

## SALVIA FAJTÁKBÓL NYERT ANTIVIRÁLIS AKTIVITÁSÚ VEGYÜLETEK

### K i v o n a t    K Ö Z Z É T É T E L I P É L D Á N Y

A találmány olyan készítményekre vonatkozik, melyekben a hatóanyag(ok) legalább egy olyan csoportot tartalmaz(nak), amely egy (1) általános képletű  $\beta$ -(3,4-dihidroxifenil)-tejsavból és/vagy egy (2) általános képletű koffeinsavból származik - melyek a *Salvia* nemzetséghez tartozó növények kivonataiban találhatóak -, ahol a képletekben

$R^1$  jelentése -OH, -O- vagy <sup>kelvini</sup> egy kötés;

$R^2$  jelentése -H vagy <sup>kelvini</sup> egy kötés;

$R^3$  jelentése -OH vagy -O-;

$R^4$  jelentése <sup>kelvini</sup> egy kötés vagy -C(O)- $R^5$  csoport, ahol  $R^5$  jelentése

-OH vagy egy kötés;

$R^6$  jelentése -H vagy <sup>kelvini</sup> egy kötés; és

$R^7$  jelentése -H vagy <sup>kelvini</sup> egy kötés,

továbbá az aktív hatóanyag molekulatömege nagyobb, mint 190 dalton.

Az előnyös hatóanyagok közé tartoznak a konjugált formák, ezek lehetnek a fenti csoportok dimer, trimer, tetramer és nagyobb tag-számú polimerjei; a leginkább előnyös hatóanyagok a szalvianolsav dimerjei, trimerjei, tetramerjei és nagyobb tagszámú polimerjei.

A készítmények tartalmazhatnak szokásos segédanyagokat is, és alkalmazhatók szisztémásan vagy lokálisan.

felmondás ér: (1)/(2)

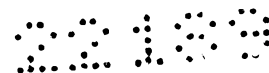
Dr. B. B. B. B. B.

**SALVIA FAJTÁKBÓL NYERT ANTIVIRÁLIS  
AKTIVITÁSÚ VEGYÜLETEK KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY**

A jelen találmány a *Salvia* nemzetségből származó növények kivonataiból származó aktív anyagok alkalmazására vonatkozik. Az aktív hatóanyagok legalább egy  $\beta$ -(3,4-dihidroxifenil)-tejsavból és/vagy koffeinsavból származó csoportot tartalmazó molekulakonjugátumból állnak. Az előnyös aktív hatóanyagok a szalvianolsav, ennek di-, tri-, és tetramerjei. Az aktív anyagot önmagában vagy előnyös módon kombinációban alkalmazhatjuk vírusfertőzések vagy vírusok által közvetített egyéb állapotok kezelésében.

A találmány előzményeit az alábbiakban ismertetjük.

***Salvia miltiorrhiza***. A *Salvia miltiorrhiza* (SM) régóta használatos növény a hagyományos kínai orvoslásban szívérrendszeri-, és májbetegségek kezelésében. A növényből nyert kivonatok jelentős májvédő hatással rendelkeznek mind *in vitro*, mind *in vivo* (Hase és mts., *Planta Med.*, 63:22-26. oldalak, 1997). A magnézium-litospermát-B lehet az egyik fő aktív májvédő hatású komponens az SM-ben (Liu és mts., *Chung Kuo Chung Hsi Chih Ho Tsa Chih*, 13:352-353. oldalak, 326, 1993). Az SM szintén tartalmaz antioxidánsokat, melyek elősegítik a membránkárosodások helyreállítását a vírusos miokarditisz kezelése során (Meng és mts., *Chung Kuo Chung Hsi Chih Ho Tsa Chih*, 12:345-347. oldalak, ill. 324-325. oldalak, 1992). Krónikus B-típusú hepatitiszben szenvedő betegekben szintén hatásos volt az SM-el és/vagy a Polyporus Umbellatus poliszahariddal (PUP) végzett kezelés (Xiong, *Chung Kuo Chung Hsi Chih Ho Tsa Chih*, 13:33-35. oldalak, ill. 516-517. oldalak, 1993). Az



SM növényi kivonatai szintén rendelkeznek anti-HIV aktivitással (US 5 178 865) és anti-hepatitisz aktivitással is (98/24460 számú nemzetközi bejelentés; 1 192 922 és 1 192 918 számú kínai szabadalmi bejelentések). Ismertek a herpesz, a polio, a kanyaró, a varicella zoster, a citomegalia-vírus, DNS-, és RNS-vírusok ellen hatékony antivirális anyagok, melyek mind tartalmazznak legalább egy, a *Salvia miltiorrhiza* Bunge gyökeréből származó nyersanyagot (568 001 számú európai szabadalmi irat). *Salvia*-kivonatokat herpesz-vírus elleni készítményként is készítettek (US 5 411 733).

Az SM több extrahálható összetevővel bír. A gyökérben levő komponenseket kezdetben alkohollal vonták ki, melyet hideg vizes [SM(1)], vagy meleg vizes [SM(2)] kivonás követett. Mindkét vizes frakció antivirális aktivitásúnak bizonyult.

További antivirális anyagokat fejlesztettek ki, melyek a vírus életciklusának különböző helyeit célozzák meg. Például kifejlesztettek a retrovírusok okozta fertőzések kezelésében alkalmazott vírusellenes anyagokat, melyek retrovírus specifikus enzimeket - pl. a reverz transzkriptázt (RT) és az integrázt - támadják meg. A kutatás tovább folytatódik egyéb vírusellenes anyagok azonosítására, olyan betegségek kezelésére, mint pl. a herpesz, a hepatitisz és az influenza.

***Retrovírusok elleni antivirális anyagok.*** Az integráz fehérjét megcélzó antivirális anyagok között vannak peptid-inhibitorok (US 5 578 573), nukleinsavkötő inhibitorok (US 5 756 287 és 5 587 468), valamint olyan vegyületek, mint az Equisetin (US 5 759 842) és az ermoofilán szeszquiterpenoidok (US 5 858 738). Napjainkban számos, már azonosított, és az FDA-nak jóváhagyásra beterjesztett HIV-

ellenes vegyület közül csak az RT- és proteázgátlókat engedélyezték.

**A koffeinsav mint antivirális anyag.** A koffeinsavat izolálhatjuk a *Bougainvillea spectabilis* Wild (Nyctaginaceae) szárából, melyet népi gyógyszerként alkalmaznak a hepatitisz kezelésében (Chang és mts., *Anticancer Res.*, 14:501-506. oldalak, 1994). Az eredmények szerint a koffeinsav gátolja a xantin-oxidázt, amely számos betegséggel kapcsolatos, például a köszvéennyel, a hepatitiszrel és daganatokkal (Chan és mts., *Anticancer Res.*, 15:703-707. oldalak, 1995; és Chang és mts., 1994). A koffeinsav oxidációs terméke (KOP) gátolja az emberi 1. és 2. típusú herpeszvírust (Thiel és mts., *Acta Virol.*, 27:200-208. oldalak, 1983). A koffeinsav-tetramer és egy koffeinsav-tetramer-glukozid dikálium- és nátrium-kálium sói anti-HIV aktivitással bírnak (Kashiwada és mts., *J. Nat. Prod.*, 58:392-400. oldalak, 1995). A kereskedelmi célból gyártott koffeinsav szintén vírusellenes aktivitású, melyet a HIV RT-vizsgálattal igazoltak (Kreis és mts., *Antiviral Res.*, 14:323-337. oldalak, 1990). A koffeinsav-fenetilészter (CAPE) gátló aktivitású a HIV-1 integráz fehérjével szemben (Fesen és mts., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:2399-2403. oldalak, 1993; Fesen és mts., *Biochem. Pharmacol.* 48:595-608. oldalak, 1994; Burke és mts., *J. Med. Chem.* 38:4171-4178. oldalak, 1995; Mazumder és mts., *J. Med. Chem.* 39:2472-2481. oldalak, 1996). Azonban a koffeinsav-polimerek előállításának módszere hatással volt a HIV-1 és HIV-2 elleni gátló aktivitásukra. (Nakashima és mts., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 40: 2102-2105. oldalak, 1992). A koffeinsavat - a fahéjsavval és a rozmaringsavval együtt - szintén

javasolták az influenza vírusfertőzések kezelésére antioxidáns aktivitásuk miatt (98/30228 számú nemzetközi bejelentés).

**Rozmaringsav és litosperminsav mint vírusellenes anyagok.**

A rozmaringsav a koffeinsav dimerje. A rozmaringsav dimerje pedig a litospermát-B. Mind a rozmaring-, mind a litosperminsavat azonosították az SM-gyökér kivonataiban (Kohda és mts., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 37: 1287-1290. oldalak, 1989). A rozmaringsav anti-HIV aktivitással bír (Arda és mts., *J. Nat. Prod.* 60: 1170-1173. oldalak, 1997), és a vegyület valószínűleg egy 1. típusú (HSV-1) Herpesz szimplex vírus-gátlószer (Dimitrova és mts., *Acta Microbiol. Bulg.* 29: 65-72. oldalak, 1993). A rozmaringsavat javasolták gyulladásos megbetegedések és eltérések kezelésére is (US 4 329 361).

**Fahéjsav mint vírusellenes anyag.** A fahéjsav szubsztituált észterei gátolják az A-típusú/Hong Kong (H3N2) influenzavírus fertőző aktivitását (Serkedjieva és mts., *J. Nat. Prod.* 55:294-302. oldalak, 1992); A fahéjsav-származékok szterilizszterei *in vitro* antivirális aktivitással bírnak a *Picornaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* és *Herpesviridae* vírusok ellen ("Antiviral activity of cholesteryl esters of cinnamic acid derivatives", *Z. Naturforsch.* 53:883-887. oldalak, 1998; és Conti és mts., *Antivir. Chem. Chemother.* 9:511-515. oldalak, 1998). A szubsztituált fahéjsavak dehidrogenezett polimerjeit szintén alkalmazták a HIV-1 kezelésében (US 5 346 695 és 5 632 980).

**Szalvianolsav.** A szalvianolsavról eddig még nem közöltek vírusellenes aktivitást az irodalomban. A szalvianolsav számos formájáról (pl. szalvianolsav-A, acetil-szalvianolsav) ismert, hogy antioxidáns tulajdonságúak (Lin és mts., *J. Biochem. Pharmacol.*, 51:1237-



1241. oldalak, 1996). A szalvianolsavat szintén javasolták májkárosodás és fibrózis megelőzésére - amely a vegyület anti-lipid peroxidációs hatásának tulajdonítható (Hu és mts., *Acta Pharmacol. Sin.* 18: 478-480. oldalak, 1997) -, ill. koronária érbetegség kezelésére (2 131 423 számú japán szabadalmi irat). A szalvianolsav irodalomban közölt további formáihoz tartoznak a *Salvia cavaleriei* vizes kivonatából izoláltak (pl. szalvianolsav-A, B, C, H és I) [Zhang és mts., *Planta Med.*, 60: 70-72. oldalak, 1994)] vagy a *S. miltiorrhiza*-ból nyert formák (pl. szalvianolsav-K, amely egy koffeinsav-trimer) [Kasimu és mts., *Chem. Pharm. Bull.*, 46:500-504. oldalak, 1998; és Tezuka és mts., *Chem. Pharm. Bull.*, 46:107-112. oldalak, 1998)]. A szalvianolsav F2 és F3-at előállíthatjuk szintetikusán Dhalla és mts. által leírtaknak megfelelően (Dhalla és mts., *Tetrahedron*, 55: 6923-6930. oldalak, 1999; és Dhalla és mts., *Tetrahedron Lett.*, 39:8285-8286. oldalak, 1998). A *Salvia* család további tagjait használhatjuk a Danshen forrásaként, ezek a következők: *S. bowleyana*, *S. deserta*, *S. miltiorrhiza* var. *miltiorrhiza* f. *alba*, *S. paramiltiorrhiza*, *S. paramiltiorrhiza* f. *purpureo-rubra*, *S. przewalskii*, *S. prsewalskii* var. *mandarinorum*, *S. sinica* f. *purpurea* és *S. trijuga* (Kasiumu és mts., 1998). Leírtak módszereket olyan növények létrehozására, melyekben bizonyos vegyületek - mint pl. a szalvianolsav - másodlagos metabolitjainak fokozott mennyiségét lehet észlelni (US 5 869 340, 1999).

**(3,4-dihidroxifenil)-tejsav.** Az SM fő összetevője a „Daschensu”, kémia nevén a  $\beta$ -3,4-dihidroxifenil-laktát (Fen és mts. *Acta Acad. Med. Primae Sanghai*, 10:133-136. oldalak, 1983; Zhao és mts., *Chin. Pharm. J.*, 29: 291-293. oldalak, 1994). Utóbbi egy köztes



vegyület, melyet a rozmaringsav sejtenyészetben való előállításánál alkalmaznak (Al-Sereiti és mts., *Indian. J. Exp. Biol.*, 37:124-130. oldalak, 1999; Bogucki és mts., *Can. J. Chem.*, 75:1783-1794. oldalak, 1997 és US 5 011 775).

A vírusközvetített betegségek kezelése antivirális készítményekkel igen költséges is lehet. Például a HIV-1 kezelése betegenként reverz transzkriptáz- és proteázgátlókkal egy évben 12 000- 20 000 amerikai dollárba kerül. Tekintettel arra, hogy a HIV-fertőzött betegek döntő többsége a fejlődő országokban található, gazdaságilag költséghatékonyabb gyógyszerelési lehetőségeket kell azonosítani a HIV és egyéb vírusbetegségek kezelésében. A jelen szabadalom új módszereket szolgáltat olyan új vegyületek - ill. ezeket tartalmazó készítmények - azonosítására, előállítására és felhasználására, melyeket antivirális gyógyszerként használhatunk.

### **A találmány összefoglalását az alábbiakban ismertetjük.**

A találmány egyik vonatkozásában olyan készítményekre vonatkozik, mely olyan molekulákat tartalmaz, melyek legalább egy, az (1) általános képletű  $\beta$ -(3,4-dihidroxifenil)-tejsavból és/vagy a (2) általános képletű koffeinsavból származó csoportot tartalmaznak - melyek a *Salvia* nemzetség kivonataiban találhatóak -, ahol a fenti aktív hatóanyagok molekulatömege legalább 190 dalton.

A  $\beta$ -(3,4-dihidroxifenil)-tejsav-származékban  $R^1$  jelentése -OH, O- vagy egy kötés, és  $R^2$  jelentése pedig -H vagy egy kötés.

