



Eljárás vírusos fertőző betegségek kemoterápiás kezelésére
alkalmas molekularendszer, valamint e hatóanyagot tartalmazó
gyógyászati készítmény előállítására

Dr. Chantal MACH, Kirchseeon

Nemzetközi bejelentés napja: 1991.05.27.

Nemzetközi bejelentés száma: PCT/DE91/00450

Elsőbbsége: 1990.05.27. (P 4 017 091.8) Németország

Nemzetközi közzététel száma: WO91/18616

K I V O N A T **KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY**

A találmány tárgya molekularendszer, amely vírusos fertőzések kezelésére és megelőzésére alkalmazható. A találmány szerinti molekularendszer úgy készül, hogy

I) poliszacharidban gazdag lignin egységeket (PLP) állítunk elő:

fa vagy fa jellegű anyagokat és/vagy növényi sejttenyészeteket gyengén savanyú-lúgos vizes közegben extrahálva; (A)

az oldhatatlan szilárd komponenseket elkülönítve;

II) alacsony molekulásúlyú, poliszacharidban szegény lignin egységeket (LPL) állítunk elő:

elszenesedett fatermékeket vagy bioátalakításon átment faszzerű anyagot 7 - 14 pH-jú vizes lúgos extrakciónak alávetve

(B);

a lúgban oldhatatlan szilárd komponenseket szűrővel eltávolítva;

III) vízoldható polimerizátum elegyet [(LD(PLB=LPL)]
állítunk elő:

az I) lépésben kapott poliszacharidban gazdag lignin egységeket a II) lépésben kapott poliszacharidban szegény lignoid egységekkel vizes-lúgos körülmények között 9-12 pH-n reagáltatva; a kapott HD-PLP=LPL-polimerizátum elegy LD frakcióját 15-40 kD nominális értékű szűrővel ultraszűréssel elkülönítve, és a visszamaradó anyagot elöntve;

majd a kapott szűrletet pH = 3-7 értékig H⁺ kationcserélővel kezelve,

majd a kapott savas LD(LPL-PLP) rendszert szokásos módon kinyerve.

3747/92

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

POSTA

68910

KÉPVISELŐ:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA KFT

AG 14 05/17A
AG 14 05/17C

Eljárás vírusos fertőző betegségek kemoterápiás kezelésére
alkalmas molekularendszer, valamint e hatóanyagot tartalmazó
gyógyászati készítmény előállítására

Dr. Chantal MACH, Kirchseeon

Feltaláló:

Dr. Chantal MACH, Kirchseeon , DE

Nemzetközi bejelentés napja: 1991.05.27.

Nemzetközi bejelentés száma: PCT/DE91/00450

Elsőbbsége: 1990.05.27. (P 4 017 091.8) Németország

Nemzetközi közzététel száma: WO91/18616

A találmány tárgya eljárás vírusos fertőző betegségek kemoterápiás kezelésére alkalmas molekularendszer, valamint e hatóanyagot tartalmazó gyógyászati készítmény előállítására.

A találmány tárgyához tartozik maga a molekularendszer is.

A találmány szerinti molekularendszert oly módon állítjuk elő, hogy

I) poliszacharidban gazdag lignin egységeket (PLP) állítunk elő:

fa vagy fa jellegű anyagokat és/vagy növényi sejttenyészeket gyengén savanyú-lúgos vizes közegben extrahálva; (A)

az oldhatatlan szilárd komponenseket elkülönítve;

II) alacsony molekulasúlyú, poliszacharidban szegény lignoin egységeket (LPL) állítunk elő:

elszenesedett fatermékeket vagy bioátalakításon átment faszerű anyagot 7 - 14 pH-jú vizes lúgos extrakciónak alávetve (B);

a lúgban oldhatatlan szilárd komponenseket szűrővel eltávolítva;

III) vízzeloldható polimerizátum elegyet [(LD(PLB=LPL))] állítunk elő:

az I) lépésben kapott poliszacharidban gazdag lignin egységeket a II) lépésben kapott poliszacharidban szegény lignoid egységekkel vizes-lúgos körülmények között 9-12 pH-n reagáltatva; a kapott HD-PLP=LPL-polimerizátum elegy LD frakcióját 15-40 KD nominális értékű szűrővel ultraszűrővel elkülönítve, és a visszamaradó anyagot előntve;

majd a fennmaradó anyagot pH = 3-7 értékig H⁺ kationcserélő-

vel kezelve,

majd a kapott savas LD(LPL-PLP) rendszert szokásos módon kinyerve.

A vírusfertőzések gyógyítása eddig még nem teljesen megoldott probléma.

Az egyik legnehezebb problémát a vírusok viszonylag gyors mutációja képezi, ami a vírusellenes gyógyszerek vagy a test saját antitestjeinek hatását részben vagy teljesen lecsökkenti.

A vírusellenes fertőzésekkel szembeni ellenállást egy ismert megoldással úgy kívánják biztosítani, hogy a betegeknek egy hatóanyag koktélt adnak be, feltételezve, hogy a hatóanyagok valamelyike kedvező hatást fog kifejteni; ezt az elvet alkalmazza a SANDOZ cég a Sandoglobulin elnevezésű gamma-globulin készítményénél; a készítmény olyan antitest elegyet tartalmaz, amelyet 2000 közép-európai donor véreből nyertek ki; a készítmény a közép-európai térségben előforduló betegségek ellen hatásos antitest féleségek nagy részét tartalmazza; ezért feltételeik, hogy a nagyszámú, különböző antitestet tartalmazó készítmény hatásos számos fertőzéssel szemben.

Az elmúlt időkben olyan kísérleteket végeztek a vírusos fertőzések leküzdésére, amelyeknél a vírusok szaporodását támadták meg különböző pontokon. Ismertek az azidotimidin (AZT) típusú gyógyszerek, amelyek a reverz transzkripciót gátolják a lánc felhasításával. Ezen gyógyszerek azonban a betegeknél nem kívánatos mellékhatásokat idéznek elő.

A növényi hemicellulózból nyert negatív töltésű dextrán-
 (körülbelül 10 kD értékű cukor-kénvegyületek)

végzett széleskörű kísérletek azt mutatták, hogy ez a vegyület csoport sem képes a vírussal fertőzött betegek gyógyítását előrevinni.

A dextrán-szulfáttal végzett orális kezelés hiányossága, hogy a dextránnak a vérkeringésben megtett útja és a vírussal fertőzött helyen a dextrán koncentrációja nem elég hatásos, ezen kívül súlyos mellékhatások (így idegfájdalom, hasmenés) léphetnek fel. A klinikai kezelés sem adott meggyőző eredményeket.

Megkísérelték, hogy géntechnológia úton állítsanak elő izolált CD4 receptor fehérjéket, amelyek szilárdan kötődnek a gp 120 jelzésű vírusra, és ennek telítése révén a vírust semlegesítik és hatástalanná teszik. Ahhoz, hogy ezt a mesterségesen előállított fehérjét gyógyszerként használhassuk, az kellene, hogy ezt a mesterséges fehérjét nagy dózisban injekció formájában adjuk be. A szándékosan nagy koncentrációban beadott sejt-érzékelő (szenzor), amely normális körülmények között az egészséges sejtek falán kívül helyezkedik el, az egészséges szervezet számára többoldalú irritációt jelenthet, aminek immunológiai és egyéb következményei is vannak. Előfordulhat, hogy az oldható CD4 az MHC-II-glikoproteinekre is rákötődik, és ennek normális funkcióit zavarja, ami például az AIDS-betegeknél az immungyengeséget még csak fokozza. Ezen túlmenően az oldható CD4-et ismételten magas koncentrációban, parenterálisan kellene beadni (Spektrum der Wissenschaft - 88 december, 116. oldal).

E probléma megoldására javasolták, hogy a CD4-ből kisebb szakaszokat, fehérje töredékeket állítsanak elő.

töredékeket a gp 120 még éppen hogy felismeri. Amennyiben ez a megoldás eredményes lenne, még mindig nyitva maradna az a kérdés, hogy ezek a fehérje töredékek nem indítanak-e el az in vivo körülmények között immunológiai ellenregulációt, ami az igen labilis AIDS-betegeknél előre nem látott zavarokat idézhet elő.

1990-ben LANGE M. (Ärztliche Praxis 15, 28. oldaltól, Werk-Verlag, D- 8032 Gräfelfing) rámutatott arra, hogy az AIDS- és az ARC-betegeknél a "Point of no Return"-hez vezető út (a pont, ahonnan nincs visszatérés) nemcsak a vírustermeléstől függ. Feltehetően a HIV antigénként olyan immunológiai patomechanizmusokat indít el, amelyek hajlamosak arra, hogy tovább terjedjenek. Az autoimmun betegségekkel (így például Lupus Erythematoses) való hasonlatosságok azt mutatják, hogy nem elegendő, ha csak egy anti-HIV kemoterápiát végzünk. Sokkal fontosabb, hogy ezeket az antiimmunológiai szempontból önállósult folyamatokat (perpétuálódás) bekapcsoljuk a kezelésbe; vagyis az "anti-eszkalációs kemoterápia" új formáját fejlesszük ki.

LANGE szerint egy HIV fertőzés keretén belül extrém komplement aktiválás következik be, az anafilaxiás faktor C5 előidézi a tumor nekrozis-faktor és interleukin 1. termelését. A HIV jelenléte ezt a folyamatot (kaszka) további kiterjedésre sarrkallja. Ezt bizonyítja számos munkacsoport kutatásának eredménye. Ebből arra következtethetünk, hogy egy eredményt ígérő anti-HIV-kemoterápiánál nem szorítkozhatunk egyedül csak a HIV gátlására, hanem meg kell szakítani az anti-immunológiai circulus vitiosus-mechanizmusokat.

A különböző ártalmaknak egyedi, eszkalációs együttetését (HIV, különböző fertőzések kórokozói, autoimmun kaszkádok, stb.) még jobban meg kell érteni ahhoz, hogy a gyógyításban valóban hasznos kemoterápiát biztosíthassunk.

A jelenleg alkalmazott terápiák eredménye [így például a fertőzést követő közepes élettartam 13 - 18 hónap; 3,4 % mindössze az ötéves túlélési arány; (San Francisco, 1981 - 87 között, 4000 betegen végzett vizsgálatok, J. Am. Med. Ass. 263, 402. oldal (1990))] azt mutatja, hogy a jelenleg alkalmazott tisztán kemoterápiás módszerek nem kielégítőek.

A feltaláló Mach, W.J. már 1961-ben kimutatta WITTICH-hel és STUHLFAUTH-tal együtt, hogy a MACH által leírt neo-penikromin-típusú természetes színezékeket kis mennyiségben parenterálisan beadva, ezek "endogén szabályozó szer"-ként viselkednek az emberi szervezetben, így például fokozzák a mellékvese kéreg működését.

Feltehetően ez az első utalás arra, hogy a kinoidd-típusú egységeket tartalmazó redoxi-pigmentek "anti-eszkalációs" mechanizmust indítanak el az emberi szervezetben, anélkül, hogy ők maguk fehérjét vagy hormont képeznének, és ezt a funkciót a nem specifikus ingerkeltő hatástól eltérő módon fejtik ki.

Úgy tűnik, hogy a HIV terápia a jövőben egy immunológiai szempontból hatásos anti-eszkalációs elemet is kell tartalmazzon azért, hogy a "point of no return"-hez vezető utat blokkolja.

Jelen találmány feladata, hogy olyan parenterálisan is beadható hatóanyagot találjon, amely a vírusokat semlegesíti anélkül, hogy citotoxikus vagy immunológiai

reakciókat indítana el a kezelt beteg szervezetében.

A találmány feladata továbbá, hogy olyan hatóanyagot találjon, amely lehetőleg a megváltozott/mutáción átment vírusformáknál is eredményesen használható.

A találmány szerinti feladatot oly módon oldjuk meg, hogy vírusos fertőzések betegségei kemoterápiájához olyan összekapcsolt molekula-rendszert alkalmazunk, amelyet a következőképpen állítunk elő:

I) poliszacharidban gazdag lignin egységeket (PLP) állítunk elő:

fa vagy fa jellegű anyagokat és/vagy növényi sejttenyészeket gyengén savanyú-lúgos vizes közegben extrahálva; (A)

az oldhatatlan szilárd komponenseket elkülönítve;

II) alacsony molekulásúlyú, poliszacharidban szegény lignin egységeket (LPL) állítunk elő:

elszenesedett fatermékeket vagy bioátalakításon átment faszzerű anyagot 7 - 14 pH-jú vizes lúgos extrakciónak alávetve (B);

a lúgban oldhatatlan szilárd komponenseket szűréssel eltávolítva;

III) vízoldható polimerizátum elegyet [(LD(PLB=LPL))] állítunk elő:

az I) lépésben kapott poliszacharidban gazdag lignin egységeket a II) lépésben kapott poliszacharidban szegény lignin egységekkel vizes-lúgos körülmények között 9-12 pH-n reagáltatva;

a kapott HD-PLP=LPL-polimerizátum elegy LD frakcióját 15-40

kD nominális átmérővel ultraszűréssel elkülönítve, és a

viisszamaradó anyagot előntve;

majd a kapott szűrletet pH = 3-7 értékig H⁺ kationcserélővel kezelve,

majd a kapott savas LD(LPL-PLP) rendszert szokásos módon kinyerve.

Egy előnyös megoldás szerint az I) lépésben olyan poliszacharidban gazdag HD(PLP) lignin egységeket állítunk elő, amelyek mérete 100 kD-nél kisebb;

ezen méretű lignin egységeket úgy nyerjük ki, hogy a vizes közegbe történő extrahálás és az oldhatatlan szilárd komponensek elkülönítése után a pH-t semleges-gyengén savas értékre állítjuk be;

majd molekulaszűrést, célszerűen ultraszűrést végzünk, ahol a szétválasztási érték 100 kD-nél, célszerűen 70 kD-nél kisebb;

majd a szűrőn fennmaradt anyagot előntjük;

az így kapott anyagot a III) lépésben tovább feldolgozzuk.

A találmány szerinti megoldás előnyös kiviteli módja szerint a II) lépésnél olyan kis molekulájú, poliszacharidban szegény LD-LPL lignoid egységeket állítunk elő, amelyek mérete 40 kD-nél kisebb; ezt úgy érjük el, hogy a vizes-lúgos extrakció és a lúgban nem oldódó szilárd komponensek elkülönítése után egy 8 pH érték feletti lúgos fragmentálást végzünk, majd ultraszűréssel a 15-35 kD méretű molekulákat elkülönítjük, majd az így kapott terméket a III) lépésben tovább feldolgozzuk.

Célszerű továbbá, ha a I) és II) lépéseknél kapott, poliszacharidban gazdag és poliszacharidban szegény frakciók reagál-

ás a szilárd anyagot elkülönítjük és az így kapott

oldatot azután tovább feldolgozzuk.

