstrækkelige til at behandle et antal virale eller bakterielle sygdomme uden de skadelige virkninger, som ville ledsage behandlinger med enzymmonomerer.

- De følgende eksempler er kun illustrative for den foreliggende opfindelse og skal ikke
- 25 på nogen måde begrænse omfanget af denne.

Eksempel 1

Sammenlignende undersøgelser blev udført med henblik på den cytotoxiske virkning af monomere og dimere former af lysozym og pancreatisk ribonuclease A på en kultur af nyrefibroblaster fra en grøn marekat (GMK). Disse undersøgelser blev udført ved at tilføje monomerer og dimerer til fibroblast-kulturen i koncentrationer på mellem 0,001 og 1,0 mg/ml. Kulturene stilledes derpå til inkubation i syv dage, hvorefter kulturene blev undersøgt for cytotoxiske virkninger. Resultaterne af disse undersøgelser er anført i tabellerne 1 og 2.

Som det kan ses i tabel 1, viste lysozym sig at være cytotoxisk for fibroblaster efter 24 timer i koncentrationer på mellem 0,1 og 1,0 mg/ml. Efter tre dages inkubation udviste monomeren cytotoxiske virkninger på fibroblaster allerede ved en koncentration på 0,01 mg/ml med påvirkning af 50% af de inkuberede celler. Efter fem dage var 75% af de dyrkede celler påvirket af cytotoxisk aktivitet fra lysozymmonomeren ved koncentrationer mellem 1,0 mg/ml og 0,1 mg/ml.

I modsætning hertil udviste den dimere form af lysozym ingen cytotoxisk virkning i nogen af de koncentrationer, som anvendtes ved undersøgelsen, selv ikke efter afslutningen af de syv dages inkubation. Undersøgelsen viste således, at lysozym-dimeren var omtrent 100 gange mindre toksisk for GMK-fibroblaster end lysozym-monomeren.

Som det fremgår af tabel 2, viste monomeren af pancreatisk ribonuclease A sig at være cytotoxisk for GMK-fibroblaster i fem dages kultur, selv ved koncentrationer så lave som 0,0001 mg/ml. Efter syv dages dyrkning var den cytotoxiske virkning af pancreatisk ribonuclease A i koncentrationer på over 0,01 mg/ml tilstrækkelig stærk til at eliminere 100% af de dyrkede celler.

Som det var tilfældet med lysozym-dimeren, udviste den dimere form af pancreatisk ribonuclease A ingen cytotoxisk virkning på GMK-fibroblaster i nogen af de ved under-

søgelsen anvendte koncentrationer i løbet af de syv dage. Resultaterne indikerede således, at dimeren af pancreatisk ribonuclease A var omtrent 1000 til 10.000 gange mindre toksisk for GMK-fibroblaster end monomeren af pancreatisk ribonuclease A.

TABEL 1

5 Undersøgelse af den cytotoxiske virkning af den monomere og den dimere form af lysozym					
Type af præparat	konc. mg/ml	Efter 24 h	Efter 3 dage	Efter 5 dage	Efter 7 dage
Kontrol			0	0	0
10 Lysozym MONOMER	1,0	2	2	3	3
	0,1	1	2	3	3
	0,01	0	2	2	2
	0,001	0	0	0	0
	0,0001	0	0	0	0
Lysozym DIMER	1,0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0
	0,01	0	0	0	0
	0,001	0	0	0	0
	0,0001	0	0	0	0
15	Undersøgelserne blev udført 3x på en kultur af GMK/grøn marekat nyrefibroblaster.				
	0 - cytotoxiske virkning = 0%	1 - cytotoxiske virkning = 25%			
	2 - cytotoxiske virkning = 50%	3 - cytotoxiske virkning = 75%			
	4 - cytotoxiske virkning = 100%				