A koffeinsav-származékban az  $R^3$  jelentése -OH vagy -O-;  $R^4$  jelentése egy kötés vagy  $-C(O)-R^5$  csoport, ahol  $R^5$  jelentése -OH vagy

egy kötés;  $R^6$  jelentése -H vagy egy kötés;  $R^7$  jelentése -H vagy egy kötés.

A találmány egy másik megvalósítási formája egy konjugációs termékre vonatkozik, amely a szalvianolsav és/vagy a dehidrogenezett szalvianolsav monomerjeinek homo- vagy heteropolimerje (ennek molekulatömege kb. 492 vagy nagyobb); vagy a konjugációs termék acetyl-, észter- vagy anhidrid-származékai vagy annak gyógyászatilag elfogadott sói. A találmány egy előnyös megvalósításában a konjugációs termék az (I) általános képletű szalvianolsav és/vagy a (II) vagy (III) általános képletű dehidrogenezett szalvianolsav monomerjeinek homo- vagy heteropolimerje.

A képletekben  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , és  $R^6$  jelentése hidrogénatom vagy kötés, és a fenti homo- vagy heteropolimerek monomer egységei egymáshoz az  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  és  $R^6$  csoportokon keresztül kapcsolódnak.

A jelen találmány magában foglal egy antivirális hatóanyag előállítására vonatkozó módszert is, melyben a szalvianolsavat lúgos pH-n inkubáljuk és így a szalvianolsavnál nagyobb antivirális aktivitású homo- vagy heteropolimerek képződnek.

A jelen találmány hatóanyagai antivirális aktivitásúak és gyógyászatilag elfogadott hordozóanyagokkal mind szisztémásan, mind helyileg adagolhatóak.

**Az ábrákat az alábbiakban ismertetjük röviden.**

**1. ábra:** a 4. példában szereplő 5. vegyület háromdimenziós ábrázolása.

2. **ábra:** a 4. példában szereplő 6. vegyület háromdimenziós ábrázolása.
3. **ábra:** a 4. példában szereplő 7. vegyület háromdimenziós ábrázolása.
4. **ábra:** a 4. példában szereplő 8. vegyület háromdimenziós ábrázolása.
5. **ábra:** a 4. példában szereplő 9. vegyület háromdimenziós ábrázolása.
6. **ábra:** a 4. példában szereplő 10. vegyület háromdimenziós ábrázolása.
7. **ábra:** a 4. példában szereplő 11. vegyület háromdimenziós ábrázolása.
8. **ábra:** a 4. példában szereplő 12. vegyület háromdimenziós ábrázolása.
9. **ábra:** a 4. példában szereplő 13. vegyület háromdimenziós ábrázolása.
10. **ábra:** a 4. példában szereplő 2. vegyület háromdimenziós ábrázolása, amely a szalvianolsav 24-es és 38-as szénatomjának dehidrogenezése révén képződik.
11. **ábra:** a 4. példában szereplő 3. vegyület háromdimenziós ábrázolása, amely a szalvianolsav 24-es és 35-ös szénatomjának dehidrogenezése révén képződik.
12. **ábra:** a 4. példában szereplő 4. vegyület háromdimenziós ábrázolása, amely a szalvianolsav 27-es és 38-as szénatomjának dehidrogenezése révén képződik.
13. **ábra:** a 4. példában szereplő 24. vegyület háromdimenziós ábrázolása.

**A találmányt az alábbiakban ismertetjük részletesen.**

A jelen találmány egy alternatív megközelítést alkalmaz növények kivonataiból - konkrétan a *Salvia* nemzetségből származó kivonatokból - való gyógyszerfejlesztésre. Ezek az aktív hatóanyagok gátolják a vírusintegrációt számos különböző vírusban, beleértve a retrovírusokat is. A találmány egy előnyös megvalósításában az aktív hatóanyagok gátolták a vírusgenom egészének vagy egy részének a gazdasejt genomjába való integrációját. Az aktív hatóanyagok gátolhatják a vírusfertőzéseket, a vírus terjedését és/vagy szaporodását a vírus életciklusának egy más részével való interakció útján.

A *Salvia* nemzetség (*Lamiaceae* család) kb. 700 tagból áll, melyeket a trópusi és mérsékeltégségi területeken találhatunk, ebből mintegy 300 fajtát Ázsiában, Európába és Afrikában, míg 400 fajtát Amerikában (J.C. Willis, „A DICTIONARY OF FLOWERING PLANTS AND FERNS”, 7<sup>th</sup> edition, Cambridge, University Press, 1966; J. Briquet, Labiatae, „DIE NATURLICHEN PFLANZENFAMILIEN” Vol. IV., 3a, 183-375 [Engler and Prantl eds., Englemann, Leipzig, 1897]). A jelen találmány antivirális vegyületei és készítményei a *Salvia* nemzetség bármelyik tagjából származhatnak, de előnyben részesítjük az SM-et és az SY-t.

**A) Fogalmak**

A „hatékony vírusgátló mennyiség”, a „terápiásan hatékony mennyiség” vagy a „terápiásan hatékony dózis” azt jelenti, hogy az aktív hatóanyag(ok) adott mennyiségét beadva egy vírusfertőzésben vagy vírus-közvetített betegségben szenvedő egyénnek, utóbbi állapotokban javulás lép fel vagy a fertőzés gátlódik olyan mérték-

ben, amely felülmúlja a hatóanyag(ok) által okozható bármely negatív mellékhatást. Az ilyen hatóanyagokat „antivirális hatóanyagoknak” tekinthetjük.

A „vírus-közvetített állapot” egy betegség megjelenési formát jelez, melyet vírusfertőzés során észlelünk. Például az AIDS-hez kapcsolt komplex (ARC) egy, a HIV-1 fertőzéssel összefüggő állapot.

Az „antivirális aktivitás” egy olyan tulajdonságot jelent, amely egy vírusfertőzés vagy azzal összefüggő állapot gátlását vagy enyhítését hozza létre. A találmány szerinti antivirális aktivitású vegyületek előnyös módon gátolják a fertőzést *in vitro* 1  $\mu\text{M}$  vagy annál kisebb, vagy kevésbé előnyösen 10 mM vagy annál kisebb koncentrációban.

Az „integráz-aktivitás”: egy integráz fehérje vagy egyéb fehérje, amely képes a gazdasejt genomjába beépíteni egy vírusnak a teljes vagy részleges genetikai állományát. Az integráz fehérjék többsége a *Retroviridae* vírusok családjába tartozó vírusokkal kapcsolatosak.

„*Salvia* nemzetségű növény”: a *Lamiaceae* családba és a *Salvia* nemzetségbe tartozó növény. A találmány szerinti vegyületek izolálására előnyösen alkalmazható *Salvia*-ák a „*Salvia miltiorrhiza*” vagy „SM”, ill. a „*Salvia yunanesis*” vagy „SY”.

„Konjugált származékok” vagy „nagyobb polimerek”: egy olyan aktív hatóanyag, amely dimerekből, trimerekből, tetramerekből stb. áll, melyben a monomer egység az (1) és (2) általános képletű vegyületek egyike.

Ezen utóbbi részegységekből képzett konjugált származékok vagy nagy polimerek lehetnek homodimerek, homotrimerek, homotetramerek stb., vagy heterodimerek, heterotrimerek,

heterotetramerek stb. A konjugált származékra egy példa a litospermát-B, amely a rozmaringsav dimerje; ez utóbbi viszont a koffeinsav dimerje.

### **B) Vírusok**

Az itt leírt antivirális vegyületekre és készítményekre érzékeny vírusfertőzések kezelése vagy gátlása a jelen találmány oltalmi körébe tartozik. Az előnyös vírusok a következő családok tagjai: hepatitisz vírusok, herpesz vírusok, ortomixovírusok, papillómavírusok, paramixovírusok, pikornavírusok, poliomavírusok és retrovírusok.

**Retrovírusok.** Az itt leírt vegyületeket és készítményeket előnyös módon retrovírus fertőzések kezelésére fogjuk felhasználni. Bár a retrovírusok egy jól meghatározott és viszonylagosan homogén vírusnemzetséghez tartoznak, rendszertanilag az idők folyamán három alcsoportra osztották őket, alapvetően a fertőzés patológiai következményei alapján. Az onkovírusok alcsoportjában olyan retrovírusok vannak, amelyek daganatos betegséget okoznak a megfertőzött gazdában, hasonlóan több rokonjellegű, látszólagosan jóindulatú vírushoz. A lentivírusok lassú lefolyású, krónikus betegségeket váltanak ki, amelyekben – bár nem mindig – nincs daganatos átalakulás. A lentivírusokat még nem sikerült egyértelműen bármely humán vagy állati megbetegedéssel összefüggésbe hozni.

A retrovírusos replikáció a virion magjának intracitoplazmatikus bejutásával kezdődik, mely folyamatot a vírusburok glikoprotein és egy specifikus sejtfelszíni receptor kölcsönhatása hoz létre. Ezt követően egy virionhoz kapcsolt RNS-dependens DNS-polimeráz átírja az egyszálú RNS genomot egy duplaszálú lineáris DNS



provírusos köztitermékre (reverz transzkripció). Az integráló fehérje (az integráz) specifikusan felismeri a vírus DNS mindkét végét és két nukleotidot eltávolít a 3' végekről (3' donor folyamat). Ez a virális DNS és az integráz ezután a magba vándorolnak, ahol a vírus integráz kovalens módon összeköti a retrovírus genomját a gazdasejt kromoszoma DNS-ével (lánc transzfer), így létrehozza a retrovírusos provírust.

Az 1. típusú (HIV-1) humán immunhiány vírus megjelenése - mint egy jelentős emberi kórokozó - fokozta a retrovírusok iránti tudományos érdeklődést. Konkrétan az eredmények arra utaltak, hogy a fentiekben vázolt egyszerű életciklus nem jellemzi teljes mértékben valamennyi retrovírus replikációs ciklusát. Például a HIV-1 a típusos retrovírusos Gag, Pol és Env-n kívül még nem kevesebb, mint hat génterméket kódol; ezek transzlációja egy új egyszeresen, ill. többszörösen hasított vírus mRNS csoportból történik. Az új fehérjék közül legalább kettő, a Tat és a Rev transz módban működnek a HIV-1 génexpresszió közvetlen szabályozására. Tehát míg a penetráció és a provírus integráció közötti lépések elég hasonlóknak bizonyultak az MLV (egérleukémia vírus) és a HIV-1 esetében, addig az integrációt követő folyamatok az utóbbi esetében lényegesen összetettebbnek bizonyultak. Utóbbi időben nyilvánvalóvá vált, hogy a HIV-1 egy olyan állati retrovírus családba tartozik, melyet jelenleg „komplex” retrovírusoknak hívunk. A komplex retrovírusok ezen csoportjába tartozik az összes lentivírus, spumavírus, ill. a HTLV-1 és rokon vírusai (1. táblázat).

### 1. táblázat:

#### a retrovírusok fő rendszertani felosztása

| Kategória             | Alcsoport                     | Prototípus | Más példák                   |
|-----------------------|-------------------------------|------------|------------------------------|
| Egyszerű retrovírusok | C-típusú retrovírus A-csoport | RSV        | ALV, ASV                     |
|                       | C-típusú retrovírus B-csoport | MLV        | FeLV, MSV, SNV<br>REV, SSV   |
|                       | B-típusú retrovírus           | MMTV       |                              |
|                       | D-típusú terovírus            | MPMV       | SRV-1                        |
| Komplex retrovírusok  | Lentivírusok                  | HIV-1      | HIV-2, SIV, visna vírus, FIV |
|                       | T-sejtes leukémia vírusok     | HTLV-1     | EIAV, HTLV-II,               |
|                       | Spumavírusok                  | HSRV       | STLV, BLV<br>SFV, BFV        |

Rövidítések: RSV, Rous-szarkóma vírus; ALV, madár leukémia vírus; ASV, madár szarkóma vírus; FeLV, macska leukémia vírus; MSV, egér szarkóma vírus; SNV, lép-elhalás vírus; REV, retikuloendoteliózis vírus; SSV, majom szarkóma vírus; MMTV, egér melldaganat vírus; MPMV, Mason-Pfizer majom vírus; SRV-1, majom 1. típusú retrovírus; STLV, majom T-sejtes leukémia vírus; BFV, borjú habos vírus.

A provírus integráció lépései hasonlóak az egyszerű és komplex retrovírusokban, ezért egy retrovírus integráz-gátlószer számos szervezetet képes gátolni, mint pl. a humán immunhiány vírust (HIV), a majom immunhiány vírust (SIV), a macska immunhiány vírust (FIV), a macska leukémia vírust (FeLV), az egér leukémia vírust (MuLV), a Rous-szarkóma vírust (RSV), a borjú immunhiány vírus (BIV), és humán T-sejtes leukémia vírust (HTLV). Fenti retrovírusokon kívül a találmány szerinti aktív hatóanyagokat alkalmazhatjuk integráz-

jellegű fehérjék gátlószereiként, más vírusok - mint pl. a hepatitisz-B vírus (HBV) - replikációjának gátlására.