A III) lépésnél kapott savas LD(LPL-PLP)-oldatból ezután a megmaradt részecskéket és az oldatban lévő pirogén anyagot szűrővel eltávolítjuk, majd az oldatot sterilizáljuk, végül kívánt esetben üvegekbe letöltjük.

Célszerű, ha az I) lépéshez az extrahálendő fa és faszerű anyagot az alábbi csoportból választjuk ki:

A1: natív fa, így például színtfa, porított fa formájában, puhafa, keményfa, PLP-rendszerek, mint például a gyümölcsmagok héjában vagy dióhéjban lévő anyagok; a növények elfásodott részei; előnyösek a gyantamentesített kiindulási anyagok; fűvek, így például az Esparto, stb.;

A2: fa-analógok, így biotechnológiai úton, növényi sejtkultúrák szaporításával és a tenyészet feldolgozásával kapott fajjellegű anyagok;

A3: szintetikus fa-analógok, amelyeket a mono- és/vagy di-lignolének és hasonló származékok FREUDENBERG-féle dehidratációs polimerizálásával (DHP) és a kapott DHP termékeknek poliszacharidokra való feloltásával kapunk;

A4: lignin-poliszacharid komplexek (kereszt kötéses termékek), amelyeket a klorit fa-cellulóz lúgos extrakciójával kapunk;

továbbá az A1, A2, A3 és A4 csoport valamely elegendő.

Előnyös, ha a II lépésben növényi kiindulási anyagként az alábbiak közül valamelyiket alkalmazzuk:

B1: elszenesedésből származó természetes termékek.

B2: lignolitikus hatású mikroorganizmussal, így a *Trichoderma reesei* fűtő

rothadását előidéző fehér lisztharmat gombák segítségével biokonvertált fa;

B3: izolált lignolitikus enzimek (mint például fenoloxidáz) segítségével biokonvertált fa;

vagy a B1, B2, B3 szerintiek elegye.

Bázisként előnyösen kálium-hidroxidot, nátrium-hidroxidot, lítium-hidroxidot vagy ammóniát használunk; de alkalmazhatunk egyéb bázisokat is.

A találmány szerinti megoldás egy célszerű kivitele szerint a poliszacharidban gazdag lignin egységek (PLP) koncentrációja 0,05 - 10 tömeg %, előnyösen 0,05 - 2 tömeg %, és egész előnyösen mintegy 0,1 tömeg %.

A PLP-t például 12 - 14 pH-nél előnyösen kálium-hidroxiddal 1 - 10 napig szobahőmérsékleten (20 °C) extraháljuk, de végezhetjük a PLP extrakciót magasabb hőmérsékleten is, egészen 120 °C hőmérsékletig; 100 °C hőmérséklet felett autoklávban dolgozunk.

Előnyös, ha elszenesedett faterméként lignitet, nem fekete (színes) szenet vagy barnaszemet alkalmazunk.

A lúgos extrakciót 0,1 - 0,8 mól kálium-hidroxiddal, célszerűen 0,4 mól kálium-hidroxiddal végezzük szobahőmérsékleten; például a lúgos fermentálást végezhetjük 11 pH-n (KOH) 1 - 10 napig, szobahőmérsékleten.

A PLP=LPL polimerizátum elegy reakcióját például szobahőmérséklet és 120 °C között hőmérsékleten, 8-14, előnyösen 10-12 pH-n végezhetjük.

Előnyös, ha az LD(PLP-LPL) polimerizátum elegyet szobahő-

mérsékleten molekulaszétválasztásnak vetjük alá, az LD frakció elkülönítésére; célszerűen ultraszűrést végzünk alacsony nyomáson; ehhez előnyösen lúggal szemben ellenálló 18-38 kD nominális méretű ultraszűrő membránt használunk. Ezen túlmenően a LD(PLP=LPL) polimerizátum elegyet műgyanta kationcserélőn átengedve az alkáli-ionokat hidrogén ionra cseréljük le. A műveletet addig folytatjuk, amíg a pH stabilan 4-6,8 értékre, előnyösen 5 és 6 közötti értékre be nem áll. Ezt követően a savanyú LD(PLP=LPL) frakciót szűréssel pirogén-mentesítésnek vetjük alá, majd ezután autoklávban végzett hőkezeléssel, így például 121 °C hőmérsékleten 14 percig tartó kezeléssel sterilizzük.

A PLP polimerizátum elegy vizes oldatát ismert módon, adott esetben segédanyagok alkalmazásával folyékony gyógyászati készítménnyé alakítjuk; így például kenőcs alapanyagok segítségével külső használatra szánt kenőcsöket vagy pedig szokásos módon beadásra szánt injekciós oldatokat vagy külső alkalmazásra oldatokat állítunk elő.

E művelet során az LD(PLP=LPL) polimerizátum elegy vizes oldatát ismert módon ampullákba töltve injekciós célra dolgozzuk fel.

A találmány szerinti eljárással előállított molekularendszert előnyösen parenterálisan vagy lokálisan adva vírusos fertőzések kezelésére használjuk; a vírusok közül megemlítjük a retrovírusokat, elsősorban a HIV típusú (AIDS) vírusokat.

A találmány szerinti eljárással előállított molekularendszert előnyösen adhatjuk nemesfém-származékként, így platina, arany, palládium-származék formájában; különösen elő-

nyös, ha nemesfém kelátokat vagy komplexeket képzünk.

A találmány szerinti eljárással előállított LD-anionokból álló molekularendszer különböző egységekből épül fel (így például a xilem-frakcionálásból és fragmentálásból származó egységekből), ahol az egyes egységek különböző kémiai szerkezetűek, molekuláris hozzáférhetőségük és farmakológiai tulajdonságaik eltérőek.

Ezt mutatja az a körülmény is, hogy az új antieszkalációs kemoterápiás szer nemcsak a HIV esetében fejt ki inhibitor hatást, hanem az egészséges és megterhelt idegsejtekre is (sejt-kultúrában) túlélést biztosító faktorként viselkedik.

Több évig tartó kísérleteink azt mutatták, hogy 2 mg hatóanyag/24 óra dózist napi 2-7 injekció formájában beadva súlyos influenza fertőzések (egyidejű vírusos-bakteriális fertőzések mellett) már 24-48 óra alatt gyógyíthatók minden mellékhatás nélkül. Még olyan súlyos asztma paciensek is, akik súlyos influenza fertőzésben szenvedtek, 10 mg/80 kg testsúly/24 óra dózissal, 5 mg feletti kortikoszteroid beadása nélkül eredményesen kezelhetők voltak, és a veszedelmes asztmás állapot elkerülhető volt.

Állatokon előidézett bronchus-görcsnél az állatoknak atoxikus dózisokat parenterálisan beadva a bradikinin-görcs gátló hatása észlelhető (szerotonin-gátlás és a prosztaglandin szintézis gátlása).

Ezek a hatások teljesen szokatlanok egy kemoterápiás szer esetében, és azt mutatják, hogy a találmány szerinti eljárással előállított molekularendszer jobban megközelíti a Lange-féle

követelményeket, mint az eddigi HIV-gátló anyagok.

A találmány előnye többek között:

- a HIV-vel fertőzött sejttenyészetekben (humán-limfociták) (a vizsgálat leírását lásd az alábbiakban) nem-citotoxikus koncentráció értékeknél a szincytia-képződés jelentős gátlása figyelhető meg ("anti-HIV-hatás");

- a központi idegrendszer neuronjainak sejttenyészetében szigorúan meghatározott vizsgálati feltételek között (Hippocampus illetőleg Cortex-ből vett mintáknál) az előzőleg mesterségesen károsított neuronoknál, valamint az előzőleg nem károsított neuronoknál a túlélési képesség jelentős növekedése figyelhető meg (survival effect), amely hatás biológiailag egyenlő az eszkalációs sejtfolyamatok gátlásával (oldalról fedezett helyreállító hatás);

- minthogy a neuron nyilvánvalóan egy előnyben részesített célpont, nemcsak a HIV számára, hanem egyéb hagyományos vírusok számára is (in situ vizsgálat betegeken), ennek a tulajdonságnak különösen nagy jelentősége van a gyógyítás szempontjából;

- a M. Parkinson-alaputatások terén végzett tájékoztató vizsgálatok azt mutatják, hogy egyebek között nagyon valószínű, hogy a találmány szerinti eljárással előállított molekularendszer képes a vér-agyvelő korlátot átlépni;

- évekig tartó folyamatos kezelés esetén sem lép fel nemkívánatos szenzibilizálódás, a gyógykezelés beadását követően nem jelentkeztek olyan általános reakciók, mint egyebek között a reaktív láz, továbbá a vérkép semmilyen károsodást nem mutat a gyógyszerkezelés hatására;

- a hagyományos vírusok hatására fellépő fertőző betegségeknel (influenza, bárányhimlő stb.) gyors és teljes gyógyulás, lázmentesség következik be anélkül, hogy a vérkeringésben bármilyen nem-kívánatos mellékhatást lehetne észlelni;

- minthogy a szóbanforgó hatóanyag nem-fehérje jellegű, nem hat ko-antigénként, sem pedig lázt okozó anyagként;

- a parenterális gyógykezelés egyszerű és problémamentes (szubkután);

- a hatásos dózis ARC-betegeknel 20 - 40 mg/hét;

- extrém túldozírozás esetében (például 48 mg/24 óra ismételt) sem lép fel sem lokálisan, sem szisztémikusan, sem akut, sem krónikus károsodás.

Az új hatóanyag-rendszernek primer indikációs súlypontja - anélkül, hogy e területen korlátozást kívánnánk eszközölni:

- HIV-fertőzések,

- ARC-esetek fertőzésekkel;

- krónikus vírusfertőzések által okozott sejtkárosodások;

- a hagyományos antitumor kemoterápiás szerek hatására ráksejteknel fellépő multirezisztencia kedvező befolyásolása;

- a központi idegrendszer megbetegedései.

A találmány részletes leírása előtt az alkalmazott rövidítések és megjelölések értelmezését a következőkben adjuk meg:

LD = alacsony dalton-érték (alacsony molekulasúly, jelen esetben max. 3000 D)

HDD = magas dalton-érték (magas molekulasúly, jelen esetben 3000 D-nél

nagyobb)

P = poliszacharidláncok, amelyek natíve kötődnek lignin egységekhez, illetőleg poliozokhoz (lignin és cellulóz közötti közbenső tagok)

L = natív lignin egységek bármely természetes variációban,

LD-L = (alacsony dalton értékű lignin egységek - max. 3000 dalton értékkel)

HDD-L = magas dalton értékű lignin egységek)

n = a lehetséges (natív) egységek variációinak száma

(P-L...P)_n = cukorban gazdag (poliszacharid/polióz) lignin-egységek, amelyek "milled-wood" lignin^tként, illetőleg fűrészporból lúgos pH-jú vízzel extrahálhatók, illetőleg fa bioszintézissel előállíthatók);

--- = kovalens kötés

.... = hidrogén híd kötés

(L-P...L)_n = cukorban szegény lignoid egységek, amelyeket a xilem elszenesedési termékekből, így lignitből, nem fekete szenekből (egészen kőszénig) nyerünk ki poláros, lúgos vizes extrakcióval, amely termékek az elszenesedés következtében kis mennyiségű asszimilálható poliszacharidokat tartalmaznak (többek között az elszenesedés előtt bekövetkező mikrobiológiai lebontás következtében);

LDD (L-P...L)_n = cukorban szegény lignoid egységek, amelyek az elszenesedési folyamatokban képződnek, és lúgos-vizes közeggel extrahálhatók, és amely termékek kis mennyiségben tartalmaznak csak asszimilálható energiahordozókat, így például alacsony dalton értékű poliszacharidot (amelyek 7-

es pH alatt is vízoldhatók);

LD (P-L...P)_n = alacsony dalton értékű, cukorban gazdag lignin egységek;

HDD (LD-P-L...P)_n ≡ (LD-L_P-L)_n²

cukorban gazdag LD-egységekből és cukorban szegény L-egységekből álló LD-egységekből készült polimerizátum elegyek, ahol a molekula kötésben résztvevő egységek mesterséges sokszorosodásánál a variáció nagymértékben fokozódik (a kiindulási anyagok variációs száma önmagával csaknem multiplikálódik)

LD((LD-P-L...P)_n ≡ (LD-L_P...L)_n²

A polimerizátum elegy alacsony dalton értékű frakciója, amely alkalmas a találmány szerinti biológiai felhasználásra.

A találmány szerinti polimerizátum elegy (LPL=PLP) a kísérletek tanulsága szerint vírusgátló hatást mutat, és ugyanakkor gyakorlatilag teljesen mentes minden mellékhatástól.

A találmány szerinti, cukorláncokból álló molekularendszer előnye, hogy nem-fehérje jellegű, nem ingerli a testidegen fehérjékre reagáló immunvédelmet, és ezért alkalmas hosszú ideig tartó kezelésekhez.

Feltételezzük, hogy a találmány szerinti eljárással előállított hatóanyag rendszer megakadályozza, hogy egy vírus, speciálisan a HIV vírus valamely gazdasejten megkötődjön vagy megtapadjon. Valószínű, hogy a találmány szerinti eljárással előállított molekularendszer, fehérje-protein csapdaként viselkedik,

de minthogy a molekularendszer nem fehérje, nem idéz elő negatív értelemben vett immunreakciót - sőt a legérzékenyebb vizsgálati rendszeren is, az izolált agysejtek tenyészetén, túlélési faktorként hat.

A találmány szerinti eljárással előállított hatóanyag-rendszer még a gyógyító dózisokban sem (0,1 mg/kg testtömeg) viselkedik szenzibilizáló anyagként, még tartós adagolás esetén sem, ezen kívül nem toxikus, és nem fejt ki mellékhatást. A találmány szerinti hatóanyag-rendszer olyan hidrofil tartományokkal rendelkezik, amelyek kedvező vízdoldhatóságot mutatnak.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a találmány szerinti eljárással előállított hatóanyag-rendszer annak következtében, hogy nem-fehérje struktúrával rendelkezik, továbbá nem toxikus, alkalmas arra, hogy tartós kezelésekhez használják.

A találmány szerinti eljárással előállított molekula-rendszer különös előnye az, hogy az idegsejtek védelmére használható, olyan értelemben, hogy túlélési faktorként képes működni.

A találmány szerinti eljárással előállított molekula-rendszer különös előnye sokfélesége, ami lehetővé teszi, hogy a vírus számára állandóan a legkülönbözőbb alakulatokban és töltés eloszlásban mutatkozzon.

Számos víusról, de különösen a HIV víusról ismert, hogy igen gyorsan változik, és igen alkalmazkodóképes, aminek következtében a mutáción átment vírussal szemben egyetlen alakzat nem lehet hatásos.