TABEL 2

Undersøgelse af den cytotoxiske virkning af den monomere og den dimere form af pancreatisk ribonuclease A					
Type af præparat	konc. mg/ml	Efter 24 h	Efter 3 dage	Efter 5 dage	Efter 7 dage
Kontrol			0	0	0
Lysozym pancreatisk ribonuclease A MONOMER	1,0 0,1 0,01 0,001 0,0001	1 0 0 0 0	2 1 0 0 1	4 3 3 2 1	4 4 4 3 2
pancreatisk ribonuclease A DIMER	1,0 0,1 0,01 0,001	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
Undersøgelserne blev udført 3x på en kultur af GMK/grøn marekat nyrefibroblaster.					
0 - cytotoxiske virkning = 0%		1 - cytotoxiske virkning = 25%			
2 - cytotoxiske virkning = 50%		3 - cytotoxiske virkning = 75%			
4 - cytotoxiske virkning = 100%					

Eksempel 2

Dimeren af lysozym blev undersøgt med henblik på dennes antivirale virkninger. Ved eksperimenterne injiceredes lysozym-dimer ind i ti dage gamle, befrugtede hønseæg i koncentrationer på 10,0 mg/ml, 1,0 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml og 0,001 mg/ml.

5 En Sendai-virusstamme (hemagglutinations-titer = 1:128 HA) blev tilsat til hver koncentration af dimeren i en mængde på to hemagglutinationsenheder. Efter administrering af dimeren og viruset blev æggene inkuberet i 72 timer ved 37°C. Efter inkubationen blev amnionvæsken og den allantoiske væske indsamlet fra de smittede æg og underkastet en hemagglutinationstest ved hjælp af mikrometoder under anvendelse af et Takatsy-sæt og

10 hønseblodlegemer. Eksperimenterne blev derpå gentaget. De opnåede resultater fra disse eksperimentale undersøgelser vises i tabel 3. Som det ses af tabel 3, hæmmede lysozym-dimeren formeringen af Sendai-viruset dyrket i 10 dage gamle, befrugtede hønseæg, selv i koncentrationer så lave som 0,01 mg/ml.

TABEL 3

Virksomheden af lysozym-dimer på Sendai-virusstammer		
5 Koncentration af lysozym DIMER i mg/ml	Hemagglutination-inhibering/ hemagglutinationsundersøgelse på røde blodlegemer fra høns efter Takatsy-metoden	
	September 1987	November 1987
10,0	+++	ikke undersøgt
1,0	+++	+++
0,1	+++	+++
10 0,01	+++	+++
0,001	++	ingen inhibering
+++ -	fuld inhibering, 1:256	
++ -	begrænset inhibering, 1:32	

- 15 1. Undersøgelserne blev udført på Sendai-virusstammer. Den virale hemagglutinations-titer var 1:128 HA.
2. Ti dage gamle, befrugtede hønseæg tjente som eksperimentel model.
- 20 3. En identisk mængde Sendai-virus-2 hemagglutinationsenheder blev tilsat hver koncentration af lysozym-dimer. Samtidig iværksattes en kontrolundersøgelse for lysozym-dimeren for at fastslå, om denne har hemagglutinationsegenskaber - resultatet var negativt. På hinanden følgende koncentrationer af lysozym-dimer plus 22 HA enheder af viruset blev derpå anvendt til intraamnionalt at inficere 4 hønseæg. Æggene blev inkuberet i 72 timer ved 37°C.

4. Efter inkubationen blev amnionvæsken og den allantoiske væske indsamlet fra de smittede æg. En hemagglutinationstest blev gennemført (hemagglutinationalmikrometode) under anvendelse af et Takatsy-testsæt og røde blodlegemer fra høns.

Eksempel 3

- 5 Virkningerne af de dimere former af lysozym og pancreatisk ribonuclease A på bakterier blev undersøgt på adskillige patogene stammer indsamlet fra køer med mastitis. Virkningen af forskellige koncentrationer af lysozym-dimeren på tre stammer (*Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* og *S. liberis*) gengives i tabel 4. Disse undersøgelsesresultater viste, at alle tre *Streptococcus*-stammer var følsomme over for virkningen af lysozym-dimeren. Dette var mest indlysende i tilfældet med *S. liberis*, som blev påvirket af virkningen fra dimeren ved en koncentration så lav som 1,25 mg/ml. Bakteriostatiske virkninger på andre stammer af *Streptococcus* blev iagttaget ved koncentrationer fra omkring 10 mg/ml.