**Egyéb vírusok.** A szabadalomban ismertetett aktív hatóanyagokat felhasználhatjuk egyéb vírusfertőzések kezelésére, mint pl. a hepatitisz vírusok, a herpesz vírusok, az ortomixovírusok, a papillóma vírusok, a paramixovírusok, a pikornavírusok és a poliómavírusok. Fentiek közül az aktív hatóanyagokkal való kezelésre előnyben részesített vírusok felsorolását az alábbi táblázat tartalmazza:

**2. táblázat**

| <b>Vírus család</b> | <b>Szokványos név</b>  | <b>Gazdaállat</b>   |
|---------------------|--|---|
| Hepadnaviridae      | hepatitisz B<br>amerikai mormota<br>hepatitisz B<br>kacsa hepatitisz B   | ember<br>amerikai mormota<br>szárnyas   |
| Herpesviridae       | Herpesz szimplex 1<br>Herpesz szimplex 2<br>Varicella zoster<br>Epstein Barr<br>Citomegalovírus<br>Borjú fertőző vírus<br>Rinotraheitisz vírus<br>Borjú mamillitisz vírus<br>Ló abortusz vírus<br>Pseudorabiesz vírus<br>Marek betegség<br>Pulyka herpeszvírus | ember<br>ember<br>ember<br>ember<br>ember<br>emlős<br>emlős<br>emlős<br>emlős<br>emlős<br>emlős<br>madár<br>madár |
| Orthomyxovirinae    | Influenza A<br>Influenza B<br>Influenza C  | számos fajta<br>főleg ember<br>főleg ember  |
| Papillomavirinae    | Borjú papillóma 1 vírus (BPV-1)<br>Borjú papillóma 2 vírus (BPV-2)<br>Borjú papillóma 4 vírus (BPV-4)  | marha<br>marha<br>marha   |

|                 |   |  |
|-----------------|---|--|
|                 | CRPV<br>DPV<br>Humán papillóma 1<br>vírus (HPV-1)<br>HPV-5<br>HPV-6<br>HPV-8<br>HPV-11<br>HPV-16<br>HPV-18<br>HPV-31<br>HPV-33  | nyúl<br>szarvas<br>ember<br><br>ember<br>ember<br>ember<br>ember<br>ember<br>ember<br>ember                |
| Paramyxovirinae | Humán parainfluenza<br>vírusok 1-4<br>SV5<br>Mumasz vírus<br>Newcastle-betegség<br>vírus<br>Kanyaró vírus<br>Kutya disztemper<br>vírus<br>Marhavész vírus<br>Légzési szinkciális<br>vírus (RSV)<br>Borjú légzési<br>szinkciális vírus   | ember<br><br>kutya<br>ember<br>csirke<br><br>ember<br>kutya<br><br>marha<br>ember<br><br>marha             |
| Picornavirinae  | Humán polió vírus<br>Humán coxakivírus<br>Humán echovírus<br>Humán enterovírus<br>Humán hepatitisz A<br>Disznó enterovírus 1-11<br>Borjú enterovírus 1-2<br>Humán rinovírus 1-100<br>Borjú rinovírus 1-2<br>Száj-és körömfájás<br>vírus 1-7<br>Enkefalomiokarditisz<br>Ló rinovírus 1-2 | ember<br>ember<br>ember<br>ember<br>ember<br>disznó<br>marha<br>ember<br>marha<br>marha és ember<br><br>ló |
| Polyomavirinae  | Poliómavírus<br>Majom vakuolizáló<br>vírus 40 (SV40)<br>Limfotróf papovavírus<br>(LPV)<br>BKV<br>JCV<br>Nyúlvese vakuolizáló<br>vírus (RKV)   | egér<br>majom<br><br>majom<br><br>ember<br>ember<br>nyúl   |

Lásd "Fundamental Virology" (Bernard N. Fields és mts., eds., 1991).



### **C) A vegyületek előállításának módszerei**

Bármely *Salvia* fajtából nyerhető - előnyös módon az SM-ből és az SY-ból -, az aktív hatóanyagot tartalmazó növényi kivonatok elkészítésének általános körülményeit az 1. példában ismertetjük. A vegyületek szintetikus úton az alábbiak szerint állíthatók elő. A különböző, a  $\beta$ -(3,4-dihidroxifenil)-tejsav vagy a szalvianolsav és/vagy a koffeinsav alkotórészeket tartalmazó vegyületek létrehozására az adott vegyületeket 5 mg/ml koncentrációban inkubáltuk 0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ -ban, maximum 24 óráig. Utóbbiak magukban foglalták a dehidrogenézett szalvianolsav alakokat, a konjugált dimereket és nagyobb polimereket. Az előnyös inkubációs idő 3-24 óra volt. 48 órát meghaladó, 0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ -ban végzett inkubáció a vegyületek inaktiválódásához vezethetnek. Az aktivációs periódus a vegyületek kiindulási koncentrációjától is függnek, magasabb vegyületkoncentráció esetén az aktivációhoz hosszabb inkubációs idő szükséges. A képződést előidézhetjük a vegyületet tartalmazó oldat vegyhatásának - más alkalikus reagenssel való -, 8,0-nál magasabb pH-értékre való beállításával. A reakció leállítását egy sav - pl. 1% ecetsav - hozzáadásával történik, melynek hatására az oldat pH-értéke 7,0 vagy ennél alacsonyabb lesz. Az új vegyületek képződését befolyásoló további tényezők még a hőmérséklet és az oxigénezettség.

### **D) Gyógyászati készítmények és alkalmazásuk**

A vírusfertőzések kezelésére vagy mérséklésére egy, a találmány szerinti vegyületet adagolhatunk szájon át, lokálisan, parenterálisan, inhalációs-spray segítségével vagy rektális úton egységdózis formulációban, amely szokványos, nem-toxikus, gyógyászatilag elfogadott hordozóanyagokat, adjuvánsokat és oldószereket

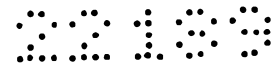


tartalmazzak. A "parenterális" általunk használt jelentése szubkután, intravénás, intramuszkuláris és intravaszkuláris injekcióra vagy infúziós technikákra vonatkozik. Az általunk ismeretett vegyületek és készítmények hatékonyak mind melegvérű állatok - pl. egér, patkány, ló, marha, kutya, macska, stb. -, mind emberek vírusfertőzéseinek kezelésére.

A központi idegrendszeri adagolás során a készítményeket a cerebrospinális folyadékba juttathatjuk. Intratekális alkalmazáshoz parenterális adagolásra alkalmas hordozóanyag - pl. vizes glukóz oldat vagy sóoldat - megfelelő. A készítményeket előállíthatjuk liposzómákban is a membrán-válaszfalakon való fokozott átjutás elősegítésére. A transzdermális alkalmazásra a készítményeket tapasz segítségével alkalmazhatjuk, erre a célra hidrofób vegyületek oldószerei - pl. DMSO vagy olajak, melyek keresztüljutnak a bőr védőrétegén - is használhatók.

A parenterális alkalmazásra a jelen találmány szerinti terápiás vegyületet tartalmazó oldat elkészíthető például szezám- vagy mogyoróolaj vagy vizes propilénglikol felhasználásával. A vizes oldatokat szükség szerint pufferolni kell (előnyös esetben a pH-értéke nagyobb, mint 8,0), és az oldószert izotóniássá kell tenni. Ilyen vizes oldatok megfelelőek intravénás injekciók céljára. Az olajos oldatok megfelelőek intrartikuláris, intramuszkuláris és szubkután injekciók céljára. Fenti oldatok steril körülmények között való elkészítése könnyen végrehajtható a szakemberek számára jól ismert standard gyógyászati módszerekkel.

A megfelelő forma az aktív hatóanyagot tartalmazó gyógyászati készítmények szájon át való alkalmazása esetén lehet például tab-



letta, pirula, szopogatótabletta, vizes vagy olajos szuszpenzió, oldható por vagy granulátum, emulzió, kemény-, vagy lágykapszula, vagy szirup, ill. elixír. A szájon át adandó készítményeket előállít-hatjuk a gyógyászati készítmény gyártója által ismert bármely mód-szerrel; ezek a készítmények tartalmazhatnak egy vagy több olyan anyagot, melyeket az édesítőszer, ízesítőszer, színezőanyagok és tartósítószer csoportjából választunk ki a gyógyászatilag fo-gyasztható készítmény létrehozására. A tabletták az aktív hatóanya-got együtt tartalmazhatják a nem-toxikus, gyógyászatilag elfogadott segédanyagokkal, melyek megfelelőek a tabletták gyártásához.

Szájon át való adagoláshoz a tabletták tartalmazhatnak különbö-ző segédanyagokat, pl. mikrokristályos cellulózt, nátrium-citrátot, kalcium-karbonátot, dikalcium-foszfátot és glicint; ezen kívül tartal-mazhatnak különböző szétesést fokozó anyagokat, pl. keményítőt (előnyös módon kukorica-, burgonya- vagy tápiókakeményítőt), alginsavat és bizonyos komplex szilikátokat valamint granulációs kötőanyagokat, mint pl. a polivinilpirrolidont, szukrózt, zselatint és gumiarábikumot. Ezeken kívül tablettázási célból nagyon hasznosak lehetnek a kenőanyagok, mint pl. a magnézium-sztearát, a nátrium-lauril-szulfát és a talkum. Hasonló típusú szilárdfázisú összetételt használhatunk zselatin kapszulába való töltéshez; előnyös anyagok ebből a szempontból a laktóz vagy tejcukrok, valamint nagymolekulatömegű polietilén-glikolok. Ha a szájon át való adago-láskor vizes szuszpenziókat vagy elixíreket szeretnénk alkalmazni, az aktív vegyületet vagy vegyület kombinációkat együtt készíthetjük különböző édesítő- és ízesítőanyagokkal, színezőanyagokkal vagy festékekkel, és szükség esetén emulzifikáló és/vagy szuszpendáló

anyagokkal is, ehhez még hozzáadva a megfelelő oldószereket, mint pl. víz, alkohol, propilénlikol, glicerin és ezek különböző keverékeit. A szájon át való formuláció lehet kemény zselatinkapszula is, melyben az aktív hatóanyagot semleges szilárd hígítóanyaggal keverjük össze, pl. kalcium-karbonáttal, kalcium-foszfáttal vagy kaolinnal; a formuláció lehet lágy zselatinkapszula is, melyben az aktív hatóanyagot vízes vagy olajos közeggel keverjük össze, pl. mogyoróolajjal, folyékony parafinnal vagy olívaolajjal.

A segédanyagok lehetnek például semleges hígítóanyagok, pl. kalcium-karbonát, nátrium-karbonát, laktóz, kalcium-foszfát, nátrium-foszfát; granuláló és szétesést fokozó anyagok, pl. kukoricakeményítő, vagy alginát; kötőanyagok, pl. keményítő, zselé vagy gumiarábikum; és kenőanyagok, pl. magnézium-sztearát, sztearinsav vagy talkum. A tabletták lehetnek bevonatlanok, vagy ismert módszerekkel bevonhatjuk őket a szétesés és a gyomor-béltraktusból való felszívódás késleltetésére, amely egy hosszabb időszak alatt elnyújtott hatást eredményez. Ilyen késleltető anyag lehet a glicerilmonosztearát vagy a gliceril-disztearát. A tablettákat bevonhatjuk a US 4 256 108, a 4 166 452 és 4 265 874 számú szabadalmi iratokban leírt módszerek szerint, amely ozmotikus típusú gyógyászati tablettát hoznak létre a szabályozott vagy elnyújtott leadás érdekében.

Vizes szuszpenzióban az aktív anyagok együtt lehetnek a vizes szuszpenzió gyártásához szükséges segédanyagokkal. Ilyen segédanyagok lehetnek a szuszpendáló anyagok, pl. nátriumkarboximetilcellulóz, metilcellulóz, hidroxipropilmetilcellulóz, nátrium-alginát, polivinilpirrolidin, tragantmézga és gumiarábikum; a

diszpergáló vagy nedvesítőanyagok lehetnek a következők: egy természetes-alapú foszfatid, pl. lecitin; vagy egy alkilén-oxidnak zsírsavakkal való kondenzációs termékei, pl. poli(oxietilén-sztearát); vagy az etilén-oxidnak hosszú szénláncú alifás alkohollal való kondenzációs termékei, pl. heptadekaetilénokitetanol; vagy az etilén-oxidnak zsírsavak részleges észtereivel és a hexittel való kondenzációs termékei, pl. a polioxietilén szorbit-monooleát; vagy az etilén-oxidnak zsírsavak részleges észtereivel és a hexit-anhidriddel való kondenzációs termékei, pl. a polioxietilén szorbitán-monooleát. Fenti vizes szuszpenziók tartalmazhatnak egy vagy több tartósítószeret, pl. az etil-, vagy n-propil-p-hidroxibenzoátot.

Egy olajos szuszpenzió formulációja során az aktív hatóanyagot szuszpendálhatjuk egy növényi olajban, pl. arachis-olajban, olíva-olajban, szezámolajban vagy kókuszolajban, ill. egy ásványi olajban, mint pl. a folyékony paraffin. Az olajos szuszpenzió tartalmazhat egy sűrítő anyagot, pl. méhviaszt, kemény paraffint vagy cetilalkoholt. Ezekhez a készítményekhez tartósítószerként adhatunk egy antioxidánst, pl. aszkorbinsavat.

Oldható porok és granulátumok alkalmasak egy vizes szuszpenzió elkészítésére azoknak vízzel való összekeverésével. Utóbbi készítményekben az aktív hatóanyag együtt lehet egy diszpergáló vagy nedvesítőanyaggal, egy szuszpendálóanyaggal és egy vagy több tartósítószerrel. A megfelelő diszpergáló vagy nedvesítő anyagok és a szuszpendáló anyagok megegyeznek a már fentiekben említettekkel.

A találmány szerinti gyógyászati készítmény lehet olaj-a-vízben típusú emulzió. Az olajos fázis lehet egy növényi olaj, pl. olíva olaj



vagy arachis-olaj, vagy egy ásványi olaj, pl. folyékony paraffin vagy ezek keverékei. A megfelelő emulzifikáló anyagok lehetnek természetes alapú gumik, pl. gumiarábikum vagy tragantmézsga; vagy lehetnek természetes alapú foszfatidek, pl. szójabab, lecitin és zsírsavak, ill. hexit-anhidridek észterei vagy részleges észterei (pl. szorbitán-monooleát), és fenti részleges észtereknek etilén-oxiddal való kondenzációs termékei (pl. polioxietilén-szorbitán-monooleát).

A találmány szerinti gyógyászati készítményt tartalmazó kenőcsöt elkészíthetjük a szakma által ismert módszerek közül például az aktív hatóanyagnak egy olyan közeggel való összekeverésével, amely glikolt, egy kisszénatomszámú alkanolt és vizet tartalmaz; ezen kívül van benne egy gélképző anyag és egy tetszés szerinti adjuváns, mint pl. a diizopropil-adipát, dietil-szevakát, etil-kaproát és etil-laurát. A megfelelő glikolok közé tartoznak a propilénglikol, a butilénglikol, a polietilénglikol és ehhez hasonlók. Gélképző anyagként általában egy szerves aminnal (pl. a diizopropil-amin és a trietil-amin) előzetesen semlegesített karboxivinil-polimert vagy egy cellulózt ( pl. a hidroxietil-cellulózt, a metilcellulózt, a karboximetil-cellulózt, a hidroxipropil-cellulózt) használhatunk.

A fentiekben leírt vegyületeket és készítményeket alkalmazhatjuk a gyógyszernek rektális kúpként való formájában is. Ezeket a készítményeket előállíthatjuk a gyógyszernek egy megfelelő nem irritáló segédnyaggal való összekeverésével, amely szilárd halmazállapotú átlagos hőfokon, pl. szobahőmérsékleten, de folyékony a rektális hőmérsékleten és így elolvad a végbélben a gyógyszer leadására. Ilyen anyagok a kakaóvaj és a polietilénglikolok.