A találmány szerinti eljárással előállított glüko-lignin-

-egységek komplikált poliszacharid-polióz-lignin-rendszert, egy "hálózatot" képeznek, amelyek térbeli alakzatuk és töltés eloszlásuk sokfélesége miatt a legkülönbözőbb glükoreceptorokra tudnak kötődni. A találmány szerinti eljárással előállított nem-fehérje hálózat (alacsony molekulahúlyú és vízoldható) lényegében cukorláncok (poliszacharid láncok) tekintetében elszegényedett fenil-propán egységekből állnak, amelyekben érzékeny, aktiválható kinoid (orto- illetve parakinoid) csoport tartalmú tartományok vannak. Az előállítási módszertől függően a molekularendszer különböző polimer tartományait különíthetjük el.

Abban az esetben, ha a találmány szerinti eljárással előállított molekularendszer kapcsolatba kerül egy glükoprotein szenzorral, például egy vírussal kontaktusba kerül, úgy valószínűleg a molekularendszer cukorban elszegényedett tartományai a vírusos eredetű glükoproteinekben lévő cukormolekulákat megkötik, ezek között komplex képződés jön létre, aminek eredményeként például a gp120 telítődik, és veszélytelenné válik.

Olyan lignoid molekulatartományokat, amelyek a cukor oldal-láncokkal szemben affinitást mutatnak és részben sztérikus-specifikus módon glükomolekulák tekintetében elszegényedtek, a természetben az úgynevezett elszéneseztett termékekben találunk; ezek közül említjük meg a nem fekete (színes) szenet, a lignitet, de nyomokban található ilyen vegyületek a kőszénben is. Az évmillióig tartó elszéneseztési folyamat során a poliszacharid láncok illetve poliózok tekintetében elszegényesedés követ-

előzött be; ezek a poliszacharid láncok illetve poliózok

képezik a lignin egységek és a cellulóz között a biológiai kapcsolatot; a mikrobiológiai lebomlás, a hosszú ideig tartó oxidációs átalakulások stb. okozzák, hogy az elszenesedett termék szénhidrogénben szegényé válik.

A találmány szerinti eljárással előállított molekularendszer előnye, hogy képes a sejtfalon biológiailag áthatolni; ezt igazolják az idegsejteken és májsejteken in situ végzett kísérletek és mérések.

Tudományos vizsgálatok segítségével megállapítható volt, hogy a találmány szerinti eljárással előállított hatóanyag rendszernek a fertőzött sejt kultúrákra kifejtett hatása meglepően szignifikáns, és nem lép fel számottevő toxikus mellékhatás.

Ezért alkalmas a találmány szerinti eljárással előállított hatóanyag rendszer tartós kezelésre; a tartós kezelés során nem lép fel hatáscsökkenés; kétséges esetekben rizikó nélkül használhatjuk, és egyéb hatóanyaggal nem specifikus módon kombinálhatjuk. A hatóanyag rendszer általában kedvező gyógyászati hatást mutat, és problémamentesen injekció formájában beadható.

A találmány szerinti eljárást a korlátozás szándéka nélkül az alábbi példák szemléltetik. A leíráshoz csatolt ábrák értelmezése a következő:

1a. ábra: A találmány szerinti molekularendszer előállítási sémája

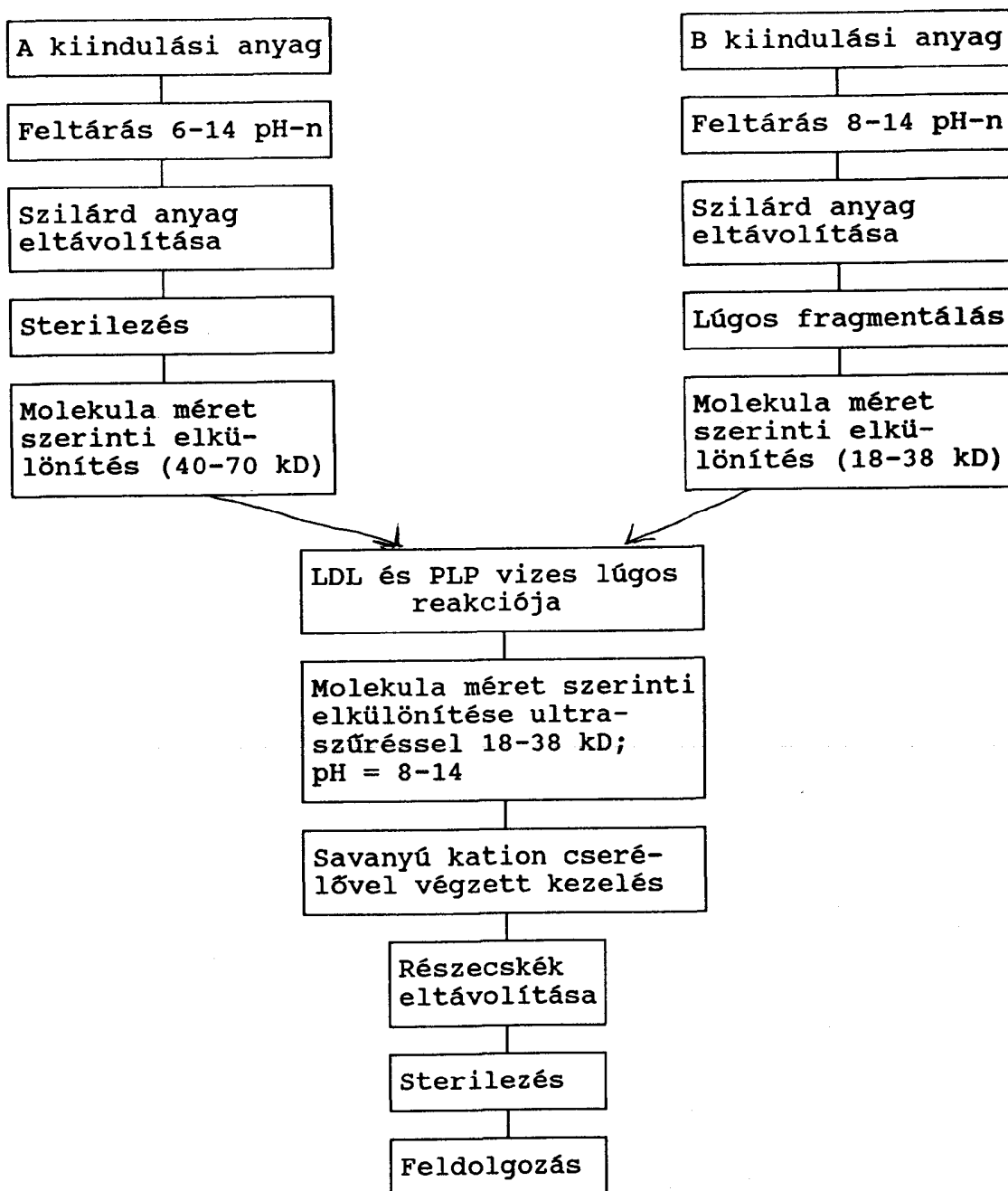
1b. ábra: A találmány szerinti molekularendszer további előállítási sémája

1c. ábra: A találmány szerinti molekularendszer további

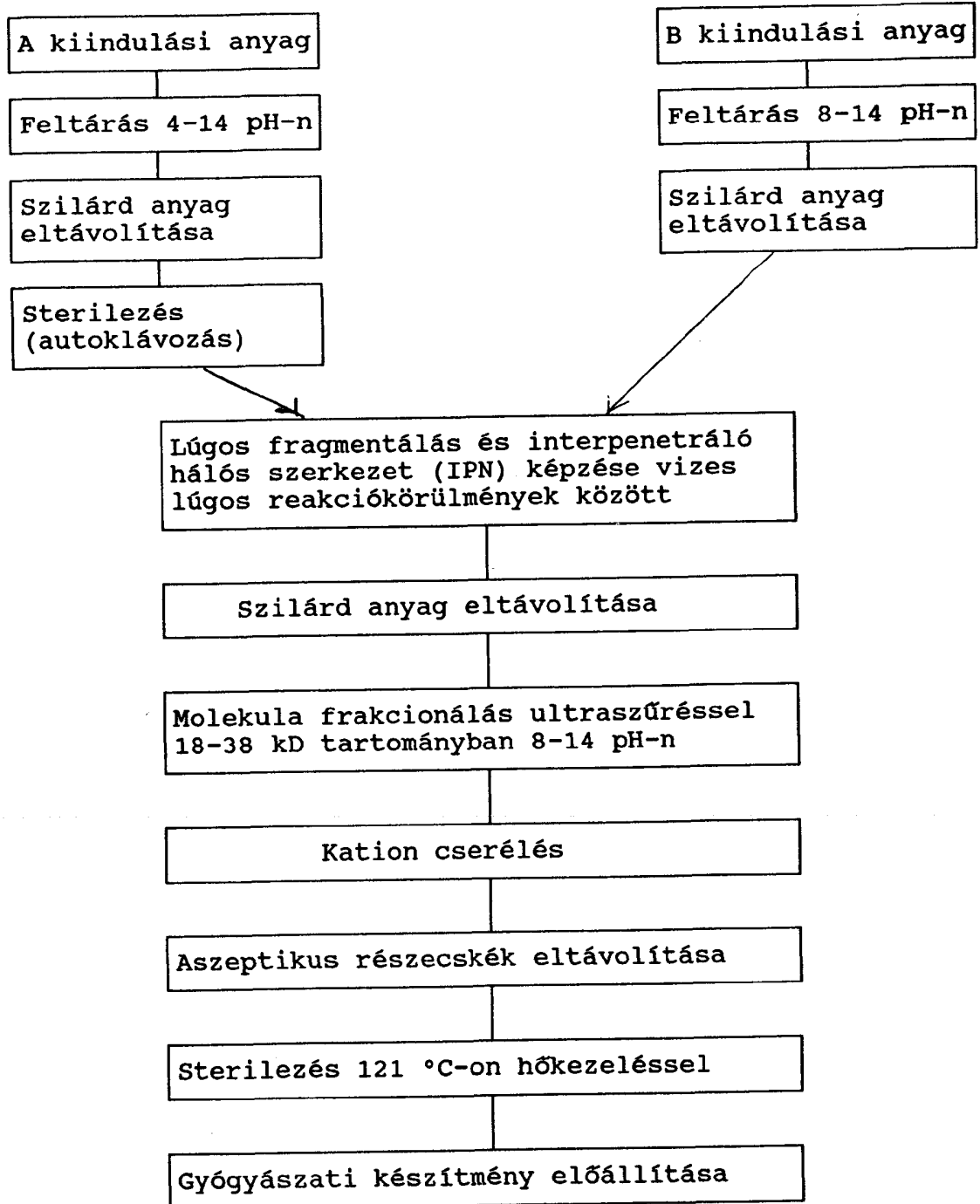
előállítási sémája

- 2a-2e. ábra: A találmány szerinti molekularendszer illetőleg előfutárjának fluoreszcencia spektruma vizes oldatban az 1. példa szerint
3. ábra: A találmány szerinti molekularendszer C13-spektruma
4. ábra: Patkány cortex tenyészetben glükózhiány mellett mért LDH-hatás grafikus ábrázolása
5. ábra: In vitro körülmények között Hippocampus-neuronokkal 48 óra eltelte után végzett vizsgálatok grafikus ábrázolása
6. ábra: Az extinkció-mérés eredménye függően a hatóanyag besugárzásának idejétől.

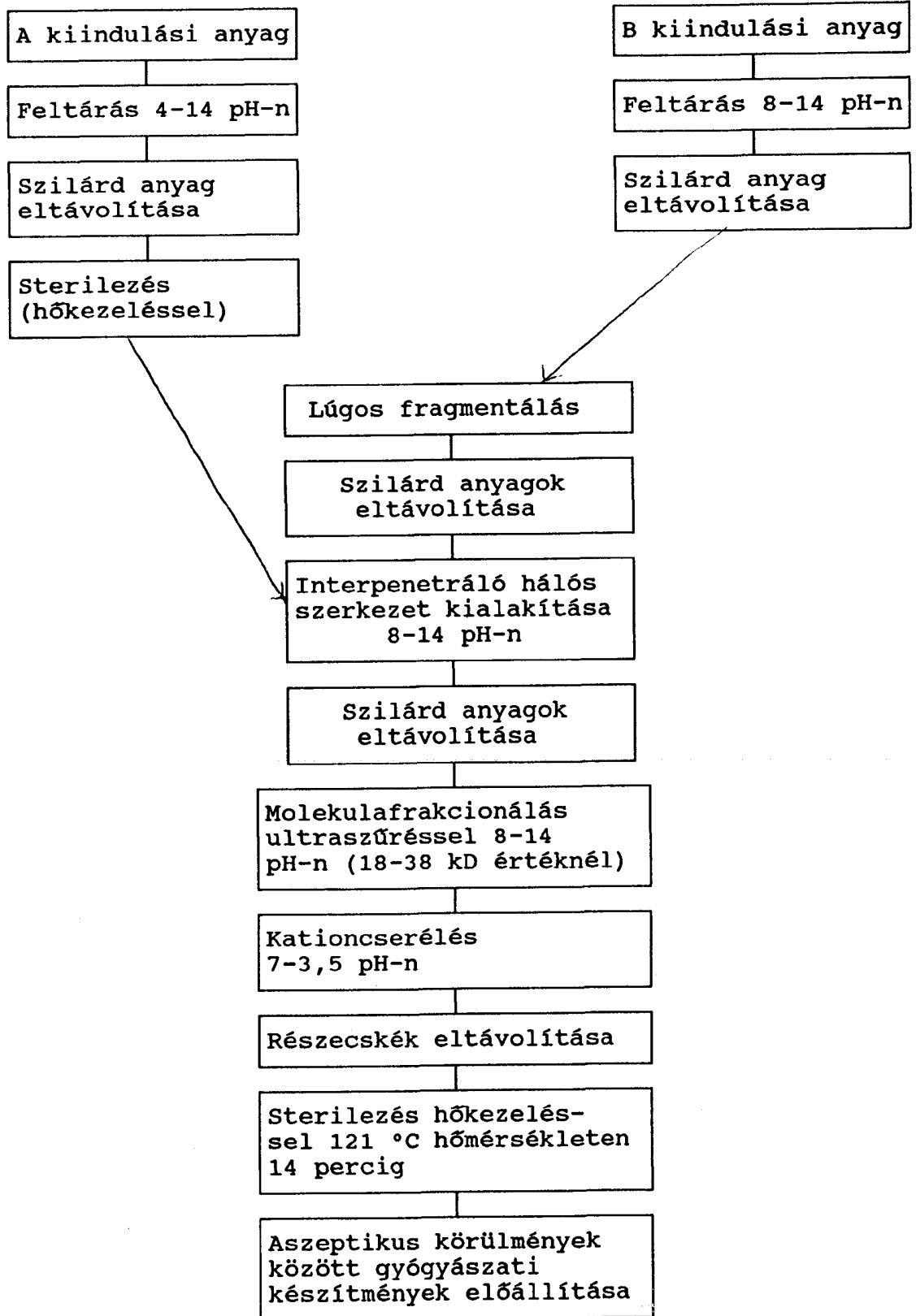
1a. folyamatábra



1b. folyamatábra



1c. folyamatábra



1. Példa

A találmány szerinti hatóanyag-rendszer előállítása

1. és 3. lépés

Cukorban gazdag lignin frakció (PLP) előállítása és további feldolgozása molekula rendszerre

300 g szibériai vörösfenyőtől (*Larix sibirica*) származó keményfát "milled wood"-ként 6000 ml demineralizált vízzel keverés közben diszpergálunk, ehhez 150 g kálium-hidroxidot adunk. Az elegyet keverés közben 3 napig 46 - 66 °C hőmérsékleten tartjuk (időközben dielektrikusan hevítve az elegyet). Ezt követően a szilárd anyagot nuccson leszűrjük, a maradékot eldobjuk, a szűrletet centrifugáljuk, a kapott tiszta oldathoz részletekben savanyú ioncserélő műgyantát adunk (Amberlite IR 120), az ioncserélőt hidrogén alakban frissen aktiválva alkalmazzuk, üveg elektródás méréssel a pH-t állandóan kontrolláljuk, az oldatot 11,5 pH-ra beállítva. Ezt követően az ioncserélőt elkülönítjük és eldobjuk. Az aranyárga színű oldatot ultraszűrésnek vetjük alá, ehhez lúgnak ellenálló 100 000 nominális dalton értékű ultraszűrő membránt használunk; így az oldatot a pirogén anyagoktól és részecskéktől megszabadítjuk. A sárga színű oldatból 20 µl-es mintát veszünk 1 cm-es kvarc küvettában 3 ml vízzel hígítva, a fluoreszcencia spektrumot vizsgáljuk 450, 490 és 520 nm hullámhosszokon.