- I tabel 5 vises virkningerne af dimeren af pancreatisk ribonuclease A og lysozym på 15 patogene bakteriestammer dyrket fra humane patienter. Som det kan ses i tabellen, var dimeren af pancreatisk ribonuclease A mest virkningsfuld på bakteriestammer af *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* og *Proteus vulgaris*, især ved en koncentration på mellem 5 og 10 mg/ml. Bakteriestammer af *Staphylococcus* og *Streptococcus* fandtes 20 følsomme over for lysozym-dimeren, også ved koncentrationer på mellem 5 og 10 mg/ml. Der blev gennemført følsomhedsundersøgelser i overensstemmelse med almindeligt accepterede internationale principper anbefalet af WHO.

Eksempel 4

- Virkingen af dimeren af lysozym og pancreatisk ribonuclease A på formeringen af K-562 erythroleukæmicellelinier bestemmes ved at tilsætte forskellige koncentrationer 25 af dimererne til celler fra disse linier. Resultaterne af disse undersøgelser vises i tabeller-

ne 6 og 7. Kort sagt havde alle koncentrationer af lysozym-dimeren, som anvendtes ved eksperimentet, stærke cytopatogene virkninger på K-562-cellerne. Yderligere havde dimeren af pancreatisk ribonuclease A også, som det kan ses i tabel 7, en lignende virkning på erythroleukæmicellelinien, men kun ved koncentrationer omkring 1,0 mg/ml.

TABEL 4

MIC - Minimal inhiberende koncentration af lysozym-dimer i mg/ml.

Bakteriestammer dyrkedes på prøver indsamlet fra køer med mastitis.

Bakteriestammer	Lysozym-DIMER i mg/ml				
	1,25	2,5	5,0	10,0	20,0
10 Streptococcus agalactiae	+	+	+	-	-
Streptococcus dysgalactiae	+	+	+	-	-
Streptococcus liberis	-	-	-	-	-
- = ingen forering af bakterien					
+ = forering af bakterien					

15 Der blev gennemført følsomhedsundersøgelser i overensstemmelse med almindeligt accepterede internationale principper anbefalet af WHO.

TABEL 5

MIC - Minimal inhiberende koncentration af dimeren af pancreatisk ribonuclease A i mg/ml. Bakteriestammer dyrkedes på prøver indsamlet fra patienter.

	Bakteriestammer	Pancreatisk ribonuclease A-DIMER i mg/ml				Lysozym-DIMER i mg/ml			
		2,5	5,0	10,1	20,0	2,5	5,0	10,0	20,0
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-	-	+	+	+	+
	<i>Eschericia coli</i>	+	+	-	-	+	+	+	+
	<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	-	-	+	+	+	+
10	<i>Staph. aureus</i> /Standard stamme 209/ <i>Staph. aureus</i> / patogen stamme fra patienter	+	+	+	+	+	-	-	-
15	<i>Staph. aureus</i> MRSA stamme nr. 11704	+	+	+	+	+	+	-	-
20	<i>Staph. aureus</i> MRSA stamme nr. 11708	+	+	+	+	+	+	-	-
	<i>Strept. pyogenes</i> patogen stamme fra patient	+	+	+	+	+	-	-	-

+ = ingen formering af bakterien

25 - = formering af bakterien

MRSA - Methicilin Resistent *Staphylococcus aureus*. Stammer indsamlet fra patienter. Der gennemførtes følsomhedsundersøgelser i overensstemmelse med almindeligt accepterede internationale principper anbefalet af WHO.

TABEL 6

Virksomheden af lysozym-dimer på formeringen af K-562 erythroleukæmicellelinier. Celler af K-562 linien blev anvendt i en koncentration på 10^5 ml. Virksomheden bedømtes efter 72 timers dyrkning ved 37°C og med et 5% CO_2 -flow.