Az aktív vegyület vagy vegyületek kombinációinak mennyisége, melyet összekeverhetünk a hordozóanyagokkal egy egyszeri dózis kialakítására, változni fog a kezelendő szervezet és az alkalmazás konkrét módja szerint. Az egységdózis formák általában 25 mg-1 g közötti aktív hatóanyagot fognak tartalmazni. Az aktív hatóanyagok napi dózisa általában 1-300 mg/tskg között lesznek a szájon át való adagolás esetén és 0,1-100 mg/tskg között az átlagos injekciós alkalmazáskor. Ezeket a mennyiségeket adhatjuk egyszeri alkalommal vagy két vagy több részre szétosztva a nap folyamán. Érthető azonban az, hogy a konkrét dózis egy adott betegre vagy egyénre vonatkozóan számos tényező függvénye lesz, ideértve az illető alkalmazott vegyület aktivitását, a beteg korát, testsúlyát, általános állapotát, nemét, étrendjét, az adagolás idejét és módját, a kiválasztás sebességét, a gyógyszerkombinációkat, a kezelt egyénben az adott vírusfertőzés idejét és annak súlyosságát.

A találmány szerinti vegyületeket önmagukban vagy gyógyászati lag elfogadott hordozóanyagokkal vagy hígítókkal együtt adagolhatjuk bármilyen hatásos - előnyben részesítette a korábban említett három út egyikét - módon. Ez az adagolás lehet egyszeri vagy többszörös dózisban. Konkrétabban a találmány szerinti új terápiás anyagokat számos különböző adagolási formában adhatjuk, vagyis különböző gyógyászati lag elfogadott semleges hordozóanyaggal kombinálhatjuk őket tabletták, kapszulák, szopogatótabletták, pirulák, kemény cukorkák, porok, spray-k, krémek, balzsamok, kúpok, zselék, gélek, paszták, borogatások, kenőcsök, vizes szuszpenziók, injekciós oldatok, elixírek, szirupok és ehhez hasonló alakjában.

Az alábbi példák csupán az igényelt találmány bizonyos megvalósítási módjait mutatják be, és ezekkel nem szándékozunk az oltalmi kört korlátozni.

### 1. példa

#### Antivirális anyagok kivonása az SM-ből és SY-ból

Az SM-ből és SY-ból a növényi kivonatokat a következő módon készítettük:

**1. lépés:** a szárított SY-t Milli-Q desztillált vízben (dH<sub>2</sub>O) (18,0 mOhm/cm) forraltuk majd 1,30 g/ml végsűrűsége töményítettük. A kivonatot dH<sub>2</sub>O-val 1:5 arányban hígítottuk, 8000 fordulat/perc-el, 90 percig, 25°C-on centrifugáltuk egy GS-3 rotorban. A peletet eldobtuk és a felülúszót félretettük. Utóbbihoz 1/10 térfogatban 1,0 N HCl-t adtunk, így a végkoncentrációja 0,1 N HCl lett. Ezt a felülúszót egy éjszakán át, 25°C-on inkubáltuk, majd az oldatot 8000 fordulat/perc-el, 90 percig, 25°C-on centrifugáltuk egy GS-3 rotorban, a peletet 95%-os alkohollal mostuk, majd átszűrtük egy 0,2 µm-es szűrőrendszeren. Ezt az utóbbi lépést addig ismételtük, amíg a mosófolyadék tisztává nem vált. A peletet ezt követően szobahőmérsékleten megszáritottuk a szűrőrendszerben, majd egy éjszakán át egy kamrában 70°C-on inkubáltuk. A port dH<sub>2</sub>O-ban szuszpendáltuk úgy, hogy a pelet-víz tömegarány 1:5 volt. Az így létrejött terméket 25000 fordulat/perc-el, 30 percig, 25°C-on centrifugáltuk egy Ti45-ös rotorban. A felülúszót eldobtuk, a peletet pedig 50%-os alkoholban szuszpendáltuk. Alternatív megvalósítás során a felülúszót is szuszpendálhatjuk 50%-os metanolban.

**2. lépés:** a szuszpendált oldatot leszűrtük az oldhatatlan anyagok eltávolítására.

**3. lépés:** a leszűrt oldatot az eredeti térfogat egyötödére (1/5) töményítettük csapadék képzése céljából, melyet ezt követően desztillált vízzel mostunk. A mosott peletet egy éjszakán át liofilizáltuk. A szárított és mosott peletet neveztük 1. frakciónak.

**4. lépés:** a 3. lépésből származó szárított port feloldottuk 50%-os metanolban, majd az oldatot centrifugáltuk az oldhatatlan anyagok eltávolítására. A felülúszó oldatot felvittük egy desztillált vízzel kiegyenlített Sephadex LH-20-as oszlopra. Az oszlopot alaposan mostuk desztillált vízzel, majd az elúcióta következő sorrendben alkalmazott oldatokkal végeztük: 15%-os metanol vízben (v/v), 30%-os metanol 1%-os vizes ecetsavval (v/v), 40%-os metanol vízben (v/v), 50%-os metanol vízben (v/v) és 100%-os metanol. Az alkalmazott oldatok sorrendje a kiinduló oldattól függ. Az 50%-os vizes metanollal eluált frakciót töményítettük és felvittük egy reverz HPLC oszlopra (Ultrasphere ODS, 4,6x250 mm, 5  $\mu$ m), melyet előzetesen kiegyenlítettünk 10%-os metanol és 0,1%-os hangyasav keverékével. Az oszlop eluálását egy 25 perces, 10% metanolt/0,1% hangyasavat és 100% metanolt/0,1% hangyasavat tartalmazó grádienssel végeztük, 1ml/min sebességgel. A vegyületeket az abszorbancia 275 nm-en való mérésével azonosítottuk.

**5. lépés:** a reverz HPLC oszlopról eluált frakciók molekulatömegének meghatározását tömegspektroszkópiás módszerrel végeztük, amely a következő vegyületeket azonosította:

|     | <u>Molekulatömeg</u> | <u>Vegyület</u>   |
|-----|----------------------|---|
| 1.  | 180                  | Koffeinsav [#1 vegyület, lásd (#1) képlet]  |
| 2.  | 198                  | D-(3,4-dihidroxifenil)-tejsav [#2 vegyület, lásd (#2) képlet]   |
| 3.  | 359                  | Rozmaringsav [#3 vegyület, lásd (#3) képlet]  |
| 4.  | 387                  | A rozmaringsav sói (Yunnaneinsav-C [#4 vegyület, lásd (#4) képlet] és Yunnneinsav-D [#5 vegyület, lásd (#5) képlet] |
| 5.  | 494                  | 2-(3,4-dihidroxifeniletetil)-koffeinsav [#6 vegyület, lásd (#6) képlet] vagy szalviano sav                          |
| 7.  | 717                  | Litospermát-B [#7 vegyület, lásd (#7) képlet]   |
| 8.  | 739                  | Magnézium-litospermát-B [#8 vegyület, lásd (#8) képlet]   |
| 9.  | 853                  | Rozmaringsav és 2-(3,4-dihidroxifeniletetil)-koffeinsav keveréke [#9 vegyület, lásd (#9) képlet]                    |
| 10. | 987                  | A (#6) képletű vegyület dimerje, molekulatömege 987 (#10), amint azt az alábbi 4. példában ismertetünk.             |

## 2. példa

### Antivírus meghatározás: a vírusgátlás hatékonysága

**In vitro HIV-1 integráz meghatározás:** a HIV-1 integráz aktivitásának *in vitro* meghatározására szolgáló módszert fejlesztettünk ki, melyet az alábbiakban ismertetünk. A meghatározásokban tisztított

rekombináns HIV-1 integrázt és olyan oligonukleotid szubsztrátokat használunk, amelyek a vírus DNS-ének LTR-végét képviselik. Az *in vitro* meghatározások során nyert adatok funkcionális jelentősége azon alapul, hogy azok az *in vivo* történő funkcionális eseményeket tükrözik. Mind a fluorometriás (Lee és mts., *Analytical Biochemistry*, 227:295-301. Oldalak, 1995), mind az izotópos módszert kifejlesztettük, melyek felülmúlják a korábban közölt *in vitro* esszéket (Lee és mts., *Biochemistry*, 34: 10205-10214. oldalak, 1995; Lee és mts., *Biochemistry*, 34: 10215-10223. oldalak, 1995). Ezen kívül módosítottuk az enzim előkészítését is, amely javította a HIV-1 integráz minta minőségét (Lee és Han, *Biochemistry*, 35:3837-3844. oldalak, 1996; Lee és mts., *Biochemistry*, 36: 173-180. oldalak, 1997). Az *in vitro* meghatározásban és a mintaelőkészítésben elvégzett módosítások annak érdekében történtek, hogy jobban tükrözzék az *in vivo* történéseket. Ezért az *in vitro* meghatározás eredményei nagyon hasznos módon előre jelzik a vírus fertőzőképességét, amikor lehetséges integráz-gátlókat keresünk.

Az 1. frakció HIV-1 integráz-gátló aktivitásának meghatározása a következő módon történt. Az 1. frakciót elsőként feloldottuk a megfelelő térfogatú 0,1%-os  $\text{NH}_4\text{OH}$ -ban (t/v), a 15 mg/ml-es végkoncentráció eléréséhez. A mintákat ezt követően 10000 fordulat/perc-el, 30 percig centrifugáltuk. Ha pelet alakult ki, akkor a felülúszót eldobtuk; a peletet beszárítottuk majd újra feloldottuk 0,1%-os  $\text{NH}_4\text{OH}$ -ban. Az így létrejött oldat a kivont frakciók törzsoldata, melyből a következő hígításokat végeztük: 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:700, 1:800, 1:900, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000 és 1:10000. Valamennyi hígításból 1  $\mu\text{l}$  adtunk a reakcióelegyekhez,

amelyek 75, 15, 7,5, 3,75, 2,5, 1,875, 1,5, 1,25, 1,07, 0,9375, 0,833 0,75, 0,375, 0,25, 0,1875, 0,15 és 0,075  $\mu\text{g/ml}$  végkoncentrációknak feleltek meg. A mérés a korábbiaknak megfelelően történt (Lee és mts., *Biochemistry*, 34: 10205-10214. oldalak, 1995; Lee és mts., *Biochemistry*, 34: 10215-10223. oldalak, 1995; Lee és Han, 1996).

Az egyes frakciók  $\text{IC}_{50}$  és  $\text{IC}_{90}$  értékeinek meghatározására a gélt egy PHOSPHORIMAGER<sup>TM</sup> ernyőjén exponáltuk és a százalékos hasítási értéket a Molecular Dynamics PHOSPHORIMAGER<sup>TM</sup>-el végeztük. A gátlás százalékát úgy számoltuk ki, hogy a pozitív kontroll százalékos hasítási értékéből kivontuk az egyes frakciók százalékos hasítási értékét, és ezt elosztottuk a pozitív kontroll százalékos hasítási értékével. Az eredmények szerint az 1. frakciónak a tenyésztő médiumban az  $\text{IC}_{50}$  értéke 0,2-1,2  $\mu\text{g/ml}$ , az  $\text{IC}_{90}$  pedig 2,5-3,5  $\mu\text{g/ml}$ . Ennek megfelelően az élő emlősben ennek a koncentrációnak akár a százszorosa is tolerálható és előnyös.

### 3. példa

#### SM kivonatok *in vitro* vizsgálata

A macska immunhiány vírus(FIV) modell a HIV fertőzések ellen használatos gyógyszerek vizsgálatának elfogadott állatkísérletes modellje. A FIV macskákból izolált T-sejt trófikus lentivírus. A FIV hasonlít a HIV-re mind biológiailag, mind biokémiaailag, beleértve a FIV és HIV integrázok közötti nagyfokú homológiát. A FIV-el megfertőzött macskákból a macska szerzett immunhiány szindróma (FAIDS) jön létre, amely hasonló a teljesen kifejlődött emberi AIDS fertőzéshez.

***In vitro* FIV modell sejtenyészetben:** a Crandell-Reese macskavese sejtvonal (CrFK) érzékeny a FIV fertőzésre és elősegíti a vírus szaporodását. A CrFK sejtek egyaránt alkalmasak a vírus tenyésztésére és a FIV fertőzés vizsgálatára. Bár a FIV nem károsítja a FIV-fertőzött CrFK sejteket, megfelelő diagnosztikus vizsgálatok rendelkezésre állnak a FIV fertőzés sejtenyészetben való kimutatására. A vizsgálatok igazolták az SY hatékonyságát.

**Az ED<sub>50</sub> meghatározása:** az 1. frakciót vizsgáltuk a CrFK sejtek FIV fertőzés elleni védő hatékonyságának tekintetében. A CrFK sejteket triplikátumban a tenyésztőedényekbe helyeztük,  $1 \times 10^5$  sejt/T25-edény koncentrációban. 24 órás inkubációt követően – amely a sejtek letapadását és növekedését szolgálta – a vegyületek oldatait hozzáadtuk a sejtenyészetekhez további 24 óráig. Az oldatok készítésekor a találmány szerinti aktív hatóanyagokat feloldottuk 8,0-as pH-értékű foszfátpufferban, 100 mg/ml koncentrációban, melyet ezt követően centrifugáltuk 25000 fordulat/perc-en, 30 percig, 25°C-on, egy Ti45-ös rotorban. A felülúszót eltávolítottuk, majd három 1ml-es mintát vákum alatt beszárítottunk centrifugálás közben az oldat koncentrációjának meghatározására. Az aktív hatóanyagot tovább hígítottuk 2 mg/ml-re, átszűrtük egy 0,2 µm-os cellulóz-acetát szűrőn, majd a koncentrációját meghatároztuk a beszárított anyag tömegének a kitarázott kontrolhoz képest való meghatározásával.

Az eredmények azt mutatták, hogy az 1. frakciónak a CrFK sejtek FIV fertőzésének kivédésére vonatkozó ED<sub>50</sub> értéke 0,1-1,0 µg/ml, az ED<sub>90</sub> pedig 0,2-2,5 µg/ml között van. Az eredmények alapján a találmány szerinti készítményeket alkalmazhatjuk gyógyászatilag elfogadott hordozóanyagokkal, és olyan dózisban kell adagolni, hogy a

koncentrációjuk a vérben 10-1000 nM közé essen. Azonban bizonyos esetekben olyan dózisokat kell használnunk, amely a vérben 10000 nM-os koncentrációt hoz létre. Az aktívabb hatóanyagok már 1 nM-os vérkoncentrációban is hatékonyak lehetnek.

#### 4. példa

##### Szalvianolsav konjugáció

Lúgos pH-n a szalvianolsav (1. vegyület) további három dehidrogenezett formája jöhet létre (2-4 vegyület). A szalvianolsav és származékainak (a szalvianolsav dehidrogenezett alakjai) konjugációja dimer formákká számos vegyületet eredményez, melynek a szerkezeteit bemutatjuk. A származékok a szalvianolsav homo- és/vagy heterodimerjeinek a dehidrogenezett formákkal való konjugációjának az eredménye. Ezek a vegyületek anti-HIV-1 integráz aktivitással bírnak már kisebb, mint 1  $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban. A szalvianolsav (1. vegyület) alapszerkezete a (PLD<sub>1</sub>) képlettel írható le.