A fluoriméter érzékenységét úgy állítjuk be, hogy a relatív fluoreszcencia emisszió a 450 nm-es hullámhosszon 100-nál vagy ennek közelében legyen. Ezt követően 450 nm-nél felvesszük a gerjesztési spektrumot (a regisztrálás sebessége 2 cm/perc, a

gerjesztési hullámhossz előrehaladásának sebessége 100 m/perc;
 készülék: KONTRON, Svájc, SFM-23 típusal felvéve és
 regiisztrálva).

Kontrollképpen felvesszük 490 nm-nél és 520 nm-nél is a
 gerjesztési spektrumot. Ezt követően a PLP mátrix sárga oldatát
 kapjuk.

III lépés szerinti továbbfeldolgozás

A konformáció modulátort lépésekben adagoljuk 2 mg/ml kon-
 centrációban a vizsgálandó oldathoz. Az adalékanyagot 5 μ l-es
 adagokban adjuk a 3 ml-es kvarcküvetához (fluoreszcencia titrá-
 lást végzünk), a gerjesztési spektrumot 520 nm-nél vesszük fel.
 Az adagolást mindaddig végezzük, amíg 465 nm-nél egy szignifi-
 káns emissziós csúcs nem észlelhető, továbbá az emisszió a
 teljes emisszió hullámhossz tartományba erőteljesen megnöveke-
 szik, és a 394-396 nm-es emissziónál az emisszió 80 % relatív
 értékkel meg nem nő. Megállapítjuk e fluoreszcencia növekedéshez
 szükséges konformációs modulátor mennyiségét (jelen esetben 10
 μ l 0,2 %-os oldat volt szükséges). Ezt az értéket 2,5-ös faktor-
 ral szorozzuk.

A konformációs modulátor oldatnak a kis térfogatú matrix-
 oldat mintához hozzáadott mennyiségét a rendelkezésre álló
 mátrix oldat mennyiségére átszámítjuk, és ehhez hozzáadjuk, így
 például a rendelkezésre álló 4000 ml matrix oldathoz fentiek
 szerint 5000 ml 0,2 %-os konformációs modulátor oldatot adunk
 (120 μ l matrix oldat szükséglete μ l 0,2 %-os konformációs
 modulátor oldat, ezt 2,5-ös faktorial megszorozva 4000 ml matrix
 oldatra számítva 2000 x 2,5 ml szükséges). Az elegyet 45 - 65 °C

hőmérsékleten intenzíven keverjük, majd 4 óra eltelte után, amikor is a reakció lezajlott, 45 - 65 °C hőmérsékleten molekulaszétválasztást végzünk, ehhez lúggal szemben ellenálló ultraszűrő membránt használunk, amelynek nominális szétválasztó tartománya 30 KD; a szűrőn fennmaradó anyagot eldobjuk, a szűrletet tovább feldolgozzuk. Erősen savanyú kationcserélő segítségével (H^+ alak) a szűrletet 5,5 pH-ra beállítjuk, szűréssel a pirogén anyagokat eltávolítjuk, és az oldatot hőkezeléssel sterilizzük.

A gyártási tételből mintákat veszünk le a biológiai és az analitikai vizsgálatokhoz, majd a fluoreszcencia spektrum és a pirogénmentesség ellenőrzése után az oldatot ampullákba töltjük. A parenterális alkalmazásra szánt oldatot 0,9 %-os nátrium oldat formájában készítjük el injekciós célokra.

A 2a - 2c ábrákon bemutatjuk a PLP-oldat (A anyagcsoport) fluoreszcencia gerjesztéses spektrumát a 450, 490 és 520 nm gerjesztéses hullámhosszokon; a 2d - 2e ábrákon látható az adalékanyag hozzáadásának (itt két lépésben) hatása az 520 nm-en mért gerjesztéses hullámhosszon a fluoreszcencia gerjesztéses titrálás elve alapján mérve; adalékanyagként PLP-t adunk 5 μ l-es adagokban: ezen műveletnél döntő a 466 nm-es gerjesztéses hullámhossznál mért emissziós csúcs fellépte és nagysága.

II. Cukorban szegény lignoid-frakció (LPL) előállítása

600 g finoman elporított (milled) lignitet szobahőmérsékleten (20 °C) 10 000 ml 1,68 tömeg %-os kálium-hidroxid-oldattal keverés közben diszpergálunk; az elegyet 9 óra eltelte után

centrifugáljuk, így a szilárd anyagtól az oldatot elkülönítjük, a szilárd anyagot eldobjuk. 24 óra eltelte után centrifugálás segítségével a szilárd anyagot ismételten elkülönítjük és ezt eldobjuk. Ezután 5 napig tartó 20 °C hőmérsékleten végzett lúgos fragmentálást, majd ultraszűrést végzünk, ehhez lúgálló ultraszűrő membránt alkalmazunk, amelynek nominális szétválasztó értéke 30 000 dalton; így molekula szétválasztást végzünk. Amikor 6,7 liter szűrletet kapunk, az ultraszűrést befejezzük. A szűrletet frissen aktivált, erősen savanyú ioncserélő gyantával (Amberlite IR 120) kezeljük, a pH-t üvegelektrodával mérjük, az oldatot 5,5-re állítjuk be.

Azz így kapott gyengén savanyú oldatot ultraszűrés segítségével a pirogén anyagtól mentesítjük. Ezt követően autoklávban 121 °C hőmérsékleten 15 percig tartó sterilizációt végzünk. A szilárd anyag koncentráció meghatározására mintát veszünk le, a mintát 85 °C hőmérsékleten infravörös sugárral kezelve súlyállandóságig szárítjuk. A szűrletet kívánt koncentrációra állítjuk be, a kapott oldatot LPL részként vagy úgynevezett konformáció modulátorként alkalmazzuk az I. lépésben kapott termékkel való reakcióhoz.

A reakció lefutását az 1. ábra szemlélteti.

Az 1b és 1c ábra a találmány szerinti eljárás célszerű megoldásait mutatja be.

Az alkalmazott LPL frakció C13-spektrumát az alábbiakban értékeljük:

C13-NMR-spektrum

A C13-NMR-spektrum alapján vizsgált minta annyiban tér el a

minthogy az összehasonlító lignin vizsgálatoknál szereplő hexa-deutero-aceton [Lüdemann H. D és Nimz H., Makromol. Chemie, 175, 2409 (1974)] nem alkalmazható, minthogy a vizsgált anyag abban nem oldódik. Ezen túlmenően a belső standard helyett alkalmazott külső standard is befolyásolhatja kismértékben a kémiai eltolódást, aminek következtében előfordulhatnak mintegy 2 ppm-es különbségek is. A spektrum vizsgálatok eredményét az alábbi táblázatban foglaljuk össze.

Spektrum vizsgálatok eredménye

¹³C-kémiai eltolódás ppm-ben; TMS külső standard alkalmazása mellett; a felvételezett D₂O-ban mérjük; készülék: XL-100-15-spektrométer segítségével

Szám	Delta (ppm)	Intenzitás	Hozzárendelés*
(1)	190,5-198	gyenge multiplett	α-karbonil- és fahéj-aldehid-csoport
(2)	168-180	közepes multiplett	karboxil-csoport
(3)	164,0	gyenge	
(4)	158,2	erős szingulett	C-4 p-hidroxi-fenil-ben (C-3/5 sziringilben)
(5)	150,5	gyenge	C-4 guajacil-ban
(6)	148,5	gyenge	C-3 guajacil-ban
(7)	93-145	széles multiplett	C-1/2/5/6 guajacilban és C-1/2/4/6 sziringilben

Szám	Delta (ppm)	Intenzitás	Hozzárendelés*
(8)	88,4	gyenge	C- β aril-glicerín- β - -aril-éterben
(9)	70,0	közepes	C- α aril-glicerín- - β -aril-éterek
(10)	67,9	közepes	
(11)	67,4	közepes	
(12)	66,2	gyenge	
(13)	64,8	erős	C-gamma fenil-kumarán és C-gamma és C- β C- β -1-dilignol-egységekben
(14)	63,8	közepes	C-gamma fahéj-alkoholokban és aril-glicerín- β -aril-éterekben α -karbonillal
(15)	60,7	közepes	C-gamma aril-glicerín- β - -aril-éterek
(16)	58,6	közepes	OCH ₃
(17)	0-55	széles multipllett	alifás, nem oxigénhez kötött C- -atom

* lásd: Lüdemann H. D. és Nimz H.: Makromol. Chem. 175, 2409 (1974)

2. Példa

Találmány szerinti hatóanyag előállítása

Cukorban gazdag lignin frakció előállítása (PLP)

180 g, szibériai vörösfenyő (Larix sibirica) őrölt

színfát 0,05 - 0,315 mm méretűre aprítunk verőmalomban, a kapott őrleményt a vizes extrakció előtt etanol/benzol és etanol segítségével végzett extrakcióval az extrahálható anyagoktól megszabadítjuk (TAPP-Standard T-12m, 1959) valamint 120 g vörösbükk-színfát (*Fagus sylvatica* L) fentiek szerint előkészítünk, majd a két fából származó port elegyítjük, és az 1. példa szerint feldolgozzuk. A vörösfenyőtől származó színfa arabogalaktant (4 rész galaktóz + 1 rész arabinóz) tartalmaz, ezzel szemben a vörös bükkfában oximetil-glukuronsav és L-arabinózt hordozó xilánláncok vannak; ezen komponensek befolyásolják a végtermék tulajdonságait.

Az őrölt faport az 1. példa szerint feldolgozzuk, az extrakciónál BECKMANN és LISCHÉ módszere szerint járunk el [Angewandte Chemie 34, 285 (1921)], e módszer szerint 1 mólos kálium-hidroxid-oldattal autoklávban 121 °C hőmérsékleten 3,5 óra hosszat extraháljuk a faport.

3. Példa

A találmány szerinti hatóanyag előállítása

I) Cukorban gazdag lignin frakció előállítása (PLP)

A PLP előállítását a 2. példában leírtak szerint végezzük.

II) Cukorban szegény lignoid-frakció (LPL) előállítása

Az LPL előállításához az 1. példában szereplő lignit helyett elporított eocén barnaszenet használunk; egyebekben az előállítást az 1. példában leírtak szerint végezzük.

4. Példa

A találmány szerinti hatóanyag előállítás

I) Cukorban gazdag lignin frakció (PLP) előállítása

210 g vörösfenyőtől származó színfát, 60 g bükkfától származó színfát és 30 g prunus avium-tól származó gyümölcshéjat a 2. példában leírtak szerint dolgozunk fel PLP előállítására.

II) Cukorban szegény lignoid-frakció (LPL) előállítása

Miocén barnaszenet szokásos módon benzolt alkalmazva Soxhlet-extrakció segítségével a jelenlévő gyantáktól, zsíroktól és viaszoktól megtisztítjuk, majd a tisztított szenet az 1. példában leírtak szerint feldolgozzuk.

5. Példa

A találmány szerinti hatóanyag rendszer előállítása

I) Cukorban gazdag lignin frakció (PLP) előállítása

210 g vörösfenyő színfát, 90 g Freudenberg-féle szintetikus fát [Freudenberg K., Harkin JM, Modelle für die Bindung des Lignins an die Kohlenhydrate, Chem. Ber. 93, 2814-2819 (1960)] a 2. példában leírtak szerint feldolgozva PLP-t állítunk elő.

A további feldolgozást az 1. példában leírtak szerint végezzük.

6. Példa

A találmány szerinti molekularendszer előállítása

Bükkfából (*Fagus sylvatica* L.) nyert klorit-cellulózból lúgos extrakciót (A5) készítünk, ezt NaClO₂-vel delignifikáljuk

[Feckl, Müncheneri Egyetem (1981)], majd 4 %-os kálium-hidroxid-oldattal FENGEL szerint [Holzforschung 30, 73-78. oldal (1976)] lúgosan extrahálunk, majd a kapott elegyből a szilárd anyagot eltávolítjuk, sterilizzük; ezt követően a 3. napon ebből 900 ml-t (0,12 tömeg % szilárd anyag tartalom, maradék lignin-tartalom 2,3 %) a lignitből nyert LPL-oldathoz (az 1. példa szerint előállítva) adunk. Így 9100 ml 2,1 tömeg %-os 11,4 pH-jú oldatot kapunk. A fragmentálási idő 9 napot tesz ki. Az oldatot ezután, mint azt az 1b ábrán feltüntettük, további feldolgozásnak vetjük alá; eszerint a szilárd anyagot eltávolítjuk, a kapott oldatot molekulaszűrésnek vetjük alá, ehhez ultraszűrést végzünk, lúggal szemben ellenálló membrán alkalmazásával; az alkalmazott membrán nominális szétválasztási határa 28 - 38 kD; a kapott oldat pH-értéke 8 - 14. Ezt követően az oldatot H⁺ ioncserélővel savanyítjuk, majd aszeptikus szűrésnek vetjük alá. A kapott szűrletet 121 °C hőmérsékleten autoklávban hőkezelve sterilizzük, majd az 1. példában leírtak szerint tovább dolgozzuk fel.

7. Példa

A találmány szerinti molekularendszer előállítása

I. lépés:

100 g őrölt Cortex Cinnamoni-t 6 napig 1000 g, demineralizált vízzel készült kálium-hidroxid-oldattal 60 °C hőmérsékleten extrahálunk (a pH-t 8 és 9 közötti értékre állítjuk be). E művelet közben az oldatba oxigént vezetünk be, ezzel az oldat keverését biztosítjuk.