5	Koncentration af lysozym-DIMER i mg/ml	Formering af K-562 celler i 24 timers in vitro kultur	
		Antal celler	Procent døde celler
	Kontrol	190.000	2-3 %
	1,0	lysering af celler	100%
	0,1	107.000	95%
10	0,01	98.000	99%

TABEL 7

Virksomheden af dimeren af pancreatisk ribonuclease A på formeringen af K-562 erythroleukæmicellelinier. Celler af K-562 linien blev anvendt i en koncentration på 10^5 ml. Virksomheden bedømtes efter 72 timers dyrkning ved 37°C og med et 5% CO_2 -flow.

15	Koncentration af dimeren af pancreatisk ribonuclease A	Formering af K-562 celler i 24 timers in vitro kultur	
		Antal celler	Procent døde celler
	Kontrol	190.000	2-5 %
	1,0	68.000	74%
	0,1	140.000	14%
20	0,01	150.000	7%

Eksempel 5

Virksomheden af lysozym-dimeren på purulente otitis-medier i hunde blev undersøgt. Undersøgelsen udførtes under anvendelse af 19 hunde af forskellige racer med forskellige former for sygdommen. Sygdommen var karakteriseret ved en inflammatorisk proces, som i gennemsnit varede mellem 7 og 14 dage, men som i ét tilfælde varede i ni måneder. Hos syv af hundene blev den materiefyldte udskillelse fra det betændte øre undersøgt med henblik på en identifikation af bakteriestammerne, før behandlingen blev foretaget. Disse dyrkningstests viste tilstedeværelsen af Staphylococcus bakterier, blå pusbaciller, Pseudomonas aeruginosa, Coccidia-arter og forskellige bacillus-arter.

- 10 De smittede hunde manifesterede forskellige tegn på smerte, som f.eks. rystelse af hovedet og forsøg på at nå det inficerede øre med poterne. Hundene havde i almindelighed svækket appetit og forhøjede temperaturer (39,1-41,2°C). Atten af hundene i undersøgelsen havde ikke tidligere fået behandling med noget farmaceutisk middel. Én hund, i hvilken infektionen vedvarede i ni måneder, havde fået forskellige antibiotika, men
- 15 disse havde ikke været virkningsfulde ved behandling af tilstanden.

Hundene blev behandlet med en forbindelse anvendt ifølge den foreliggende opfindelse, der bestod af en opløsning af 20 mg lysozym-dimer og 25 ml fysiologisk saltvand. Forbindelsen blev tilført i form af dråber, og ti dråber blev anbragt i det inficerede øre fire-fem gange daglig. Efter den første behandlingsdag iagttoges allerede en markant

20 forbedring; temperaturerne faldt, hundene trivedes tilsyneladende bedre og havde bedre appetit. Symptomerne på purulent inflammation aftog helt mellem den tredje og den sjette behandlingsdag. Hos den hund, som tidligere uden succes havde været behandlet med antibiotika i ni måneder, opnåedes der fuld helbredelse af sygdommen efter ti dage. Lysozym-dimeren viste sig således at være virkningsfuld ved behandling af purulente

25 otitismedier hos hunde.

Eksempel 6

Virkningen af lysozym-dimeren på køer med mastitis blev undersøgt. Seks køer med mastitis blev anvendt ved denne undersøgelse. Disse køer havde symptomer på sygdommen, som f.eks. temperaturer over 40,5°C og en nedsat appetit. I alle seks tilfælde 5 begyndte behandlingen på sygdommens anden dag. Før forbindelserne blev tilført, blev prøver af mælken indsamlet med henblik på bakteriel undersøgelse. Kulturerne iagttoges at indeholde mikrober som f.eks. Staphylococcus og Streptococcus agalactiae.