Az A, B, C, és D az 1. vegyület 24-es, 27-es, 35-ös és 38-as szénatomján levő hidrogént jelölik. Ezek a hidrogének a konjugáció lehetséges helyei. Ezért a szalvianolsavnak (1. vegyület) saját magával képzett konjugációja - egy homodimer - során a következő kombinációk képződhetnek (5-13. vegyületek): 5. vegyületben A az A-val konjugálódik (1. ábra); a 6. vegyületben az A a B-vel (2. ábra); a 7. vegyületben az A a C-vel (3. ábra); a 8. vegyületben az A a D-vel (4. ábra); 9. vegyületben a B a B-vel (5. ábra); a 10. vegyületben a B a C-vel (6. ábra); a 11. vegyületben a C a C-vel (7. ábra); a 12. vegyületben a C a D-vel (8. ábra); a 13. vegyületben a D a D-vel (9.

ábra); a 24. vegyületben az 1. vegyület B és D változata konjugálódik (13. ábra).

A szalvianolsav három dehidrogenezett formájának (2-4. vegyületek) keletkezése során a dehidrogénezés a 24-es és 38-as, a 24-es és 35-ös, ill. a 27-es és 38-as szénatomokon jön létre. Ezek a formák a következő alapszerkezettel bírnak:

2. vegyület, 24-38 dehidrogénezés, lásd (PLD<sub>2</sub>) képletet, illetve a 10. ábrát.

3. vegyület, 24-35 dehidrogénezés, lásd (PLD<sub>3</sub>) képletet, illetve a 11. ábrát: E a konjugáció helyét jelöli.

4. vegyület, 27-38 dehidrogénezés, lásd (PLD<sub>4</sub>) képletet, illetve a 12. ábrát. F a konjugáció helyét jelöli.

A szalvianolsav dehidrogenezett formái (2-4. vegyületek) homodimereket képezhetnek. Ez azt jelenti, hogy a 3. és 4. vegyület konjugálódhatnak önmagukkal az E- és az F-helyeken, a 14. és a 15. vegyületek létrehozására.

Ezek a dehidrogenezett formák szintén képezhetnek heterodimereket a szalvianolsavval. A lehetséges heterodimerek a következők:

az 1. vegyület A helye a 3. vegyület E helyével konjugálódhat a 16. vegyület létrehozására;

az 1. vegyület B helye a 3. vegyület E helyével konjugálódhat a 17. vegyület létrehozására;

az 1. vegyület C helye a 3. vegyület E helyével konjugálódhat a 18. vegyület létrehozására;

az 1. vegyület D helye a 3. vegyület E helyével konjugálódhat a 19. vegyület létrehozására;

az 4. vegyület F helye a 1. vegyület A helyével konjugálódhat a 20. vegyület létrehozására;

az 4. vegyület F helye a 1. vegyület B helyével konjugálódhat a 21. vegyület létrehozására;

az 4. vegyület F helye a 1. vegyület C helyével konjugálódhat a 22. vegyület létrehozására;

az 4. vegyület F helye a 1. vegyület D helyével konjugálódhat a 23. vegyület létrehozására.

Ezeken a dimereken kívül, lehetséges ezekhez hasonló trimereket és nagyobb polimereket is kialakítani. Ezen vegyületek szerkezeti variációi ismertek lesznek a szakemberek számára.

Az is látható, hogy ezeket a vegyületeket módosíthatjuk úgy, hogy acetilcsoportokat, észtereket, anhidrideket vagy a vegyület gyógyászatiilag elfogadott sóit alakítjuk ki.

### 5. példa

#### Az anti-integráz aktivitás időfüggő aktiválása konjugáció által

A 4. példa 1. vegyületének tisztítását és azonosítását mind tömegspektrométerrel, mind NMR-el elvégeztük. Az 1. vegyületet ezt követően 0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ -val inkubáltuk különböző ideig (5 perc, 30 perc, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, és 24 h), 5 mg/ml koncentrációban. A reakciót 1% ecetsavval állítottuk le, és meghatároztuk az anti-HIV-1 integráz aktivitást. Az eredmények azt mutatták, hogy a frakciókban egy időfüggő aktiválódás van a 0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ -val történő inkubáció miatt, amely az 1. vegyület különböző konjugációinak az eredménye. Az eredményeket a 3. táblázat mutatja.

3. táblázat

| Idő      | IC <sub>50</sub> (µg/ml) |
|----------|--------------------------|
| pH = 6,0 |                          |
| pH = 6,0 | 3,5                      |
| 5 perc   | 1,8                      |
| 30 perc  | 1,7                      |
| 1 óra    | 1,5                      |
| 2 óra    | 1,5                      |
| 3 óra    | 1,05                     |
| 4 óra    | 1,0                      |
| 5 óra    | 0,9                      |
| 24 óra   | 0,5                      |

Tisztított, 492 molekulatömegű vegyületeket (pl. 2-4. vegyületek) 0,1% NH<sub>4</sub>OH-val inkubáltuk különböző ideig (5 perc, 30 perc, 1 h, 1,5 h, 2,0 h, és 3 h), 5 mg/ml koncentrációban. A reakciót 1% ecetsavval állítottuk le, és meghatároztuk az anti-HIV-1 integráz aktivitást. Az eredmények azt mutatták, hogy a 2-4. vegyületeknél egy időfüggő aktiválódás van a 0,1% NH<sub>4</sub>OH-val történő inkubáció miatt, amely azonban nem olyan nagy, mint az 1. vegyület konjugációi esetében. Az eredményeket a 4. táblázat mutatja.

4. táblázat

| Minta  | IC <sub>50</sub> |
|--------|------------------|
| 5 perc | > 7,5            |

|         |     |
|---------|-----|
| 30 perc | 5,5 |
| 1 óra   | 5,2 |
| 1,5 óra | 4,2 |
| 2 óra   | 4,1 |
| 3 óra   | 2,1 |

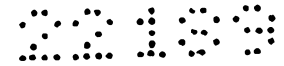
### 6. példa

#### Az aktivált 1. vegyület anti-HIV-1 integráz aktivitása

A 4. példa 1. vegyületéből 0,8 g-ot inkubáltunk 80 ml 0,1% NH<sub>4</sub>OH-ban - 10 mg/ml végkoncentrációban - 8 óráig. Ezt az aktivált frakciót felvittük egy Sephadex® LH20-as oszlopra és az eluálást vizes oldatban növekvő koncentrációjú metanollal végeztük. Az eluált frakciókat liofilizáltuk és meghatároztuk az anti-HIV-1 inregráz aktivitást. Az eredményeket az 5. táblázat mutatja.

#### 5. táblázat

| Frakció      | IC <sub>50</sub> (µg/ml) |
|--------------|--------------------------|
| eredeti      | 1,1                      |
| 10 % metanol | 1,1                      |
| 20 % metanol | 0,69                     |
| 30 % metanol | 0,81                     |
| 40 % metanol | 0,92                     |
| 50 % metanol | 0,4                      |
| 60 % metanol | 0,92                     |
| 70 % metanol | 3,2                      |
| 80 % metanol | >7,5                     |

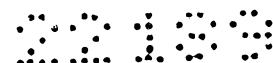


Az 50%-os mintát - amely a legjobb aktivitású volt - megvizsgáltuk tömegspektrométerrel, amely két fő csúcsot jelzett a 492-es és 986-os molekulatömegnél. A csúcsok a szalvianolsav monomerjének, ill. dimerjének felelnek meg, amely azt mutatja, hogy ezek a vegyületek okozzák az antivirális hatást. Ezért az eredmények azt mutatják, hogy az integráz gátlásért felelős aktív antivirális hatóanyag a szalvianolsav és/vagy annak dimerje.

A frakciók HIV-1 fertőzés elleni hatékonyságát CEM<sup>TART</sup> sejteken vizsgáltuk. Ezeket a sejteket CEM-ből hozzuk létre a 8. példában leírtaknak megfelelően. A HIV p24 antigén-befogásos meghatározást a 8. példában leírtaknak megfelelően végeztük. Az eredményeket a 6. táblázatban ismertetjük.

6. táblázat

| Minta | IC <sub>50</sub> (µg/ml) |
|-------|--------------------------|
| 10 %  | 41                       |
| 20 %  | 2,2                      |
| 30 %  | 12                       |
| 40 %  | 7                        |
| 50 %  | 3,8                      |
| 60 %  | 40                       |
| 70 %  | 40                       |
| 80 %  | nincs meghatározva       |



### 7. példa

#### Anti-HIV-1 integráz aktivitás

Az 1.példa 1. frakcióját feloldottuk 40%-os (vizes) metanolban majd 30 percig, 8000 fordulat/perc-el egy GSA rotorban centrifugáltuk. A felülúszót felvittük egy SEPHADEX® LH20-as oszlopra, melyet előzetesen 40%-os (vizes) metanollal kiegyenlítettünk. Az oszlopot 40%-os (vizes) metanollal mostuk majd 50, 60, 70, 80 és 90%-os metanollal (vizes) eluáltuk. A mintákat liofilizáltuk és feloldottuk a megfelelő mennyiségű metanolban úgy, hogy a törzsoldat végkoncentrációja 5 mg/ml legyen. Ezekben a frakciókban határoztuk meg az anti-HIV-1 integráz aktivitást. A meghatározáskor a koncentrációk 5, 2,5, 2, 1,5, 1,25, 1, 0,8, 0,6, 0,4 és 0,2 µg/ml voltak. A gátlás százalékát úgy számoltuk ki, hogy a pozitív kontroll százalékos hasítási értékéből kivontuk az egyes frakciók százalékos hasítási értékét, és ezt elosztottuk a pozitív kontroll százalékos hasítási értékével.

### 7. táblázat

Az *in vitro* HIV-1 integráz aktivitás meghatározás eredményei

| Frakció # | IC <sub>50</sub> (µg/ml) |
|-----------|--------------------------|
| 40        | 0,84                     |
| 50        | 0,70                     |
| 60        | 0,68                     |
| 70        | 0,60                     |
| 80        | 0,57                     |
| 90        | 0,50                     |

A SEPHADEX®LH20-as oszlopról lejöő 60-80% közötti frakciókat egyesítettük és feloldottuk 40%-os (vizes) metanolban, majd a mintákat 30 percig, 8000 fordulat/perc-el egy GSA rotorban centrifugáltuk. A felülúszót felvittük egy MCI GEL CHP20P (75-150  $\mu$ ) oszlopra, melyet előzetesen 40%-os (vizes) metanollal kiegyenlítettünk. Az oszlopot 40%-os (vizes) metanollal mostuk, majd az eluálást 50, 60, és 70%-os (vizes) metanollal végeztük. A mintát liofilizáltuk és a meghatározást a korábbiakban leírt különböző körülmények között végeztük el.

8. táblázat

Az *in vitro* HIV-1 integráz aktivitás meghatározás eredményei

| Minta # | IC <sub>50</sub> MeOH-ban<br>( $\mu$ g/ml) | IC <sub>50</sub> pH=6,0-nál<br>( $\mu$ g/ml) | IC <sub>50</sub> 0,1 % NH <sub>4</sub> OH<br>oldatban ( $\mu$ g/ml) |
|---------|--|--|---|
| MCI 40  | 0,32                                       | 0,70   | 0,44  |
| MCI 50  | 0,34                                       | 0,80   | 0,58  |
| MCI 60  | 0,42                                       | 1,00   | 0,62  |

Az MCI GEL CHP20P (75-150  $\mu$ m) oszlop mintáit tömegspektroszkópiás módszerrel vizsgáltuk (negatív módban). Az eredmények azt mutatják, hogy az MCI 40 egy fő csúccsal bír a 986-os, és egy kisebb csúccsal pedig a 494-es molekulatömegnél. Az MCI 50-nek két fő csúcsa van 492-nél és 986-nál. Az MCI 60 két fő csúcsa 984-nél és 986-nál vannak. A meghatározás szerint a 494-es csúcs a szalvianolsavnak felel meg a tömegspektroszkóp és az NMR szerint. A 492-es csúcs a szalvianolsav dehidrogenezett formája; a 986-os csúcs a szalvianolsav dimerje. A 984-es csúcs pedig a 492 és a 494

kevert dimerje. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az 1. frakció aktív hatóanyaga egy olyan vegyület, melynek a molekulatömege 984 és/vagy 986. A kísérleti eredmények azt sugallják, hogy a 984 és 986 molekulatömegű dimerek az 1. vegyületből keletkeznek.

### 8. példa

#### Egy aktív anyag anti-HIV-1 aktivitásának meghatározása

Az MCI GEL CHP20P (75-150  $\mu\text{m}$ ) oszlop frakcióinak HIV-1 fertőzés elleni hatékonyságát a CEM<sup>TART</sup> sejteken határoztuk meg. Ezeket a sejteket a CEM sejtekből alakítjuk ki, melyek a HIV-1 *tat* és *rev* géneket konstitutívan expresszálják. A CEM<sup>TART</sup> sejtek a HIV fertőzés megállapításának egy biztonságos rendszere, mivel úgy lettek kialakítva, hogy a HIV egy replikációra nem képes formáját, a HIV <sup>$\Delta\text{tat}/\text{rev}$</sup> -et képesek fenntartani. A HIV p24 antigén-befogásos meghatározást használtuk fel a vegyületek HIV-1 fertőzést gátló hatékonyságának jellemzésére. Ebben a vizsgálatban a 96-lyukú lemezeket bevonjuk a p24 magfehérje elleni monoklonális antitesttel, melyben a sejttenyésztő médiumot vagy szérumot inkubálunk 2 órán át. A sejtekről a felülúszót eltávolítottuk legalább egy héttel a HIV <sup>$\Delta\text{tat}/\text{rev}$</sup> -vel való fertőzés után. A lyukakat mostuk mielőtt hozzáadtuk a biotinnal jelzett, HIV-1 p24 fehérje ellenes poliklonális antitestet. Ezt követően szubsztrátot adtuk hozzá a jel felerősítésére, és a p24 expresszió mértékét közvetlenül határoztuk meg ismert standardhoz viszonyítva.