Ezt követően az elegyben lévő szilárd anyagot centrifugálással elkülönítjük, majd a szilárd anyagot eldobjuk. A kapott PLP oldatot autoklávban hőkezeléssel sterilezzük, majd ezt követően az 1. példa II. lépésében kapott LDL termékkel lúgos közegben melegítés közben azonnal reagáltatjuk; a további feldolgozást az 1. példában leírtak szerint végezzük.

Fenti előállítási lépéseket az 1c ábrán szemléltetjük.

8. Példa

600 g, a 3. példában alkalmazott őrlött, nem fekete (előzén) színes szenet 110 g kálium-hidroxidnak és 60 g nátrium-hidroxidnak 10 liter demineralizált vízzel készült oldatával kezeljük szobahőmérsékleten keverés közben; így lúgos feltárást végzünk. A lúgos oldat készítésénél a hidroxid feloldása előtt 20 g aktívszenet adunk az oldat készítéshez használt vízhez és a szenet finoman eloszlatjuk. Az aktív szenet később a szilárd üledékkel együtt centrifugálás segítségével eltávolítjuk; az aktív szenes kezelés a fragmentálendő kiindulási anyag egy előzetes tisztítási lépését jelenti.

Ezt az előzetes centrifugálást legalább 4000-5000 U/perc fordulatszámmal végezzük, ez a fordulatszám szükséges ahhoz, hogy a következő lépésben végzett ultracentrifugálás (gyors centrifugálás) a függőlegesen elhelyezkedő hengerekben (mintegy 40 000 U/per fordulatszámmal) eredményes lehessen; a túl nagy mennyiségű üledék az ultracentrifugálás hatásosságát csökkentené, ami nélkül pedig nem képzelhető el ipari méretű előállítás. Az előzetes centrifugálásnál kapott tiszta oldatot

egyesítjük, 10 literre számítva 8 g aktív szénnel kezeljük, ezután ultracentrifugálást végzünk mindaddig, amíg az ultracentrifugáláshoz használt cső gyakorlatilag tiszta nem marad, és legfeljebb minimális, lakkszerű üledék nyomokat észlelünk.

Az intenzív előtisztításon átment terméket (nyers lúgos hatóanyag oldat) szobahőmérsékleten tároljuk, majd lúgos autofragmentálásnak vetjük alá. A fragmentálási eljárás előrehaladását pH-méréssel követjük. Próbaként legalább kétszer további ultracentrifugálást végzünk a fentiek szerint, így ellenőrizzük, van-e üledékképződés; a gyógyászati szempontból nem kívánatos nem oldódó és nem reakcióképes üledék kondenzátumot folyamatosan eltávolítjuk.

A lúgos autofragmentálás után, tehát 9 nap elteltével, még egyszer ultracentrifugálást végzünk, a még mindig lúgos oldatot ultraszűrésnek vetjük alá, ehhez 30 000 dalton nominális értékű molekulaszűrőt használunk; a frakcionálást kíméletesen végezzük, így 10 liter oldat ultracentrifugálását akkor tekintjük befejezettnek, amikor 7400 ml szűrletet kapunk; a visszatartott folyadék térfogata így mintegy 2000 ml.

Az üledéket eldobjuk, az ultraszűrőt lúgos vízzel alaposan átöblítjük, a szűrletet a következő lépésben dolgozzuk tovább fel; a végtermék szempontjából e lépés látszólag nem lényeges; a savanyú kationcserélő műgyantával (extrém H^+ alak) való kezelés azonban a végtermék számára a végtermék profiljának kialakítása szempontjából fontos.

Az ultracentrifugálásnál kapott oldatot nem lehet sav hozzáadásával egyszerűen megsavanyítani, de az ioncserélő

oszlopokkal való kezelés sem elegendő, mert az utóbbi esetben az oszlop könnyen eltömődik, és egy teljesen alkalmatlan szűrletet kapunk.

A találmány szerinti eljárásnál az ionmentesítést (a Na^+ és K^+ ionok eltávolítását) tételenként egy reakcióedényben végezzük, az ionok eltávolítást folyamatosan megfelelő üveg elektródával mérjük.

A művelet célja az 5,1-es pH elérése, ezt elérve az ioncserélő beadagolását azonnal leállítjuk. Az ionmentesítést a találmány szerinti eljárásnál a még részben lúgos termék állandó keverése közben végezzük, keverő pumpával gondoskodunk arról, hogy ne képződjenek olyan helyek, ahol az ioncserélő koncentrációja túl nagy volna, nem kívánatosan túl savanyú termék képződése a végtermék minőségét befolyásolná.

Mint hogy a végtermék konformációs profilját még nem tudjuk kellő pontossággal mérni, a legbiztosabb módszer, ha találmány szerinti eljárást a legkisebb részleteiben is pontosan követjük; csak így kaphatunk gyógyászati szempontból teljesen azonos hatóanyag rendszert.

Az ionmentesített hatóanyag oldatot ismert módon steril szűrésnek vetjük alá, így az ioncserélés alatt az oldatba került szilárd részeket elkülönítjük, majd az oldatot $121\text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékleten 20 percig autoklávban sterilezzük. Az így kapott hatóanyag oldatot $4 - 20\text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékleten 18 hónapig tárolhatjuk teljes biztonsággal, és alkalmazhatjuk például injekciós célra ampullákba való letöltésre (oldószerként például 0,9 %-os nátrium-klorid-oldatot használva).

Az aktívszenes tisztítás nem jelent nem specifikus tisztítási folyamatot, hanem ezzel a művelettel fragmentálási folyamat körülményeit kívánjuk befolyásolni: célszerűen analitikai minőségű poralakú aktív szenet használunk (ezen aktív szén jellemző adatai: az 5 %-os vizes oldat pH-ja 20 °C hőmérsékleten végzett szűrés után 4,0 - 7,0; a metilénkék adszorpciós képesség értéke 0,15 %-os oldatban: 12 ml/0,1 g értéknél nagyobb).

Lényeges az aktívszén sokoldalú funkciója, így például a felületén lévő oxidok mennyisége, amelyek az aktívszénnek savas vagy lúgos tulajdonságot biztosítanak. A tiszta szénből álló felületek, mint például a grafit felületek ugyan hidrofób jellegű, de a felületi oxidok in situ hidrofil részeket képeznek, ezért az aktívszén vízzel nedvesíthető, és a fragmentálás reakciókörülményeit befolyásolja. Ezenkívül fontos az alkalmazott aktívszén részecskeméret eloszlása is: célszerű, ha a részecskék mérete 50 %-ban 40 mikrométernél kisebb. Ilyen szemcseméret eloszlásnál az aktív szenet jól el lehet különíteni szűrési segédanyagok alkalmazása nélkül is.

A találmány lényege, hogy a lúgos kezeléssel (a kiindulási anyag megválasztásával), a kálium-ionok és nátrium-ionok eltérő hatása révén a termék jellegét befolyásolni lehet. A kálium ionok úgy hatnak a környezetükben lévő víz dipólusokra, hogy a szerkezetet megbontják, ezzel szemben a nátrium-ionok hatására a szerkezet felépül; vagyis figyelembe kell venni az alkáli-ionok polarizációs energiáját is a lúgos fragmentálásnál.

Különböző szerkezeteket és szerkezet képző anyagokat használva a végtermék konformációs profilja befolyásolható.

Az immunológiai és biokémiai vizsgálatok eredményeit figyelembe véve további konformációs változatokat készíthetünk anélkül, hogy az előállítás módszerét meg kellene változtatni. Ez érthető módon megkönnyíti a különböző biológiai vizsgálatok áttekinthetőségét.

9. Példa

A 8. példa szerint előállított, többszöri ultracentrifugálás révén üledékmentesített terméket mikrohullámú kezeléssel rövid ideig $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletre felmelegítjük, majd hagyjuk szobahőmérsékletre lehűlni. A víz kvázi-kolloidális szerkezetű. A $15 - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, a $30 - 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ és a $45 - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérséklettartományokban a szerkezetet kialakító komponensek eltérő kötésben vannak, és $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ feletti hőmérsékleten képez a víz igazán folyékony folyadékot; 30 és $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten a vízmolekulák fele még kvázi kristályos komponenst (K-komponens), felpuhult jeget képez. A K-komponensnél a víz dipólusok H-kötésen keresztül kapcsolódnak; a hőenergia következtében az összekapcsolt dipólusok is rendelkeznek azonban mozgékonyssággal, ami a folyékony-fázis jelleget biztosítja.

Egy bizonyos hőmérséklet felett a K-komponens valódi folyadékká (F-komponens) alakul át.

Amikor bizonyos mennyiségű vizet mikrohullámok segítségével kezelünk, további figyelemre méltó folyamatok következnek be: a víz a mikrohullámok hatására ennek energiáját felhasználva köralakú mozgásba kezd, ezenkívül, minthogy a mikrohullámok energiája a víz réteg vastagságától is függ, heterogén,

turbulenciák által befolyásolt hőmérséklet gradiens alakul ki. Ez ismét hatással van a fent említett kolloidális víz-szerkezetre, következésképpen kaotikus rendszer alakul ki a víz komponens eloszlása és hőmérséklete tekintetében.

Az esetben, ha ezenkívül még különböző polarizációs energiájú ionok is vannak jelen, nem lehet a kaotikus rendszer fragmentálódási folyamatait előre pontosan meghatározni; e folyamatokat empirikusan - technológiai szempontból kell tanulmányozni. Vizsgálataink azt mutatják, hogy a fragmentálódási folyamatot befolyásolva a végtermék konformációs profilja változik. A lúgos termék-elegyet a 8. példa szerint ultracentrifugálva további tisztításnak vetjük alá.

A találmány szerinti eljárásnál a fragmentálás folyamatában alkalmazott ismételt, fizikai úton elért változások módosítják a termék konformációs profilját.

10. Példa

A fotometriás vizsgálatok azt mutatták, hogy a találmány szerinti molekularendszer - mint például a 8. példa szerint előállított - fotonaktiválással 388 - 378 nm között jelentősen módosulhat. Ezeknél az átalakulásoknál a molekularendszerben fotokémiai folyamatok lépnek fel: ezen reverzibilis fotokémiai reakciókat értünk, amelynek során A jelzésű anyag egy másik alakba (konformációba) vagy B jelzésű vegyületté alakul át, ezen át és/vagy visszaalakulások a látható fény vagy az UV fény abszorpciója miatt következnek be.

A találmány szerinti eljárásnál a molekula rendszert addig

kezeljük 388 nm-es hullámokkal, amíg - az extinkció állandó ellenőrzése mellett például 90 perc eltelte után - egy extinkciós maximum nem jelentkezik; a 388 nm-es monokróm besugárzást egy kétsugaras fotométer alkalmazásával egyidejűleg mérésre is használhatjuk, és az eredményeket regisztráljuk (6. ábra) (sávszélesség kb. 5 nm).

Az extinkciós maximum mérése mellett (6. ábra) a konformációs modulálást fluoreszcencia méréssel (a gerjesztéses spektrum regisztrálásával) ellenőrizhetjük: a molekula rendszerben lévő foton felvevő egységeket fotokróm hatásnak kitéve a gerjesztéses spektrofluorometriával mérhető görbelefutást kapunk, amely messzemenően eltér a kiindulási mintánál kapott görbelefutástól, amelynek felépítése: elektronleadó molekularendszer - konjugált rendszer - elektron akceptor = auxokróm-kromogén-kromofor). Az UV-fénnyel létrehozott változás fokozza a molekularendszer kívánatos variációinak számát, és kedvezően befolyásolja a kemoterápiás hatást in situ, illetőleg in vivo körülmények között. Az UV fénnyel aktivált hatóanyag oldat alkalmas arra, hogy klinikai kísérletekben nemcsak az AIDS-nél, hanem a T-sejt limfománál a T-limfocitákra hasson. A fehérvérsejteknek ez a csoportja központi szerepet játszik az immunreakció koordinálásánál. E sejtek fontos szerepet játszanak nemcsak a HIV fertőzésnél (CD-4-receptorokkal rendelkező T-segítősejtek), de a CTCL-nél (bőrön fellépő T-sejt-limfoma). Ismeretes, hogy a 8-MOP - amely furángyűrűből és kumarinból áll - UV fénnyel való aktiválás után képes a CTCL-re hatást gyakorolni. A fenti eljárással előállított, UV-fénnyel aktivált

vegyületet elegendő parenterális készítmény formájában beadni.

Általánosságban megállapíthatjuk, hogy a fapor extrakciójának körülményei nagymértékben befolyásolják az oldható poliszacharid-lignin egységek molekuláris struktúráját. Az extrakció során kapott mátrix molekuláris szerkezete nagymértékben függ a kiindulási anyagtól, vagyis attól, melyik fától vesszük a színfát, vagy milyen szalmát vagy fűvet használunk. Annak érdekében, hogy a növényvédőszer maradványait kiszűrjük, idős fákat használunk.

Meghatározó szerepe van annak is, hogy melyik faféléseget (fenyőfa, lombosfa), továbbá hogy a növénynek melyik részét használjuk (dióhéj, barackmag, puhafa rész); így például dióhéj alkalmazása esetén a P és L kötés lényegesen szilárdabb, mint puhafánál.

Az előállítandó termék szempontjából lényeges az LD-PLP háló szerkezet extrakciója; erre a célra alkalmazhatunk lúgos extrakciót, továbbá forró vízzel/vízgőzzel végzett extrakciót nyomás alatt (autoklávban), vagy pedig elektrolízist, ahol elektrolitként nátrium-kloridot használunk.

A találmány szerinti molekularendszernél a szénhidrátok az aromás mag szerkezete körül perifériásan helyezkednek el; ezek a szénhidrátok (a cellulózból, továbbá a lignitből stb. származó glükóz molekulák) nem képeznek hidat az aromás komponensek között, hanem perifériás rajt alakítanak ki.

A lignit-cellulóz-fragmenteket azért könnyű 2 n sósav-oldattal hidrolizálni, minthogy egyes glükóz-csoportokban a primer hidroxil-csoport oxidált állapotban van, így a cellulóz

lánc a közbe kapcsolt glukuronsav egységek révén meg van szakítva (vagyis oxi-cellulózról van szó).

A találmány szerinti molekularendszer perifériáján szabad cellulóz, kötött cellulóz, glükozidos kötéssel kötött egyszerű cukrok (legfontosabb monoszacharidként: glükóz) helyezkedik el. A szerkezet magjában, aromás egységekből álló, erősebben elszenesedett reakcióképes centrum áll, ezt egy kevésbé elszenesedett reakcióképes külső rész (periféria) veszi körül.

A molekularendszer legegyszerűbb formájában cukorláncokból áll, amely aromás/fenolos magra kapcsolódik, amely maga is központi és perifériás részre osztható az elszenesedés mértéke szerint.

A találmány szerinti molekularendszer igen sok olyan szerkezeti egységet tartalmaz, amelyek a természetes szénhidrátok és az aromás vegyületek tartományába tartoznak.