Lysozym-dimeren blev indgivet til hver ko ved indsprøjtning i de inficerede pletter med en dosis på 40 mg i en opløsning i 50 ml fysiologisk saltvand to gange daglig. Det 10 iagttoges, at legemstemperaturen efter kun 24 timer var normal, og at appetitten indfandt sig. Efter tre dage viste ingen af de behandlede køer symptomer på sygdommen. Behandlingen fortsattes således kun op til fire dage, hvorefter en undersøgelse af mælken viste, at de patogene mikrober, som fandtes før behandlingen, var forsvundet. Der fandtes endvidere i mælken ingen symptomer, som kunne indikere en subklinisk mastitis. 15 I ingen af de behandlede køer fandtes en nedgang i mælkeydelsen, ligesom åbenheden af pletterne heller ikke var påvirket. Efter 24 timers lysozym-dimer-behandling fandtes ingen blokerende substanser i mælken fra de behandlede køer. Den hastige forsvinden af sygdomssymptomerne samt den fulde opretholdelse (retention) af malkekapaciteten indikerer således, at lysozym-dimer-forbindelser kan anvendes med succes ifølge den 20 foreliggende opfindelse ved behandlingen af kvæg mastitis. Denne behandling vil være særligt økonomisk vigtig til forebyggelse af mastitis-infektioner fremkaldt af Staphylococcus- og Streptococcus-bakteriestammer, der for tiden koster mejeri-industrien ca. 5,4 mia. US\$ om året.

Eksempel 7

25 En hunde-parvovirus (Canine Parvo Virus: CPV) infektion behandlede ved oral tilde-
ling af lysozym-dimer. I 27 hunde af forskellige racer og vægt i alderen fra tre måneder

til seks år fandt dyrlæger et symptomkompleks, som er typisk for parvovirusinfektion. Alle dyrene i undersøgelsen havde høje temperaturer (40-41,6°C), hyppige anfald af voldsomme opkastninger, adskillige tilfælde af karakteristisk stærkt lugtende diarré samt symptomer på dehydrering og apati. Dyrene var stærkt lidende. Behandlingen begyndte
5 i gennemsnit mellem den tredje og den femte infektionsdag afhængigt af, hvor tidligt dyrets ejer indbragte hunden til dyrlægekonsultationen. De smittede hunde fik indgivet lysozym-dimer i en dosis på 1-2 mg pr. kg legemsvægt to gange om dagen. Dyr, som stadig kunne drikke, fik tilført lysozym-dimeren i drikkevandet. Dyr, som var ude af stand til at drikke, fik tilført præparatet gennem en sonde i en opløsning af fysiologisk
10 saltvand.

Af de 27 hunde, som var under behandling, genvandt 25 hunde fuld fysisk form efter tre til fem dages behandling. Selv i løbet af den første dag blev der typisk iagttaget en markant nedgang i antallet af afføringer og anfald af opkastninger, og ved flertallet af hunde forsvandt disse symptomer totalt efter to dages behandling. Hos nogle få hunde
15 forsvandt disse symptomer endda efter den første dosis af præparatet. Der iagttoges ingen bivirkninger i forbindelse med tildelingen af lysozym-dimer-forbindelsen i noget dyr. Disse kliniske undersøgelser viser, at lysozym-dimer-forbindelsen med succes kan anvendes ifølge opfindelsen på hunde med parvovirusinfektion.

Eksempel 8

20 Virkningerne af lysozym-dimer-forbindelsen anvendt ifølge den foreliggende opfindelse på visse dermatologiske sygdomme hos mennesker blev undersøgt. Der udførtes undersøgelser på adskillige dusin humane patienter i alderen fra 15 til 35 år lidende af forskellige hudsygdomme som tidligere uden held var blevet behandlet med kendte metoder. Følgende sygdomme blev identificeret i denne gruppe:

	1	Forunculosis Chronica	-	2 tilfælde
	2	Sycosis barbae	-	1 tilfælde
	3	Impetigo contagiosa	-	11 tilfælde
	4	Acne vulgaris	-	22 tilfælde
5	5	Resacea	-	6 tilfælde
	6	Varicose ulcer	-	12 tilfælde

Hos nogle af patienterne fra denne gruppe blev der før behandlingen gennemført bakteriologisk dyrkningsundersøgelse. I de fleste tilfælde dyrkedes *Staphylococcus aureus* fra det indsamlede materiale. Behandlingen bestod i fire gange daglig påføring af en salve indeholdende 4 mg lysozym-dimer. En særlig foretrukket recept for salven er som følger:

		Lysozym-dimer	4,0 mg
		Acetylstearyloxyalkohol	25,0 mg
		Paraffin liquidum	10,0 mg
15		Span 60	5,0 mg
		Tween 60	8,0 mg
		Propylenglycol	10,0 mg
		Aseptina M	0,3 mg
		Aseptina P	0,16 mg
20		Destilleret vand op til	200 ml