Az MCI 40-et, 50-et és 60-at metanolban feloldottuk és a vegyületek HIV-1 fertőzést gátló képességét a következő koncentrációkban határoztuk meg: 100, 20, 10, 5, és 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Egy 24-lyukú sejte-

nyésztő edénybe 2 ml,  $3,33 \times 10^4$  CEM<sup>TART</sup> sejtet és a vegyület vizsgálandó koncentrációit adtuk hozzá; ezután pedig  $5000 \text{ TCID}_{50}/10^6$  sejt HIV-1 oltóanyagot adtunk. A tenyésztőmédiomot hetente kétszer cseréltük úgy, hogy 0,8 ml sejtszuszpenziót 2 ml friss médiumban felfuszpendáltunk. A p24 jelenlétét a sejtmentes felülúszóban vizsgáltuk. Az anti-HIV-1 hatékonyságot úgy határoztuk meg, hogy a p24 antigén képződését összehasonlítottuk a vizsgált anyag jelenlétében, ill. annak hiányában 7 és 10 nap múlva. Az eredményeket a 9. és a 10. táblázat mutatja:

9. táblázat: 7. nap

| Minta  | Koncentráció ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | Gátlás % |
|--------|--|----------|
| MCI 40 | 100                                      | 100      |
|        | 20                                       | 100      |
|        | 10                                       | 100      |
|        | 1  | 0        |
| MCI 50 | 100                                      | 100      |
|        | 20                                       | 100      |
|        | 10                                       | 100      |
|        | 1  | 0        |
| MCI 60 | 100                                      | 100      |
|        | 20                                       | 100      |
|        | 10                                       | 100      |
|        | 1  | 0        |

10. táblázat: 10. nap

| Minta  | Koncentráció (µg/ml) | Gátlás % |
|--------|----------------------|----------|
| MCI 40 | 100                  | 100      |
|        | 20                   | 100      |
|        | 10                   | 100      |
|        | 1                    | 0        |
| MCI 50 | 100                  | 100      |
|        | 20                   | 100      |
|        | 10                   | 100      |
|        | 1                    | 0        |
| MCI 60 | 100                  | 100      |
|        | 20                   | 100      |
|        | 10                   | 100      |
|        | 1                    | 0        |

Valamennyi fentiekben tárgyalt hivatkozást a jelen leírás részének tekintjük. Ugyanígy hivatkozunk az alap USA-beli szabadalmi bejelentésre is, melynek száma: 09/104 363 (1998, június 25-én került benyújtásra).



## Szabadalmi igénypontok

1. Módszer egy vírusfertőzés kezelésére vagy megelőzésére olyan készítmény alkalmazásával, amelyben a vírust hatékonyan gátolni képes mennyiségben legalább egy olyan aktív hatóanyag van, amely legalább egy olyan csoportot tartalmaz, amely egy (1) általános képletű  $\beta$ -(3,4-dihidroxifenil)-tejsavból és/vagy egy (2) általános képletű koffeinsavból származik, ahol a képletekben

$R^1$  jelentése -OH, -O- vagy egy kötés;

$R^2$  jelentése -H vagy egy kötés;

$R^3$  jelentése -OH vagy -O-;

$R^4$  jelentése egy kötés vagy -C(O)- $R^5$  csoport, ahol  $R^5$  jelentése -OH vagy egy kötés;

$R^6$  jelentése -H vagy egy kötés; és

$R^7$  jelentése -H vagy egy kötés,

továbbá az aktív hatóanyag molekulatömege nagyobb, mint 190 dalton.

2. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben az aktív hatóanyag legalább egy (1) általános képletű  $\beta$ -(3,4-dihidroxifenil)-tejsavból származó csoportot és legalább egy (2) általános képletű koffeinsavból származó csoportot tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben az aktív hatóanyag az említett csoportok dimer, trimer, tetramer nagyobb tagszámú polimerje.

4. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben az aktív hatóanyagot a következők közül választjuk: D-(2,3-dihidroxifenil)-tejsav, rozmaringsav, 2-(3,4-dihidroxifeniletetil)-koffeinsav, litospermát-B,

magnézium-litospermát-B, 2-(3,4-dihidroxifeniletlen)-koffeinsav dimerjei és a (#9) képletű vegyület.

5. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben a vírusfertőzést hepatitiszvírus, ortomixovírus, papillómavírus, paramixovírus, pikornavírus, poliomavírus vagy retrovírus okozza.

6. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben a retrovírus a HIV vagy a FIV.

7. Az 5. igénypont szerinti módszer, melyben a vírusfertőzést egy olyan vírus okozza, amely integrázt vagy egy integráz aktivitással bíró fehérjét termel.

8. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben a készítményt orrban, szájon át, bőrön keresztül, parenterálisan, intratekálisan vagy intravénásan alkalmazzuk.

9. Módszer egy egyén vírusfertőzésének kezelésére vagy megelőzésére olyan készítménnyel, amelyben a vírust hatékonyan gátolni képes mennyiségben két vagy több aktív hatóanyag van, ahol legalább két hatóanyag legalább egy olyan csoportot tartalmaz, amely egy (1) általános képletű  $\beta$ -(3,4-dihidroxifenil)-tejsavból és/vagy egy (2) általános képletű koffeinsavból származik, ahol a képletekben

$R^1$  jelentése -OH, -O- vagy egy kötés;

$R^2$  jelentése -H vagy egy kötés;

$R^3$  jelentése -OH vagy -O-;

$R^4$  jelentése egy kötés vagy -C(O)- $R^5$  csoport, ahol  $R^5$  jelentése

-OH vagy egy kötés;

$R^6$  jelentése -H vagy egy kötés; és

$R^7$  jelentése -H vagy egy kötés,

továbbá az aktív hatóanyag molekulatömege nagyobb, mint 190 dalton.

10. A 9. igénypont szerinti módszer, melyben az aktív hatóanyag az említett csoportok dimer, trimer, tetramer nagyobb tagszámú polimerje.

11. A 9. igénypont szerinti módszer, melyben az aktív hatóanyagot a következők közül választjuk: D-(2,3-dihidroxifenil)-tejsav, rozmaringsav, 2-(3,4-dihidroxifeniletetil)-koffeinsav, litospermát-B, magnézium-litospermát-B, 2-(3,4-dihidroxifeniletetil)-koffeinsav dimerjei és a (#9) képletű vegyület.

12. A 9. igénypont szerinti módszer, melyben a vírusfertőzést hepatitiszvírus, ortomixovírus, papillómavírus, paramixovírus, pikornavírus, poliomavírus vagy retrovírus okozza.

13. A 12. igénypont szerinti módszer, melyben a retrovírus a HIV vagy a FIV.

14. A 12. igénypont szerinti módszer, melyben a vírusfertőzést olyan vírus okozza, amely integrázt vagy egy integráz aktivitással bíró fehérjét termel.

15. A 9. igénypont szerinti módszer, melyben a készítményt orrban, szájon át, bőrön keresztül, parenterálisan, intratekálisan vagy intravénásan alkalmazzuk.

16. Egy antivirális készítmény, amely két vagy több aktív hatóanyagot tartalmaz, ahol a hatóanyagok legalább egy olyan csoportot tartalmaznak, amely egy (1) általános képletű  $\beta$ -(3,4-dihidroxifenil)-tejsavból és/vagy egy (2) általános képletű koffeinsavból származik, ahol a képletekben

$R^1$  jelentése -OH, -O- vagy egy kötés;

$R^2$  jelentése -H vagy egy kötés;  
 $R^3$  jelentése -OH vagy -O-;  
 $R^4$  jelentése egy kötés vagy -C(O)- $R^5$  csoport, ahol  $R^5$  jelentése -OH vagy egy kötés;  
 $R^6$  jelentése -H vagy egy kötés; és  
 $R^7$  jelentése -H vagy egy kötés,  
 továbbá az aktív hatóanyag molekulatömege nagyobb, mint 190 dalton.

17. Eljárás antivirális hatóanyagok azonosítására a *Salvia* nemzetséghez tartozó növényből, azzal jellemezve, hogy

a) a növényből egy aktív hatóanyagot vonunk ki, amely legalább egy olyan csoportot tartalmaz, amely egy (1) általános képletű  $\beta$ -(3,4-dihidroxifenil)-tejsavból és/vagy egy (2) általános képletű koffeinsavból származik, ahol a képletekben

$R^1$  jelentése -OH, -O- vagy egy kötés;  
 $R^2$  jelentése -H vagy egy kötés;  
 $R^3$  jelentése -OH vagy -O-;  
 $R^4$  jelentése egy kötés vagy -C(O)- $R^5$  csoport, ahol  $R^5$  jelentése -OH vagy egy kötés;

$R^6$  jelentése -H vagy egy kötés; és

$R^7$  jelentése -H vagy egy kötés,

b) a fenti első aktív hatóanyagot kombináljuk egy második aktív hatóanyaggal, amely egy olyan csoportot vagy annak konjugátumát tartalmazza, ami az első aktív hatóanyagtól eltérő,

c) az antivirális aktivitást meghatározzuk a fenti első és második hatóanyagot tartalmazó kombinációs termékben.

18. Egy konjugációs termék, amely a szalvianolsav és/vagy a szalvianolsav dehidrogenezett formáiból származó monomer egységek homo- vagy heteropolimerje, ahol a konjugációs termék molekulatömege kb. 492 vagy nagyobb, továbbá a fentiek acetyl-, észter- vagy anhidrid-származékai vagy gyógyászatilag elfogadott sói.

19. A 18. igénypont szerinti konjugációs termék, melynek a molekulatömege kb. 492 és kb. 986 között van.

20. A 19. igénypont szerinti konjugációs termék, melynek a molekulatömege kb. 492.

21. A 19. igénypont szerinti konjugációs termék, melynek a molekulatömege kb. 984.

22. A 19. igénypont szerinti konjugációs termék, melynek a molekulatömege kb. 986.

23. A 19. igénypont szerinti konjugációs termék, amely az (I) általános képletű szalvianolsav és/vagy a (II) vagy (III) általános képletű dehidrogenezett szalvianolsav monomerjeinek homo- vagy heteropolimerje, ahol a képletekben  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , és  $R^6$  jelentése hidrogénatom vagy kötés, és a fenti homo- vagy heteropolimerek monomer egységei az  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  és  $R^6$  csoportokon keresztül kapcsolódnak egymáshoz.

24. A 23. igénypont szerinti konjugációs termék, amely egy homodimer.

25. A 24. igénypont szerinti konjugációs termék, melyben a monomer egységeket  $R^1-R^1$ ,  $R^2-R^2$ ,  $R^3-R^3$ ,  $R^4-R^4$ ,  $R^5-R^5$  vagy  $R^6-R^6$  kötések kötik egymáshoz.

26. A 24. igénypont szerinti konjugációs termék, melyben a monomer egységeket  $R^1-R^2$ ,  $R^1-R^3$ ,  $R^1-R^4$ ,  $R^2-R^3$ ,  $R^2-R^4$  vagy  $R^3-R^4$  kötések kötik egymáshoz.

27. A 23. igénypont szerinti konjugációs termék, amely egy heterodimer.

28. A 27. igénypont szerinti konjugációs termék, melyben a monomer egységeket  $R^1-R^5$ ,  $R^2-R^5$ ,  $R^3-R^5$  vagy  $R^4-R^5$  kötések kötik egymáshoz.

29. A 27. igénypont szerinti konjugációs termék, melyben a monomer egységeket  $R^1-R^6$ ,  $R^2-R^6$ ,  $R^3-R^6$ ,  $R^4-R^6$  vagy  $R^5-R^6$  kötések kötik egymáshoz.

30. A 18. igénypont szerinti konjugációs termék, amely egy homotrimer.

31. A 18. igénypont szerinti konjugációs termék, amely egy heterotrimer.

32. A 18. igénypont szerinti konjugációs termék, amely egy 4 vagy több monomer egységből álló homopolimer.

33. A 18. igénypont szerinti konjugációs termék, amely egy 4 vagy több monomer egységből álló heteropolimer.

34. Módszer egy vírusfertőzés kezelésére vagy megelőzésére olyan készítmény alkalmazásával, amely a vírust hatékonyan gátolni képes mennyiségben a 18. igénypont szerinti konjugációs terméket tartalmazza.

35. A 34. igénypont szerinti módszer, melyben a konjugációs termék egy homodimer, heterodimer, homotrimer vagy heterotrimer.

36. A 34. igénypont szerinti módszer, melyben a vírusfertőzést hepatitiszvírus, ortomixovírus, papillómavírus, paramixovírus, pikornavírus, poliomavírus vagy retrovírus okozza.

37. A 36. igénypont szerinti módszer, melyben a retrovírus a HIV vagy a FIV.

38. A 36. igénypont szerinti módszer, melyben a vírusfertőzést olyan vírus okozza, amely integrázt vagy egy integráz aktivitással bíró fehérjét termel.

39. A 34. igénypont szerinti módszer, melyben a konjugációs terméket orrban, szájon át, bőrön keresztül, parenterálisan, intratekálisan vagy intravénásan alkalmazzuk.

40. Eljárás egy antivirális készítmény előállítására, azzal jellemezve, hogy a szalvianolsavat lúgos pH mellett inkubáljuk úgy, hogy a szalvianolsavnál nagyobb antivirális aktivitással bíró homo- vagy heteropolimerek keletkezzenek.

41. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan homo- vagy heteropolimereket állítunk elő, melyek molekulatömege kb. 492 vagy nagyobb.

42. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan homo- vagy heteropolimereket állítunk elő, melyek molekulatömege kb. 492 és kb. 986 közötti.

43. A 42. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan homo- vagy heteropolimereket állítunk elő, melyek molekulatömege kb. 492.

44. A 42. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan homo- vagy heteropolimereket állítunk elő, melyek molekulatömege kb. 984.

45. A 42. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan homo- vagy heteropolimereket állítunk elő, melyek molekulatömege kb. 986.

46. A 42. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan homo- vagy heteropolimereket állítunk elő, melyek az (I) általános képletű szalvianolsav és/vagy a (II) vagy (III) általános képletű dehidrogenezett szalvianolsav monomerjeit tartalmazzák - a képletekben  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , és  $R^6$  jelentése hidrogénatom vagy egy kötés, és a fenti homo- vagy heteropolimerek monomer egységei az  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  és  $R^6$  csoportokon keresztül kapcsolódnak egymáshoz.

47. A 46. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy homodimert állítunk elő.

48. A 47. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a monomereket  $R^1-R^1$ ,  $R^2-R^2$ ,  $R^3-R^3$ ,  $R^4-R^4$ ,  $R^5-R^5$  vagy  $R^6-R^6$  kötésekkel kapcsoljuk össze.

49. A 47. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a monomereket  $R^1-R^2$ ,  $R^1-R^3$ ,  $R^1-R^4$ ,  $R^2-R^3$ ,  $R^2-R^4$  vagy  $R^3-R^4$  kötésekkel kapcsoljuk össze.