Ezt követően az 1. példa szerint előállított terméket különböző sejtszisztemek segítségével vizsgáljuk.

A találmány szerinti hatóanyag rendszer vizsgálata HIV-vel fertőzött humán limfocitákon

Újszülöttek köldökzsínórijából levett vérből származó limfocitákat alkalmazzuk vizsgálati rendszerként; a limfocitákat 2 napig 10 µg/ml fitohemagglutininnal (PHA) előzetesen aktiváljuk. A sejtenyésztés rendszer egy igen szenzitív limfocita rendszert képez, ami alkalmas a HIV vizsgálatokhoz. Mintegy 200 000, PHA-val aktivált, köldökzsínór vér limfocitát 1 ml-es térfogatú, a vizsgálati terméket tartalmazó tenyésztésben HIV-2ROD HIV-2-izolátumával fertőzzük (a végkoncentráció mintegy 10⁶ cfu/ml).

200 syncytiát képező egység/ml). Három nappal a fertőzés után fénymikroszkópos vizsgálatot végzünk a fertőzött tenyészetben (ellenőrizzük a vírusok által indukált sejtfúzió, az úgynevezett syncytiák képződését).

A találmány szerinti eljárással előállított hatóanyag rendszert feloldjuk a táptalajban anélkül, hogy ezt követően steril szűrést végeznénk. Vizsgáljuk a 200 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ és 0,2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú mintákat. Két sarzsot, az A88-1 és az A88-4-es jelzésű tételt vizsgáljuk.

A 88-4 jelzésű tétel vizsgálata Syncytia képződés gátlás tekintetében 24 nyílású vizsgálati lemezen

Koncentráció	A kiértékelés 3-4 nappal a fertőzést követően történik fénymikroszkóppal	
Koncentráció	Syncytia képződés	Csírázóképesség
200	-	jó koloniák
100	-	jó koloniák
50	-	jó koloniák
20	+	jó koloniák
kontroll tenyészet	+++	

II. charge vizsgálata Syncytiaképződés gátlása tekintetében

Célsejtek: perifériás lymphociták (PBL)

Vírus: HIV-2ROD, 10^5 SFU/ml, mintegy 1 500 000 cpm/ml/90 perc alkalmazott végső hígítás: 1:500

Koncentráció (μ g/ml)	Syncytia képződés		
	a 2.	3.	4. napon
1	+	+	+
5	+	+	+
10	+/-	+/-	+/-
25	-	-	-
35	-	-	-

Koncentráció ($\mu\text{g/ml}$)	Syncytia képződés		
	a 2.	3.	4. napon
50	-	-	-
75	-	-	-*
100	-	-	-*
150	citotoxikus		

* enyhén citotoxikus

Mint a fenti táblázatokból kitűnik, ez a tétel 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció felett hatásosnak mutatkozott.

A találmány szerinti molekularendszer anti-HIV hatásának vizsgálata

A találmány szerinti hatóanyag rendszert két koncentrációban in vitro vizsgáljuk 2 mg/ml és 16 mg/ml-nél. Ennek során a p24 jelzésű HIV-mag proteint antigén befogásos technikával H9-jelzésű sejtekkel végzett primer fertőzés után vizsgáljuk.

Pozitív kontroll anyagként foszfono-hangyasavat, továbbá AzT és ddC különböző koncentrációjú hígításait használjuk. Ennél a vizsgálatnál mindkét találmány szerinti eljárással előállított tétel vírusellenes hatást mutatott (a vizsgálatot a labor 1 végezte).

Labor 2 vizsgálata:

MT-2 jelzésű sejtekkel végzett primer fertőzés nyomán a syncytia képződést ellenőrzi.

Vizsgálati eredmények

Labor 1

Hatóanyag koncentráció $\mu\text{g/l}$ -ben	A p24 gátlása %-ban		
	Adaptogen 2 mg/ml	Adaptogen 16 mg/ml	Foscarnet
1	30	30 - 50	
4	30	50 - 75	
10			50 - 75
20	50 - 75	75	
50			75
100	75	75	toxikus
500	toxikus	75	toxikus
<u>becsült EC 50</u>	<u>15-20 $\mu\text{g/ml}$</u>	<u>1-2 $\mu\text{g/ml}$</u>	<u>10 $\mu\text{g/ml}$</u>

Pozitív kontroll: AzT-t és didezoxicytidint (dC) esetenként 1 - 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban vizsgálunk; a p24 expressziót 75 %-ban gátolja cytotoxicitás nélkül.

Labor 2

Hatóanyag koncentrációja $\mu\text{g/ml}$	A syncytia képződés gátlása %-ban	
	Adaptogen 2 mg/ml	Adaptogen 16 mg/ml
0,1	33	
0,16		14,5
1	50	
1,6		

Hatóanyag koncentrációja	A syncytia képződés gátlása %-ban	
	Adaptogen	Adaptogen
$\mu\text{g/ml}$	2 mg/ml	16 mg/ml
10	82	
16		88
48		100
100	100	
160		100
500	némileg toxikus	
EC 50	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$

Pozitív kontroll: ddA 0,25 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban (90 %-os gátlás), továbbá 2,5 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban (100 %-os gátlás).

A fentiekből kitűnik, hogy a találmány szerinti hatóanyag rendszer nyilvánvalóan gátolja a HIV vírusok támadását a sejteken.

A találmány szerinti hatóanyagrendszernek gyógyító dózisokban történő (mintegy 0,1 mg/kg testtömeg humán kezelésnél) tartós beadás után sem lép fel szenzibilizáló hatás, a hatóanyagrendszer nem toxikus és nem mutat mellékhatásokat. A találmány szerinti hatóanyag rendszerben hidrofil tartományok vannak, amelyek biztosítják a hatóanyag jó vízoldékonyságát.

Magától értetődik, hogy a szakember számára ismert, különböző változtatásokkal, így például egyéb monomereknek a

felületen történő megkötésével a találmány szerinti megoldás kiterjeszhető és bővíthető.

A fentiek alapján megállapítható, hogy a találmány szerinti hatóanyag rendszer alkalmas tartós kezeléshez; a tartós kezelés során nem lép fel hatáscsökkenés; kétséges esetekben rizikó nélkül alkalmazható. Általában a találmány szerinti hatóanyag rendszer gyógyító hatást mutat, és problémamentesen adható be injekció formájában. A fenti kísérletekből kitűnik, hogy a molekularendszer szignifikáns vírusellenes tulajdonságokkal rendelkezik.

I. vizsgálati sorozat (túlélési-hatás kimutatása adjuváns sejterhelés nélkül)

A találmány szerinti molekularendszer - mint az alábbiakból kitűnik - kontra-eszkalatív (restitutív) tulajdonságokkal is rendelkezik. A központi idegrendszer akut zavarainál, így például traumánál, agysérüléseknél, ischémiánál stb. egyidejűleg rendszerint a központi neuronokhoz tartozó sejtek károsodása, illetőleg pusztulása is fellép. Hasonlóképpen a központi idegrendszer számos neurológiai és neurodegeneratív megbetegedésénél (a Parkinson kórnál, az Alzheimer-kórnál, a Korsakoff-féle szindrómánál) jellemző módon fellép a szelektív neuronok pusztulása.

Ennek következtében a központi neuronok sejtpusztulásának, illetőleg túlélésének vizsgálata különösen jelentős. Az elmúlt években a neurotrófeás faktorok is a neuron-Glia-kölcsönhatás tanulmányozása során a kutatók új ismeretekhez jutottak a neuronok in vivo és in vitro túlélése tekintetében. Ide tartozik

a membrán lipidek - beleértve a gangliozidokat és a foszfolipideket is - jelentőségének vizsgálata az idegsejtek életképességének szempontjából. Az idegsejt tenyészeteken végzett kísérletek azt mutatják, hogy a peroxid és oxigén gyökök a membrán lipidek megtámadása révén szerepet játszanak az idegsejtek pusztulásában, illetőleg túlélésében.

Vizsgálati anyagok és módszerek

I. Hippocampus neuron tenyészet előállítása

17 napos patkány embrióktól vett Hippocampust tripszin/EDTA kezeléssel és mechanikus vágással disszociálunk, majd polilizinnel bevont lemezekre viszünk. Egy tapadási szakasz után, amelyhez 10 %-os szérumot használunk, a sejtek jól növekednek egy adott szérummentes táptalajban.

II. Fluoreszcencia vizsgálat

Két fluoreszcencia szinezéket alkalmazunk kombinálva, hogy az élő és az elpusztult sejteket egymástól eltérően megfessük; fluoreszcín-dietátot (FDA) csak az élő sejtek vesznek fel, nem fluoreszkáló közbenső lépésként, majd a továbbiakban az FDA-t hidrolitikusan felhasítjuk, és fluoreszkáló vegyületté (Fluoreszein) alakítjuk. Az etidium-bromid (EtBr) nem lép be az élő sejtekbe, hanem csak az elpusztultakba, fluoreszkáló fényben a sejtmagot az elpusztult sejt esetében vörös színűre festi.

Tápközeg

DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium), Seromed, München

FKS (borjúszérum, fetus), Seromed, München

10 % DMEM-ben (1/2 óra 56 °C-nál inaktiválva)

HM (hormon elegy)

Inzulin $8,8 \times 10^{-7}$ mól
 transferrin $1,1 \times 10^{-8}$ mól
 trijód-tyronin 3×10^{-10} mól
 hidrokortizon 2×10^{-10} mól

DMEM-ben

Hatóanyag koncentráció értékek

Az ampullában 2 mg/ml koncentrációjú oldat van.

hígítás DMEM-mel		A táptalaj végkoncentrációja (100 μ l/2 ml)	
1:10	200 μ g/ml	10 μ g/ml	(1)
1:100	20 μ g/ml	1 μ g/ml	(2)
1:1000	2 μ g/ml	100 ng/ml	(3)
1:10 000	200 ng/ml	10 ng/ml	(4)
1:100 000	20 ng/ml	1 ng/ml	(5)

A fenti (1) - (5) koncentrációjú oldatot a megtapadt sejtekhez a tapadási fázist követően a táptalajhoz adjuk. A sejtek túlélését 48 óra eltelte után vizsgáljuk. 3-3 tenyészetből 15 - 15 nyílást (mintegy 50 neuron/nyílás) vizsgálunk.

Eredmények

A túlélési vizsgálat pozitív eredményt mutat 100 ng/ml táptalaj koncentrációnál a neuronok túlélésének tekintetében a kontrollhoz viszonyítva. 10 μ g/ml-nél enyhén toxikus hatás lép fel.

A túlélési hatás értékelésénél tekintetbe kell venni, hogy a sejtek optimális körülmények között nőnek; a túlélés lényeges javulása nem várható. Ezért kézenfekvő, hogy a kísérleteket optimálisnál rosszabb (szuboptimális) feltételek között végezzük (II. vizsgálati sorozat).

Hipp.-ből származó neuronok in vitro ellenőrzése 48 óra eltelte után

Élő/holt sejtek viszonya

II. vizsgálat

A neuronok túlélése a sejtek károsítása után

A mikrokinematográfiai felvételek azt mutatták, hogy azok a sejtek, amelyek tartósan egy halogénlámpa fényének középpontjában voltak, hamarabb elpusztultak, mint azok, amelyek a fény középpontján kívül helyezkedtek el.

E hatás okának vizsgálatánál irodalmi utalásokat találtunk, hogy azon sejttenyészetek táptalajában, amelyek ki vannak téve tartós fényhatásnak (ahol a rövidhullámok aránya jelentős), a fény hatására letális termékek képződnek. Triptofán illetőleg Triptofán/riboflavin tartalmú táptalaj besugárzásánál (ahol 365 nm-es UV fényt alkalmazunk) toxikus mennyiségben képződik H_2O_2 [McCormick, J.P., Fischer, J.R., Pachlatko, J. P. és Eisenstark, Science 191, 468-469 (1976); továbbá Wang, R.J. és Nixon, B.T.: In Vitro 14, 8. szám, 19-22 (1978)].

A sejtek öregedésével és a sejtek károsodásával kapcsolatos vizsgálatoknál a figyelem a H_2O_2 és az oxigén gyökök toxikus tulajdonságai felé fordult.

A találmány szerinti hatóanyag elegynek a halogénlámpával előidézett toxikus folyamatra kifejtett gátló hatását tanulmányozzuk az alábbiak szerint.

Egy előkísérlettel meghatározzuk a megvilágításnak azt az időtartamát, amely a sejtek túlélését lényegesen csökkenti, de nem idézi elő a sejtek teljes pusztulását.

Módszer:

17 napos patkány embriók hippocampus-ából származó neuronokat a fentiek szerint preparálunk. A tenyészetet tartalmazó tálcákat 3-4 óra hosszat inkubációs szekrénybe helyezünk, majd ezt követően a csészéket kivéve fény besugárzásnak tesszük ki. A hatóanyagot háromféle hígításban friss táptalajhoz keverve a tenyészethez adjuk, majd a tenyészetet 20 óra hosszat tovább inkubáljuk. A sejtek túlélését a fentiekben ismertetett fluoreszcencia vizsgálattal ellenőrizzük. Kontrollként fénnel kezelt és nem kezelt sejtek szolgálnak, ezekhez hatóanyag nélküli friss táptalajt adunk a vizsgálati tenyészeteknél leírtakkal egyidejűleg.

Fénnyel való megvilágítás:

500W-halogénlámpát használunk reflektorral; távolság: 40 cm; (a fény erősségét a Petri-csészében mérjük: LW 18,5); a fény besugárzás időtartama 20 perc. A fénykezelés alatt a Petri-csészéket temperáló vízfürdőn tartjuk; a hőmérsékletet közvetlenül a csészékben lévő táptalajban mérjük; a hőmérséklet nem haladja meg a 34 °C-t.

Eredmények:

Az eredményeket a 4. ábra szemlélteti; 24 óra eltelte után

a tenyészetben lévő túlélő sejteket százalékban tüntetjük fel.

Az ábrán lévő oszlopok jelentése:

- 1) túlélés fénykezelés nélkül 24 óra eltelte után;
- 2) fénykezelés után hatóanyag nélkül;
- 3) fénykezelés és 1 $\mu\text{g/ml}$ hatóanyag hozzáadása után;
- 4) fénykezelés és 0,1 $\mu\text{g/ml}$ hatóanyag hozzáadása után;
- 5) fénykezelés és 0,01 $\mu\text{g/ml}$ hatóanyag hozzáadása után.

A fenti körülmények között a tenyészetben lévő neuronok túlélése jól látható; 1 $\mu\text{g/ml}$ hatóanyag koncentráció esetén a sejtek túlélést mutatnak. 48 óra eltelte után túlélő hatás nem figyelhető meg. Lehetséges, hogy normális körülmények között egy kismértékű toxikus hatás elfedi a védőhatást; a védőhatás azonban a fény hatására bekövetkező károsodásnál jól észlelhető.