Hos alle patienterne forsvandt de forskellige hudtilstande inden for 10-12 dage, og i nogle tilfælde iagttoges forsvinden efter tre dage. Hos patienter med kronisk forunculose varede behandlingen op til 4-5 uger, og hos patienter med varicose ulcer varede helbredelsen i almindelighed mellem 2 og 12 uger afhængigt af, hvor alvorligt hudtilstanden var, og hvor længe sygdommen havde udviklet sig inden behandlingen. Med resultaterne opnået ved denne undersøgelse foreslås det, at lysozym-dimer kan anvendes med held mod forskellige hudsygdomme.

Eksempel 9

Forskellige infektionssygdomme i den genitale region blev behandlet under anvendelse af en lysozym-dimer-forbindelse ifølge den foreliggende opfindelse. Ni kvinder i alderen fra 25 til 49 år blev behandlet ved disse undersøgelser, hvor syv havde colpititis chronica, 5 én patient havde Douglas' absces og én havde bartholinitis. Patienterne med kronisk colpititis fik intravaginale suppositorier indeholdende 10 mg lysozym-dimer i 2 cm³ hydrofil base. Suppositorierne tildeltes to gange daglig i en periode på syv dage. Hos alle patienter iagttoges en total forsvinden af inflammationen i det genitale område. Desuden forsvandt udflåd og andre symptomer. Patienten med Douglas' absces fik 10 mg lysozym-dimer i 5 ml af en 0,9% NaCl-opløsning to gange om dagen i fire på hinanden følgende dage. Opløsningen blev påført direkte i Douglas' hulrum. Før hver påføring af lysozym-dimer blev materieindholdet bortsuget fra Douglas' hulrum. Disse kulturer indikerede tilstedeværelsen af Streptococcus haemolyticus og colibakterier. Patientens abnormt høje legemstemperatur reduceredes til normale værdier inden for 15 24 timer efter den første påføring af lysozym-dimer. Smertesymptomerne fortog sig også i løbet af dette tidsrum. På fjerdedagen efter den anden påføring af lysozym-dimerforbindelsen fandtes intet pus i Douglas' hulrum. I dette tilfælde recidiverede sygdommen efter tre uger, men yderligere to doser lysozym-dimer påført i Douglas' hulrum bragte sygdommen under kontrol.

20 Patienten med bartholinitis blev behandlet med én dosis på 20 mg lysozym-dimer i 1 cm³ 0,9% NaCl-opløsning, som tilførtes straks i den betændte kirtel efter bortsugning af materiefyldt indhold fra denne. Efter fire dage var denne patient fuldstændigt helbredt. Under fire måneders følgende observationer fandtes ingen recidivering af denne sygdom. Disse kliniske undersøgelser indikerer, at lysozym-dimeren har en ekstremt gavnlig 25 terapeutisk virkning i tilfælde med visse infektionssygdomme i det genitale område hos kvinder. Det ser endvidere ud til, at det vil være muligt at behandle lokale abscesser ved at tilføre lysozym-dimer direkte ind i hulrum med betændt indhold.

Eksempel 10

Virksomheden af en lysozym-dimer-opløsning på inficerede sår blev undersøgt. I denne gruppe var der fire patienter med inficerede, postoperative sår; to kvinder efter laparotomi, én kvinde efter tåamputation som følge af nekrose fremkaldt af diabetisk angiopati og én mand efter amputation af nedre ekstremitet som følge af Burger's syge. I alle tilfælde fik patienterne fugtige påføringer og afvaskninger (lavations) med en opløsning af 20 mg lysozym-dimer i 5 ml af en 0,9% NaCl-opløsning fire gange om dagen. Hos patienterne med betændte sår efter laparotomi opnåedes komplet helbredelse efter fire og seks dage. Ved de andre patienter opnåedes helbredelse efter henholdsvis 21 dage og fem måneder. Disse kliniske undersøgelser indikerer, at lysozym-dimeren kan anvendes som et terapeutisk middel uden bivirkninger ved behandlingen af inficerede postoperative sår.