50. A 46. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy heterodimert állítunk elő.

51. Az 50. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a monomereket  $R^1-R^5$ ,  $R^2-R^5$ ,  $R^3-R^5$  vagy  $R^4-R^5$  kötésekkel kapcsoljuk össze.

52. Az 50. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a monomereket  $R^1-R^6$ ,  $R^2-R^6$ ,  $R^3-R^6$ ,  $R^4-R^6$  vagy az  $R^5-R^6$  kötésekkel kapcsoljuk össze.


53. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy homotrimert állítunk elő.

54. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy heterotrimert állítunk elő.

55. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy 4 vagy több monomer egységből álló homopolimert állítunk elő.

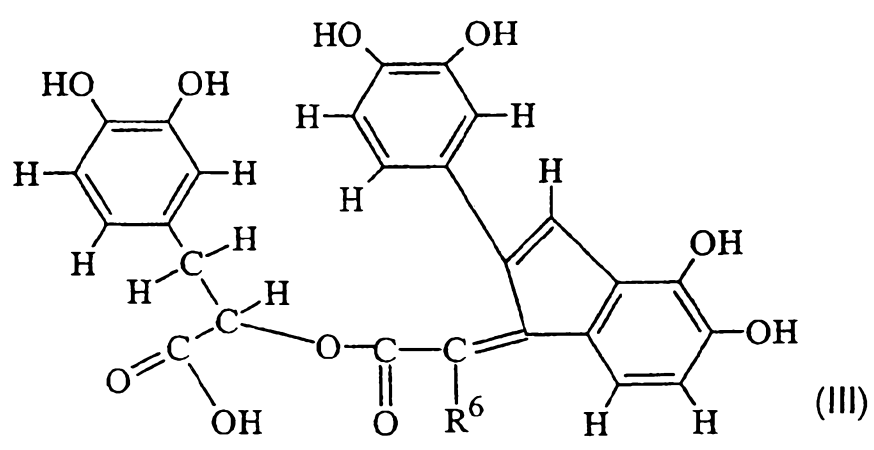
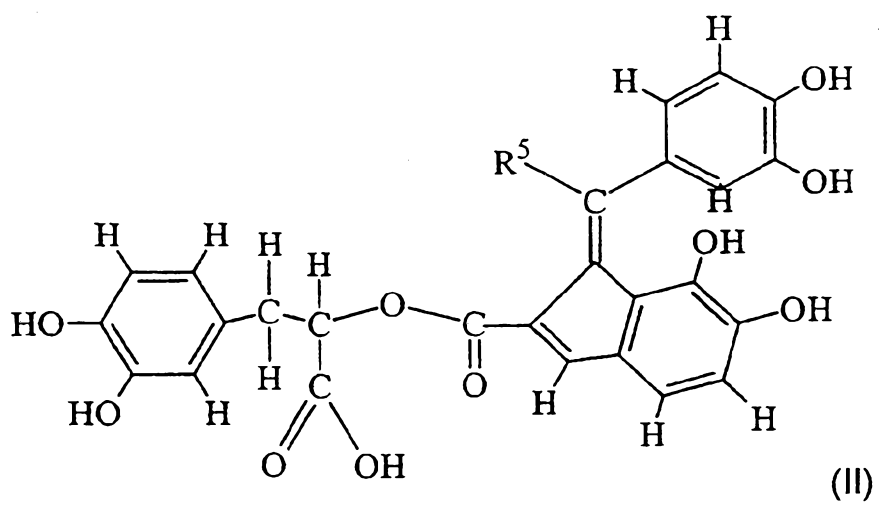
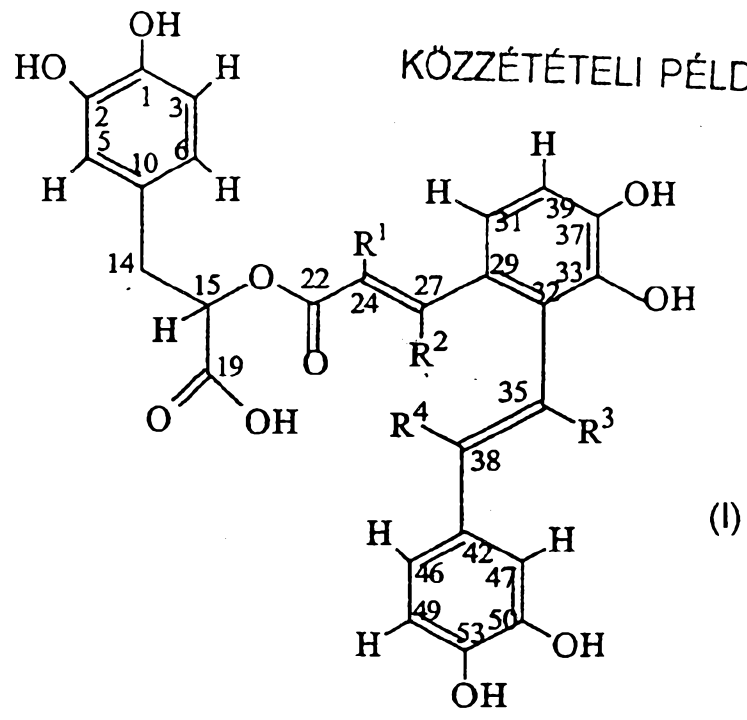
56. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy 4 vagy több monomer egységből álló heteropolimert állítunk elő.

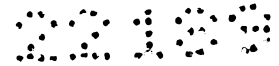
A meghatalmazott:

  
**DANUBIA**  
 Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.  
 dr. Török Ferenc  
 szabadalmi ügyvivő

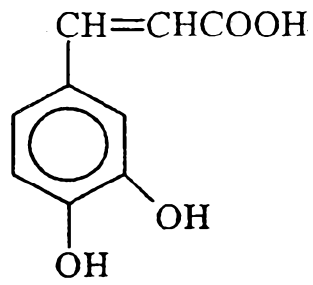


KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

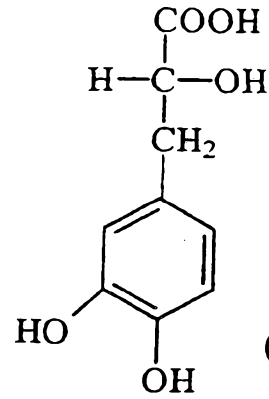




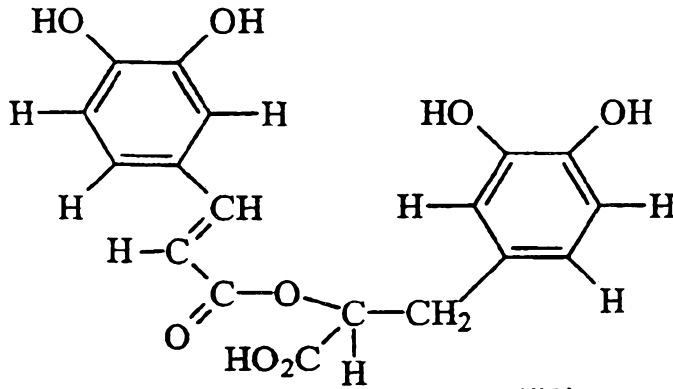
#1)



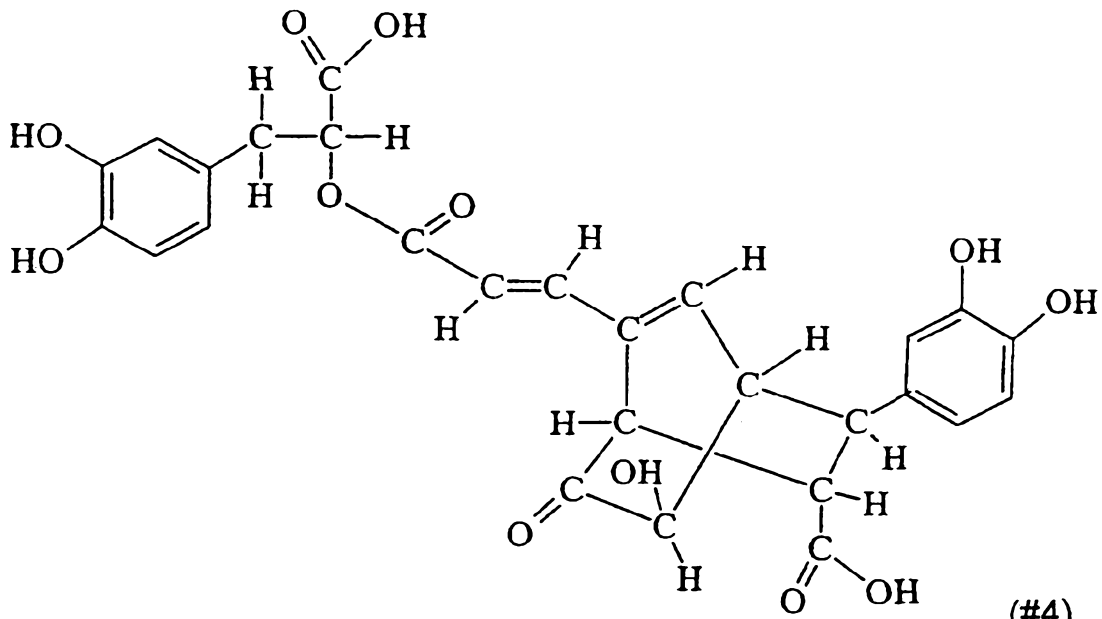
(#1)



(#2)

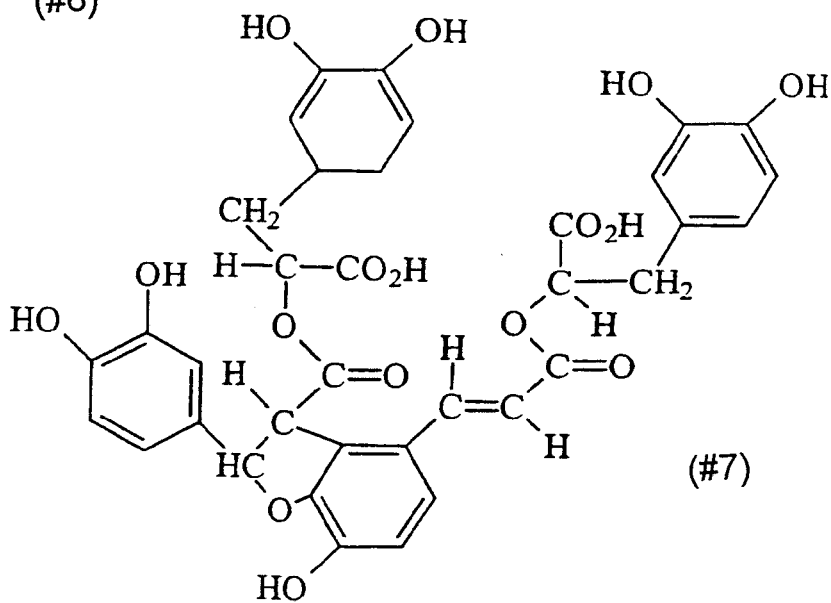
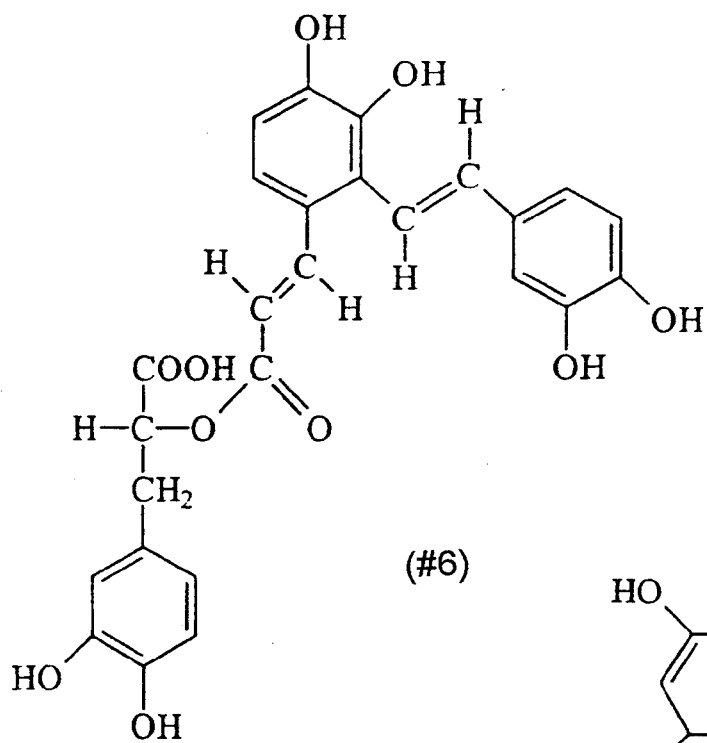
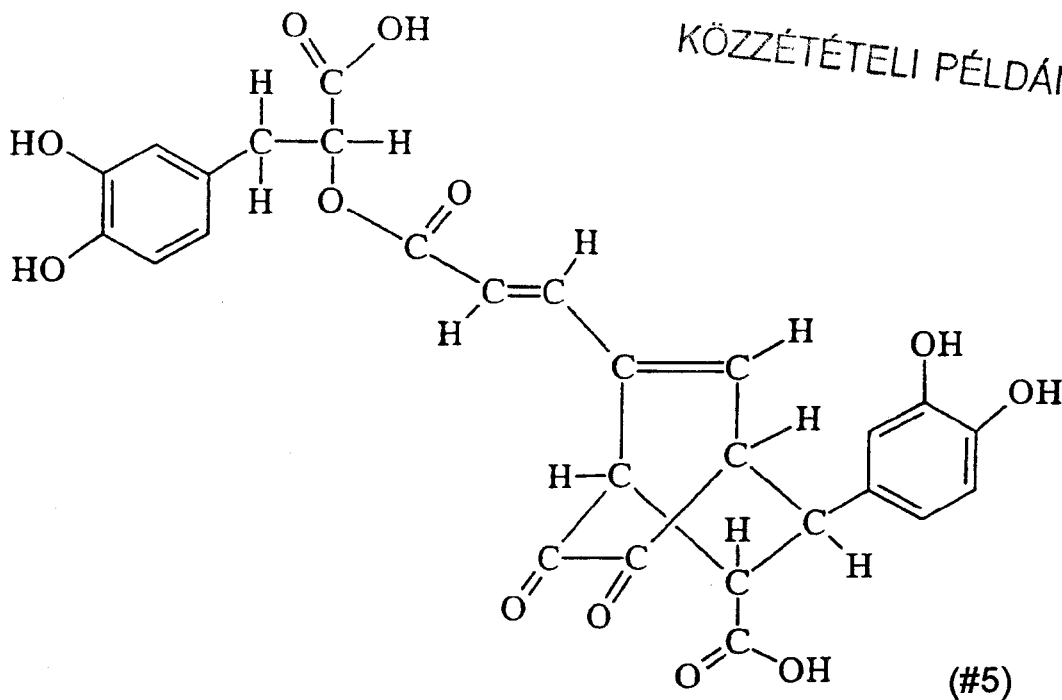