Nem vizsgáltuk azt a kérdést, hogy a spektrum melyik része felelős a letális hatásért. Azt azonban kizártnak tartjuk, hogy a táptalaj a fényben lévő jelentős hosszú hullámhosszúságú sugárzás következtében felmelegedne, és ez okozná a sejtek károsodását.

Szabadalmi igénypontok

1. Molekularendszer a vírusos fertőzések kemoterápiás kezelésére, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a molekula-rendszert úgy állítjuk elő, hogy

I) poliszacharidban gazdag lignin egységeket (PLP) állítunk elő:

fa vagy fa jellegű anyagokat és/vagy növényi sejttenyészeket gyengén savanyú-lúgos vizes közegben extrahálva; (A)

az oldhatatlan szilárd komponenseket elkülönítve;

II) alacsony molekulásúlyú, poliszacharidban szegény lignoin egységeket (LPL) állítunk elő:

elszenesedett fatermékeket vagy bioátalakításon átment faszzerű anyagot 7 - 14 pH-jú vizes lúgos extrakciónak alávetve (B);

a lúgban oldhatatlan szilárd komponenseket szűréssel eltávolítva;

III) vízoldható polimerizátum elegyet [(LD(PLB=LPL)] állítunk elő:

az I) lépésben kapott poliszacharidban gazdag lignin egységeket a II) lépésben kapott poliszacharidban szegény lignoid egységekkel vizes-lúgos körülmények között 9-12 pH-n reagáltatva; a kapott HD-PLP=LPL-polimerizátum elegy LD frakcióját 15-40 kD nominális értékű szűrővel ultraszűréssel elkülönítve, és a visszamaradó anyagot elöntve;

majd a kapott szűrletet pH = 3-7 értékig H⁺ kationcserélővel kezelve,

majd a kapott savas LD(LPL-PLP) rendszert szokásos módon kinyerve.

2. Az 1. igénypont szerinte molekularendszer, a z - z a l j e l l e m e z v e, hogy az I) lépésben olyan poliszacharidban gazdag lignin egységeket (HD-PLP) állítunk elő, amelyeknek mérete 100 kD alatt van, amikor is

a vizes közeggel való extrakció és az oldhatatlan szilárd részek elkülönítése után a pH-t semleges-gyengén savas értékre állítjuk, és molekulaszűrést, előnyösen ultraszűrést végzünk, ahol 100 kD-nál kisebb értékű szűrőt, célszerűen 70 kD-nél kisebb értékű szűrőt alkalmazunk; majd a szűrőn maradt anyagot eldobjuk;

és az így kapott szűrletet III) lépésben tovább reagáltatjuk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti molekularendszer, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a II) lépésnél előállított alacsony molekulájú poliszacharidban szegény lignoid egységek (LD-LPL) mérete 40 kD értéknél kisebb, aholis a vizes-lúgos extrakció és a lúgban oldhatatlan szilárd komponensek eltávolítása után 8 pH felett lúgos fragmentálást végzünk, majd ultraszűrést végzünk 15 - 35 kD nominális értékű szűrő alkalmazásával,

majd a kapott terméket a III) lépésben tovább reagáltatjuk.

4. Az 1-3. igénypont szerinti molekularendszer, a z - z a l j e l l e m e z v e, hogy a poliszacharidban gazdag frakcióknak a poliszacharidban szegény frakcióval való reakciója után az elegyben lévő szilárd anyagot eltávolítjuk, és a szűr-

letet tovább feldolgozzuk.

5. Az 1-4. igénypont szerinti molekularendszer, a z - z a l j e l l e m e z v e, hogy a III) lépésnél kapott savanyú LD(LPL-PLP)-oldat feldolgozásánál részecskeszűrést, és pirogén anyagok eltávolítását végezzük szűrés segítségével, majd ezt követően a szűrletet sterilizzuk és kiszerezjük.

6. Az 1-5. igénypont szerinti molekularendszer, a z - z a l j e l l e m e z v e, hogy az I) lépésnél fa jellegű anyagént

A1: természetes fát;

A2: fa analógot, így növényi sejt kultúrák segítségével előállított faszerű anyagot;

A3: Freudenberg-féle dehidrálós polimerizációval mono- és/vagy dilignolokból készült, illetőleg DHP-nek poliszacharidra történő ojtásával készült szintetikus fa analógok;

A4: klorit-facellulóz lúgos extrakciójával előállítható lignin-poliszacharid-komplexet;

továbbá az A1, A2, A3 és A4-nál felsorolt komponensek elegyét alkalmazzuk.

7. Az 1-6. igénypontok szerinti molekularendszer, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a II lépéshez növényi kiindulási anyagként

B1: természetes elszenesedési termékeket;

B2: lignolitikusan aktív mikroorganizmusok segítségével biokonvertált fát;

B3: izolált lignolitikus enzimek segítségével, így fenoloxidázzal biokonvertált fát;

vagy a B1, B2, B3-nál felsorolt komponensek elegyét alkalmazzuk.

8. Az 1-7. igénypontok szerinti molekularendszer, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az előállításához bázisként kálium-hidroxidot, nátrium-hidroxidot, lítium-hidroxidot vagy ammóniát alkalmazunk.

9. Az 1-8. igénypontok szerinti molekularendszer, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a poliszacharid lignin egységek (PLP) koncentrációja 0,05 - 10 tömeg%, előnyösen 0,05 - 2 tömeg%, még előnyösebben 0,1 tömeg%.

10. Az 1-9. igénypontok szerinti molekularendszer, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a PLP-t 12-14 pH-értéknél előnyösen kálium-hidroxidban 1 - 10 napig szobahőmérsékleten (20 °C) extraháljuk.

11. Az 1-10. igénypontok szerinti molekulakötés rendszer, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a PLP extrakciót 120 °C hőmérsékletig terjedő magasabb hőmérsékleten végezzük, aholis 100 °C fölött autoklávban dolgozunk.

12. Az 1-11. igénypontok szerinti molekularendszer, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy elszenesedett fatermékként lignitet, színes szenet vagy barnaszenet alkalmazunk.

13. Az 1-12. igénypontok szerinti molekularendszer, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a lúgos extrakciót 0,1 - 0,8 mólos kálium-hidroxiddal, előnyösen 0,4 mólos kálium-hidroxiddal végezzük szobahőmérsékleten.

14. Az 1-13. igénypontok szerinti molekularendszer, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a lúgos fragmentálást 7-10 napig 11 pH-n kálium-hidroxiddal végezzük szobahőmérsékleten.

15. Az 1-14. igénypontok szerinti molekularendszer, a z - z a l j e l l e m e z v e, hogy a PLP=LPL polimerizátum elegy előállítását szobahőmérséklet és 120 °C közötti hőmérsékleten 8 - 14, célszerűen 10 - 12 pH értéken végezzük.

16. Az 1-15. igénypontok szerinti molekularendszer, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az LD(PLP=LPL) polimerizátum elegyet szobahőmérsékleten molekulaméret szerinti szétválasztásnak vetjük alá az LD frakció elkülönítésére, amikor is előnyösen alacsony nyomású ultraszűrést végzünk lúggal szemben ellenálló ultraszűrő membránt alkalmazva, ahol a szűrő mérete 18 - 38 kD.

17. Az 1-16. igénypontok szerinti molekularendszer, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az LD(PLP=LPL) polimerizátum elegyben az alkálifém ionokat műgyanta kationcserélővel cseréljük le hidrogén ionra, ahol a pH értéket 4 - 6,8, előnyösen 5-6 érték közé állítjuk be.

18. Az 1-17. igénypontok szerinti molekularendszer, a z - z a l j e l l e m e z v e, hogy a savanyú LD(PLP=LPL)-frakciót szűrve azt a pirogén anyagoktól mentesítjük, majd ezt követően autoklávus kezelésnek vetjük alá, előnyösen 121 °C hőmérsékleten 11 percig végezve a sterilizációt.

19. Az 1-18. igénypontok szerinti molekularendszer, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a PLP=LPL polimerizátum elegy vizes oldatát

folyékony gyógyászati készítménnyé alakítjuk, illetőleg kenőcs anyagok alkalmazásával kenőccsé vagy pedig oldat alkalmazásával oldattá alakítjuk.

20. Az 1-19. igénypontok szerinti molekularendszer, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az LD(PLP=LPL) poli-merizátum elegy vizes oldatát önmagában ismert módon ampullákba injekciós célokra letöltjük.

21. Eljárás a vírus fertőzések kemoterápiás kezelésére alkalmas molekularendszert tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az 1. igénypont szerinti molekularendszert a gyógyászatban szokásosan alkalmazott segéd- és vivőanyagok segítségével parenterálisan és lokálisan alkalmazható gyógyászati készítménnyé alakítjuk.

22. A 21. igénypont szerinti molekularendszert tartalmazó készítmény alkalmazása, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a készítményt retrovírusok, elsősorban HIV típusú, továbbá AIDS-vírusok ellen alkalmazzuk.

23. Az 1. igénypont szerinti molekularendszer alkalmazása, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a molekularendszert nemesfémekhez, mint platina, arany és palládium, kelátképzőként, illetőleg komplexképzőként alkalmazzuk.

A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

[Handwritten signature]

5

[Handwritten signature]

[Faint handwritten notes]