Eksempel 11

Kliniske iagttagelser gennemførtes på patienter med Herpes genitalis behandlet med en ribonuclease-A-dimer-forbindelse. Undersøgelsergruppen omfattede fem patienter, som var kvinder i alderen fra 23 til 36 år. Fire af dem havde udviklet sygdommen for første gang, medens den hos én af kvinderne manifesterede sig for tredje gang. Alle patienterne var i den såkaldte blister-fase, som er normal mellem tredje og femte sygdomsdag, og klagede over meget stærke smerter i det perineale område, især under vandladning. Hos alle patienter fandtes hævelser og infektion af labia samt adskillige blærer fyldt med en uklar væske på de labiale slimhinder og på huden på lår og i den anale region. Hos alle patienter var lymfeknuderne i lysken hævede og smetefulde.

Behandlingen omfattede påføring af en salve indeholdende dimeren af ribonuclease A fire til fem gange om dagen på blærene og de inficerede områder af slimhinden. Den påførte salve havde følgende recept:

	Ribonuclease-dimer	4,0 mg
	Acetylstearoyloxyalkohol	25,0 mg
	Paraffin liquidum	10,0 mg
	Span 60	5,0 mg
5	Tween 60	8,0 mg
	Propylenglycol	10,0 mg
	Aseptina M	0,3 mg
	Aseptina P	0,16 mg
	Destilleret vand op til	200,0 ml

- 10 Patienterne, som fik dimerbehandlingen meddelte, at smerten, efter adskillige minutter og i det mindste inden for én time efter den første påføring af salven, mindskedes væsentligt og forsvandt totalt i løbet af de næste 10-20 timer. En lægeundersøgelse viste, at de patologiske forandringer hos fire patienter forsvandt totalt efter tre dages behandling. Hos den sidste patient blev de patologiske forandringer elimineret efter fem dage.
- 15 Hos ingen af patienterne fremkom der nye blærer efter påføringen af salven indeholdende dimeren af pancreatisk ribonuclease A. Den ovennævnte undersøgelse viser, at salver indeholdende dimerer ifølge den foreliggende opfindelse med succes kan anvendes ved behandling af Herpes genitalis.

Eksempel 12

- 20 Mere end 100 patienter i forskellige aldre blev behandlet mod labial herpes under anvendelse af forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse. Hos alle disse patienter omfattede symptomerne hævelse af overlæberregionen, rødmen og talrige blærer fyldt med uklar væske. Alle patienter klagede over hudsmærter i området påvirket af sygdommen, og der følges desuden en vis spændthed i vævene. Behandlingen omfattede
- 25 lokal påføring fire til fem gange daglig af en salve indeholdende dimeren af pancreatisk ribonuclease A.

Alle patienter uden undtagelse hævdede, at smerten og spændtheden i vævene hurtigt fortog sig. En total lindring af smerten fulgte inden for de næste timer, lige som det iagttoges i tilfældene med genital herpes. Lægeundersøgelser viste, at hævelserne og blærerne forsvandt inden for to til tre dage. I enkelte tilfælde varede det op til fem dage før tilstanden klarede og helingen var fuldstændig. Det iagttoges endvidere, at hudtilstande som hævelser, irritationer og papler forsvandt totalt inden for 24 timer hos patienter, hvis behandling startede på sygdommens første dag. En anden iagttagelse var, at personer, som led af hyppige tilbagefald af denne sygdom, havde forlængede perioder mellem tilbagefaldene, og at tilbagefaldssymptomerne var mildere hver gang. I intet tilfælde iagttoges bivirkninger.

Eksempel 13

En klinisk undersøgelse blev gennemført på seks patienter med herpes zoster, der blev behandlet med en dimerforbindelse ifølge den foreliggende opfindelse. I fem tilfælde udviklede sygdommen sig typisk, og det sjette tilfælde havde særlige komplikationer, som anføres i det følgende. Disse patienter blev behandlet med en salve indeholdende dimeren af pancreatisk ribonuclease A, og behandlingen påbegyndtes på den tredje og fjerde sygdomsdag. Påføring af salven skete fire til fem gange daglig.

I alle tilfælde forsvandt smerten totalt inden for de første 24-48 timer. Blærerne iagttoges at tørre efter tre til fire dage, og herefter besluttedes det at afslutte behandlingen. I løbet af de næste få dage helede huden helt. Hos ingen af patienterne vedvarede smerten ud over de første 24-48 timer, og tilstanden dukkede ikke op hos tre patienter, som forblev under observation i mere end et år. Hos én patient var der, som anført ovenfor, en usædvanlig klinisk udvikling af sygdommen. En kvinde på 42 år var blevet behandlet for lungecancer under anvendelse af cobalt-terapi, som havde svækket hendes immunsystem alvorligt. Bortset fra de sædvanlige symptomer på herpes zoster fandtes der en udbredt spredning af blærer over hele kroppen. Behandlingen med anvendelse af ribonuclease-dimer-forbindelsen ifølge den foreliggende opfindelse gennemførtes med

fuld succes hos denne immunitetssvækkede patient, og hos kvinden udvistes en total forsvinden af blæretilstanden efter få dage. De succesfulde resultater med denne patient og med de andre patienter i denne gruppe viser den særlige virkning af pancreatisk ribonuclease A ved behandlingen af herpes zoster forårsaget af Varicella vira.

P A T E N T K R A V

1. Anvendelse af en lysozym-dimer og/eller en ribonuclease-dimer samt en farmaceutisk acceptabel bærer til fremstilling af et lægemiddel til behandling af virus- eller bakterieinfektioner, fortrinsvis i en koncentration på 0,001-20,0 mg dimer(er) pr. ml af den farmaceutiske acceptable bærer.
5
2. Anvendelse ifølge krav 1 til enzymatisk behandling af virus- eller bakterieinfektioner uden cytotoxiske effekter.
3. Anvendelse ifølge krav 1 eller 2 til behandling af virale eller bakterielle hudsygdomme.
10
4. Anvendelse ifølge krav 1 eller 2 til behandling af herpes.
5. Anvendelse ifølge krav 1 eller 2 til behandling af inficerede sår.
6. Anvendelse ifølge krav 1 eller 2 til behandling af vaginalinfektioner.
7. Anvendelse ifølge krav 6 til behandling af colpitis.
- 15 8. Anvendelse ifølge krav 1 eller 2 til behandling af otitis, fortrinsvis i form af dråber.
9. Anvendelse ifølge krav 1 eller 2 til behandling af mastitis, fortrinsvis i form af indsprøjtninger.
10. Anvendelse ifølge ethvert af de foregående krav, hvor den farmaceutisk acceptable bærer er en hydrofil base, og hvor koncentrationen af den/de anvendte dimer(er) fortrinsvis er 5 mg pr. ml af den hydrofile base.
20

11. Anvendelse ifølge ethvert af kravene 1-9, hvor den farmaceutisk acceptable bærer er en fysiologisk acceptabel saltopløsning, fortrinsvis en 0,5-1,5% NaCl-opløsning.
12. Anvendelse ifølge krav 11, hvor koncentrationen af den/de anvendte dimer(er) er fra 0,8 til 4 mg pr. ml af opløsningen.
- 5 13. Anvendelse ifølge ethvert af kravene 1-9, hvor den farmaceutisk acceptable bærer er vand, og hvor koncentrationen af den/de anvendte dimer(er) fortrinsvis er 0,02 mg pr. ml vand.
14. Anvendelse ifølge ethvert af kravene 1-9, hvor den farmaceutisk acceptable bærer er en salve, der fortrinsvis består af vand, paraffin og propylenglycol.
- 10 15. Anvendelse ifølge krav 14, hvor koncentrationen af dimeren/dimererne er 0,02 mg pr. ml salve.
16. Anvendelse ifølge ethvert af kravene 1-13, hvor lægemidlet skal administreres oralt.
17. Anvendelse ifølge ethvert af kravene 1-13, hvor lægemidlet skal administreres intravenøst.
- 15 18. Anvendelse ifølge ethvert af kravene 1-9, hvor lægemidlet skal administreres i form af suppositorier.