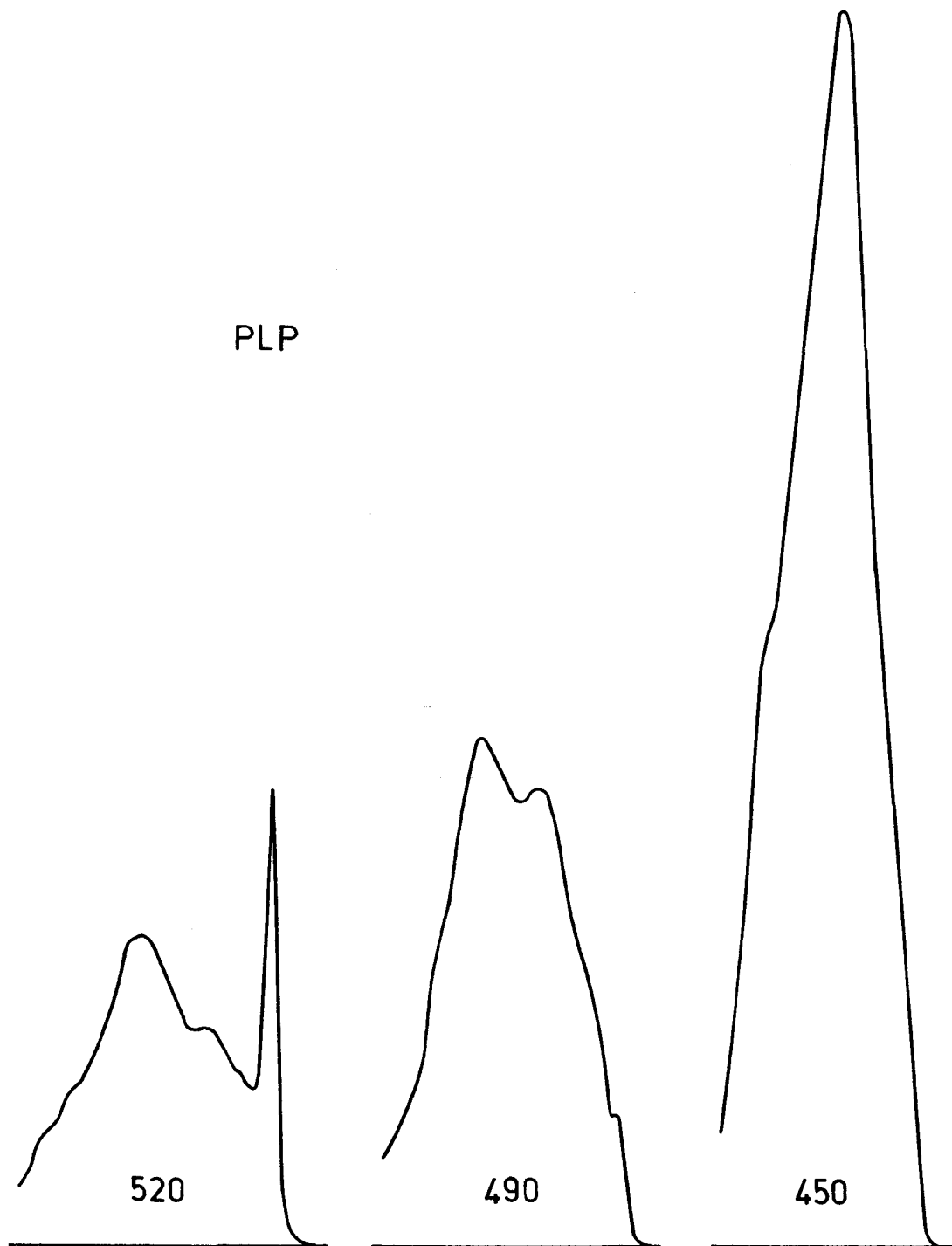
7032

68910

P 92 03747

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

6/1



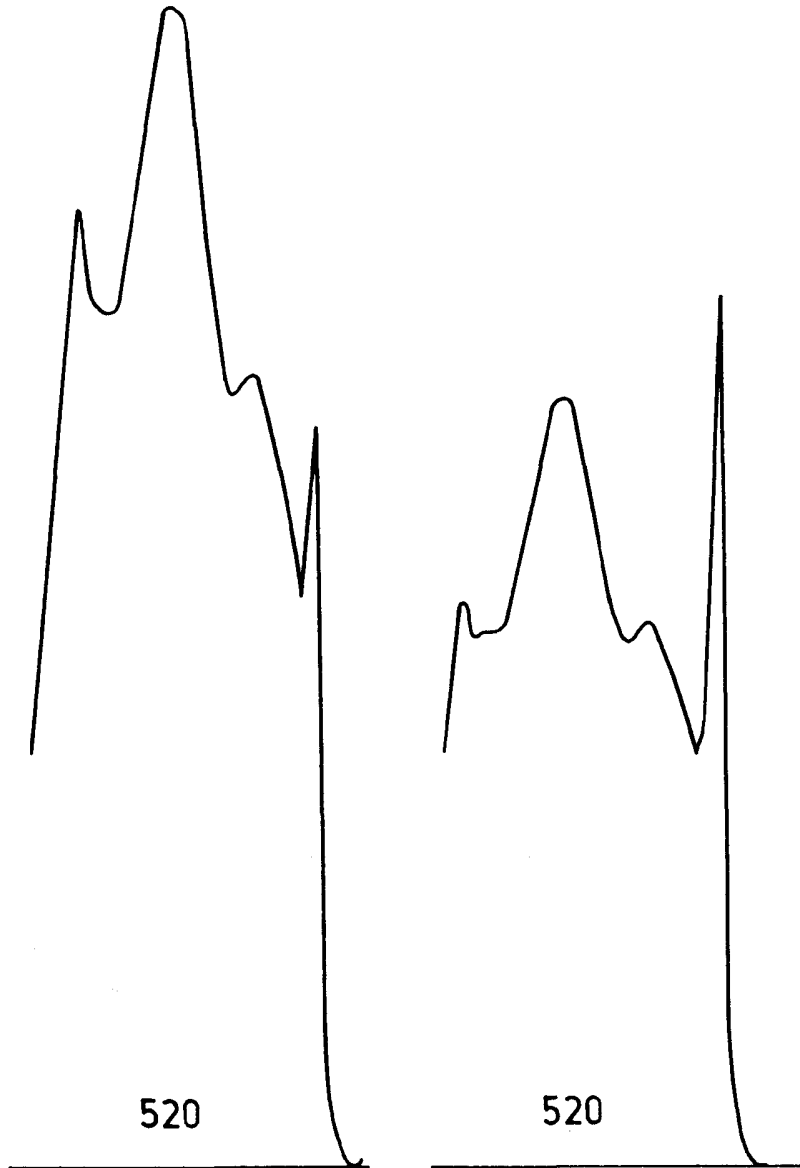
2.c ábra

2.b ábra

2.a ábra

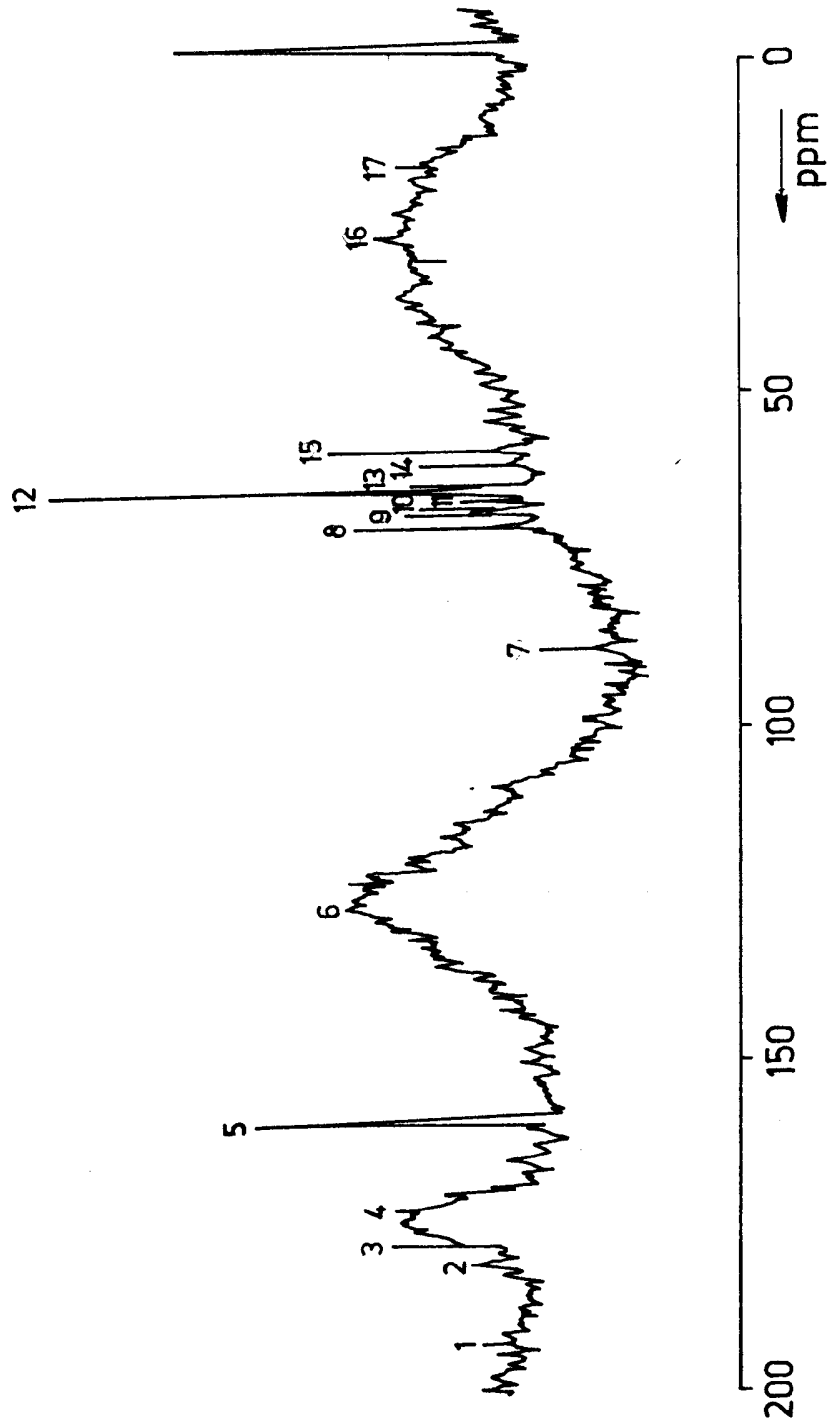
DANUBIA
Szabványi és Védjegyiroda Kft.
6.

[Handwritten signatures]

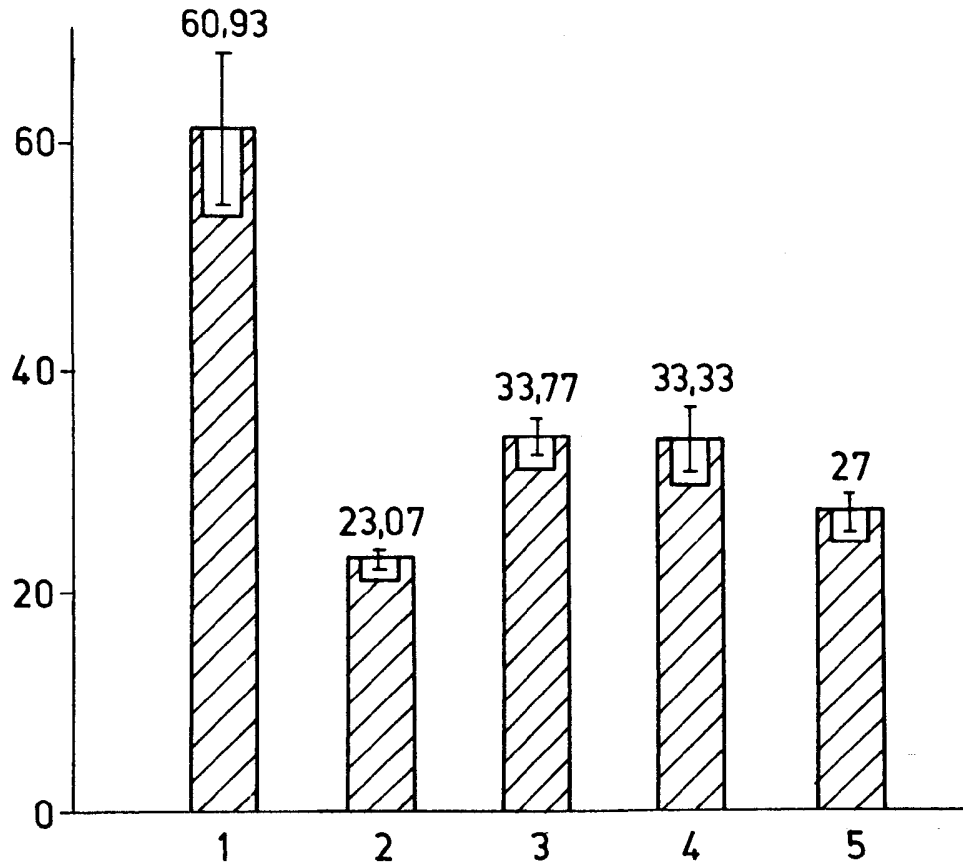


2.e ábra

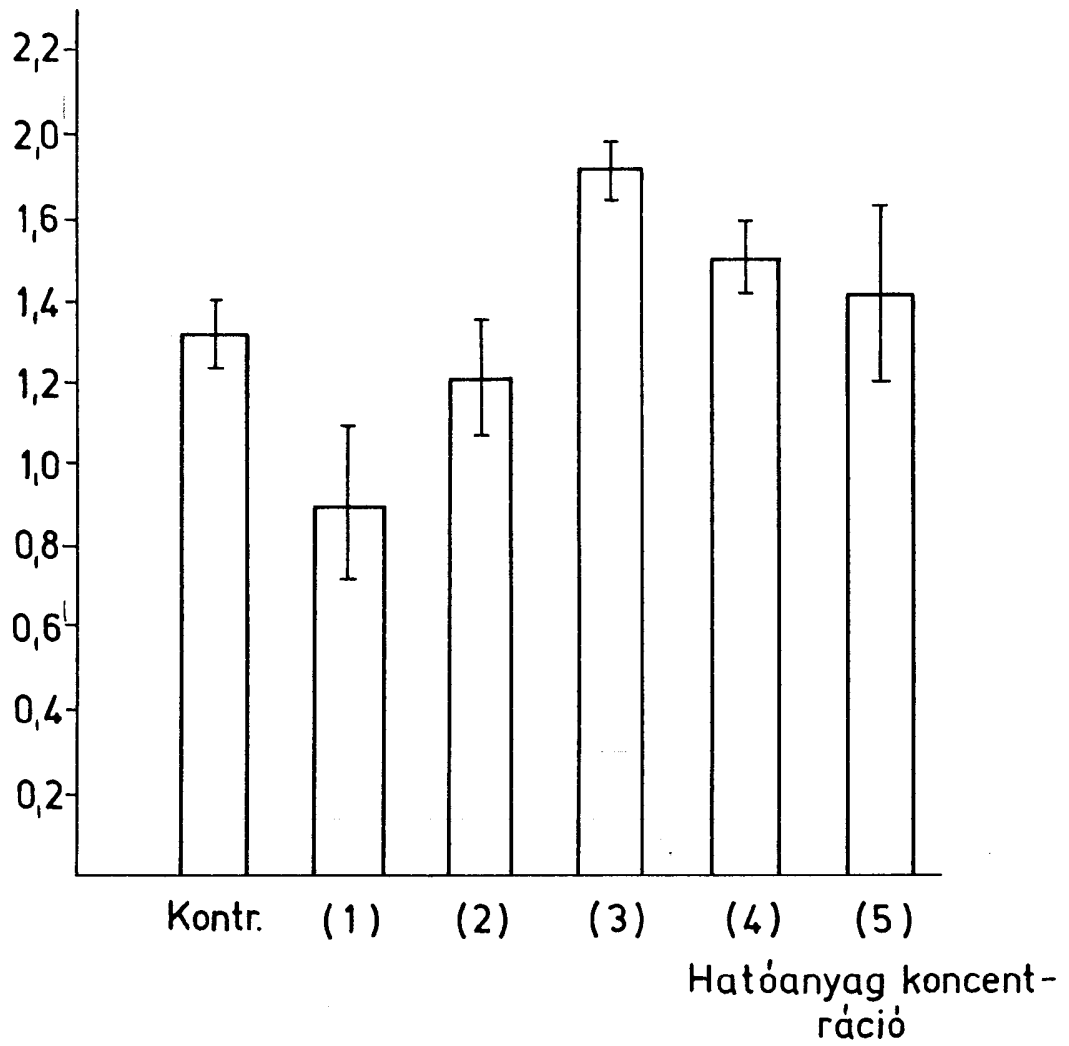
2.d ábra



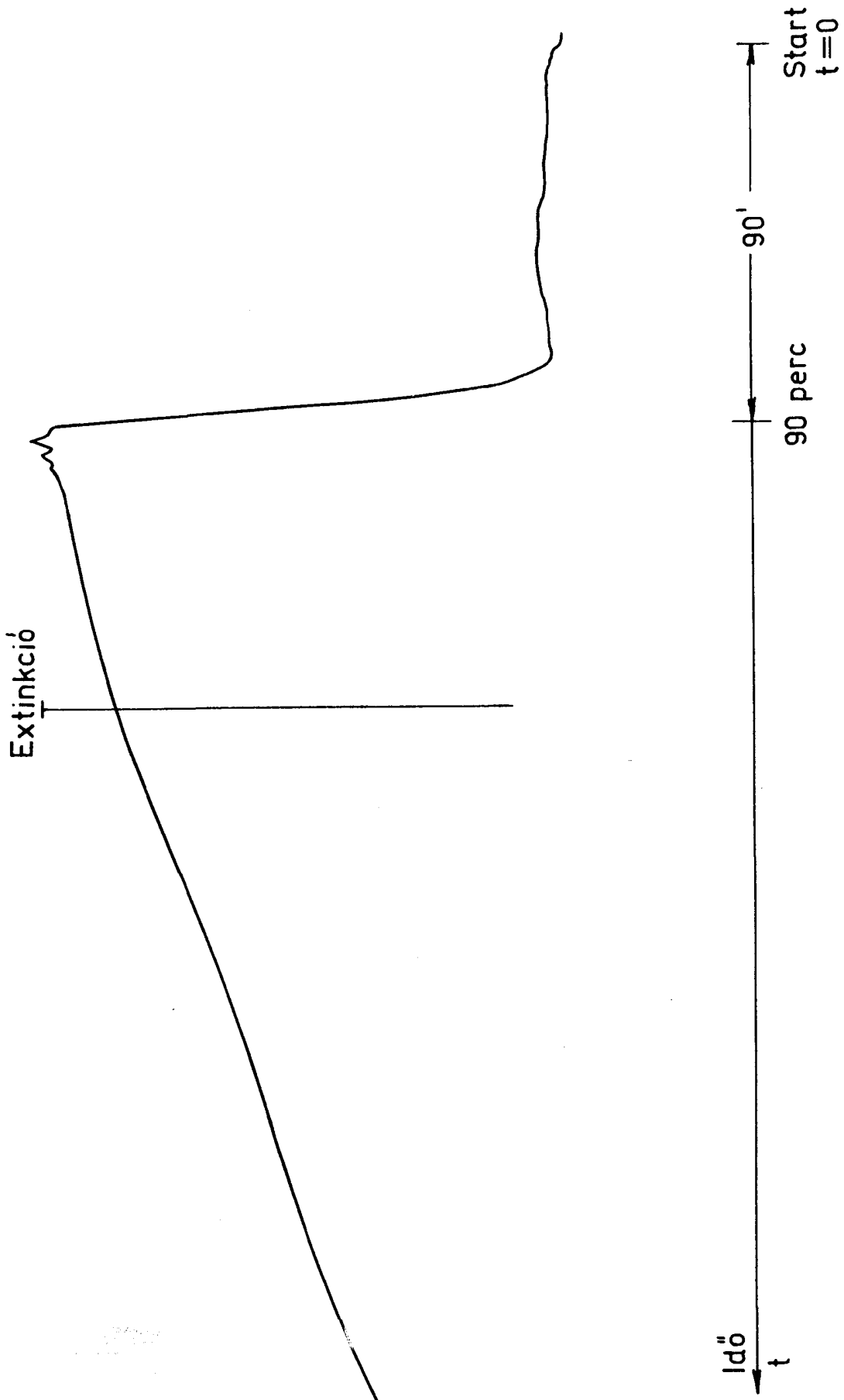
3. ábra



4. ábra



5. ábra



6. ábra