(#3)

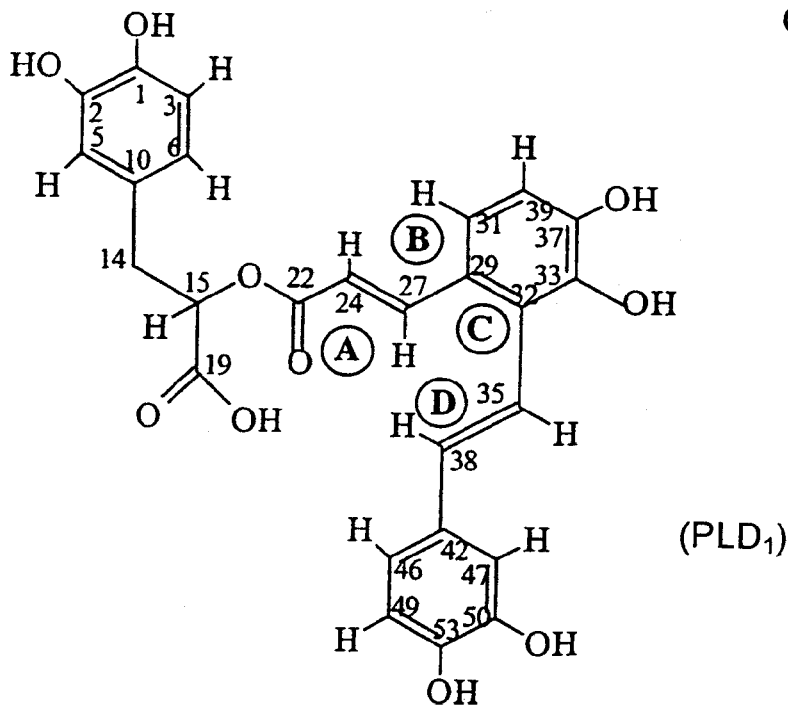
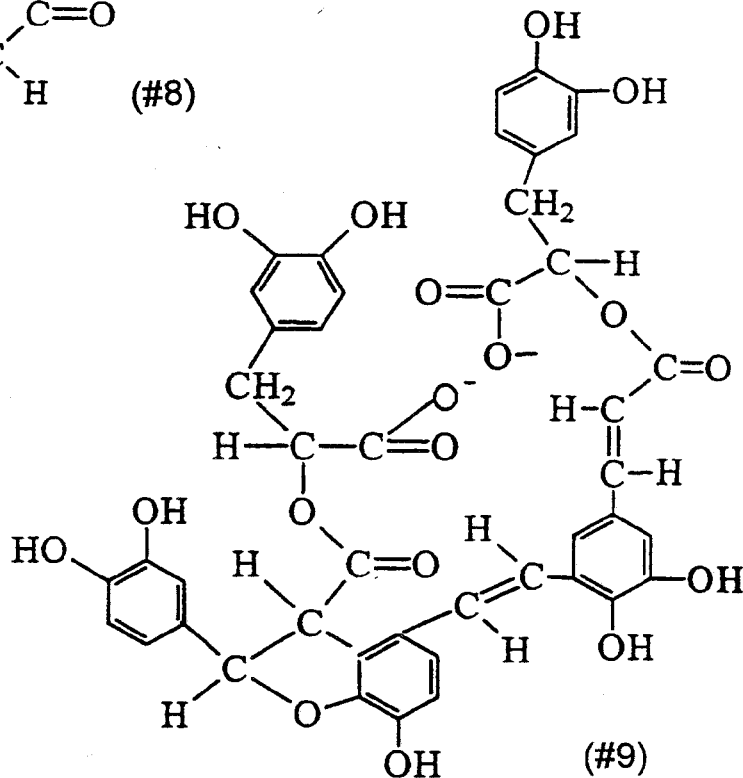
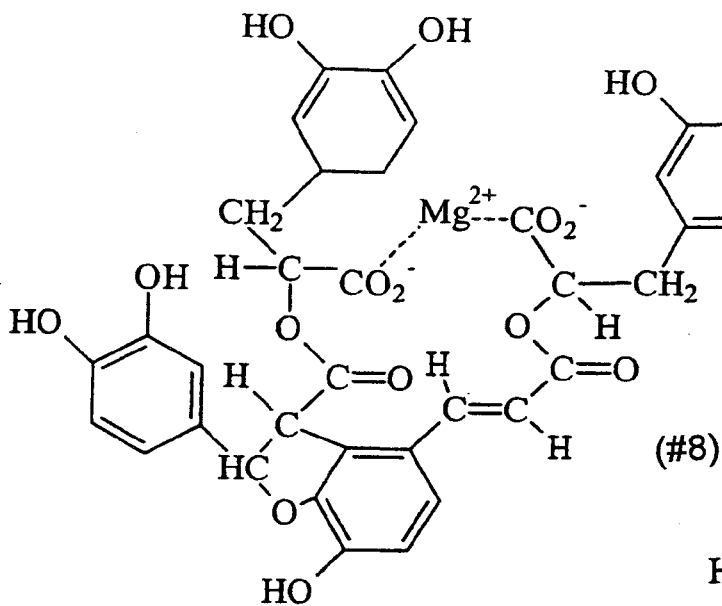


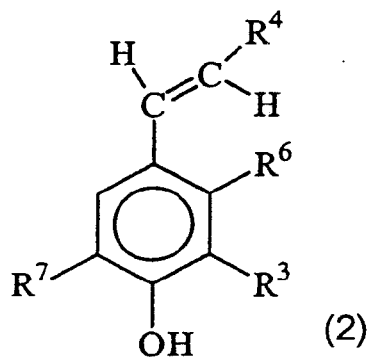
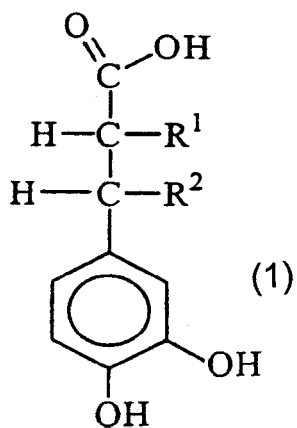
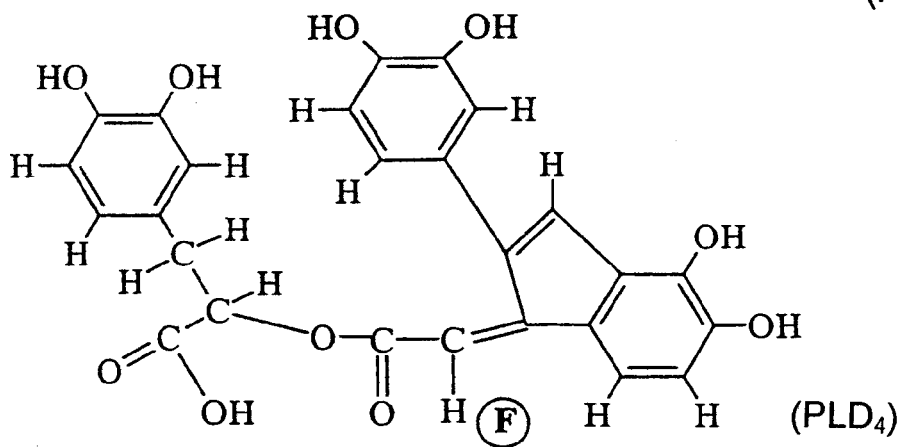
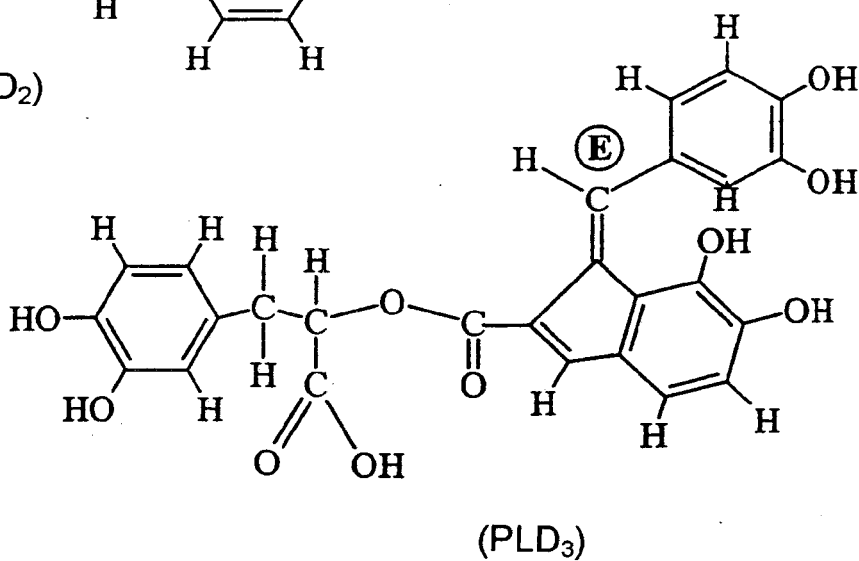
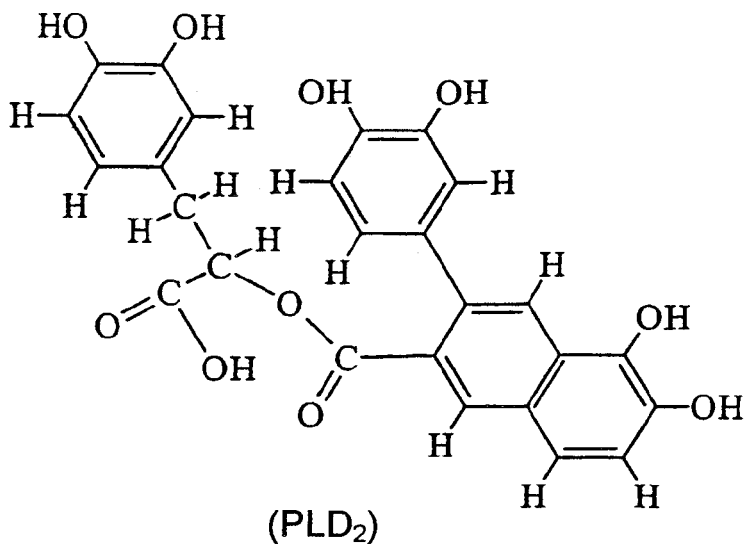
(#4)

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

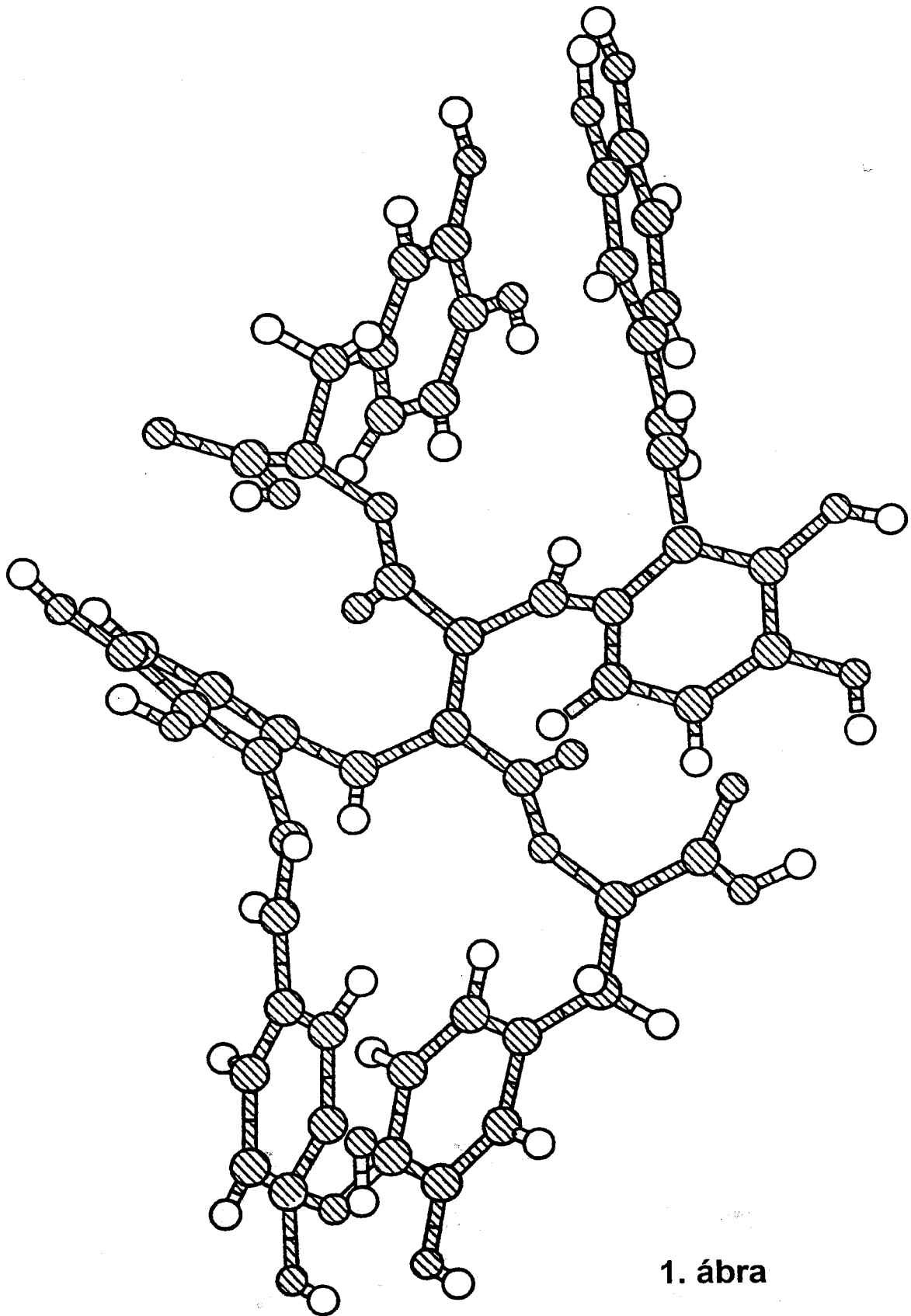
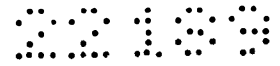


KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



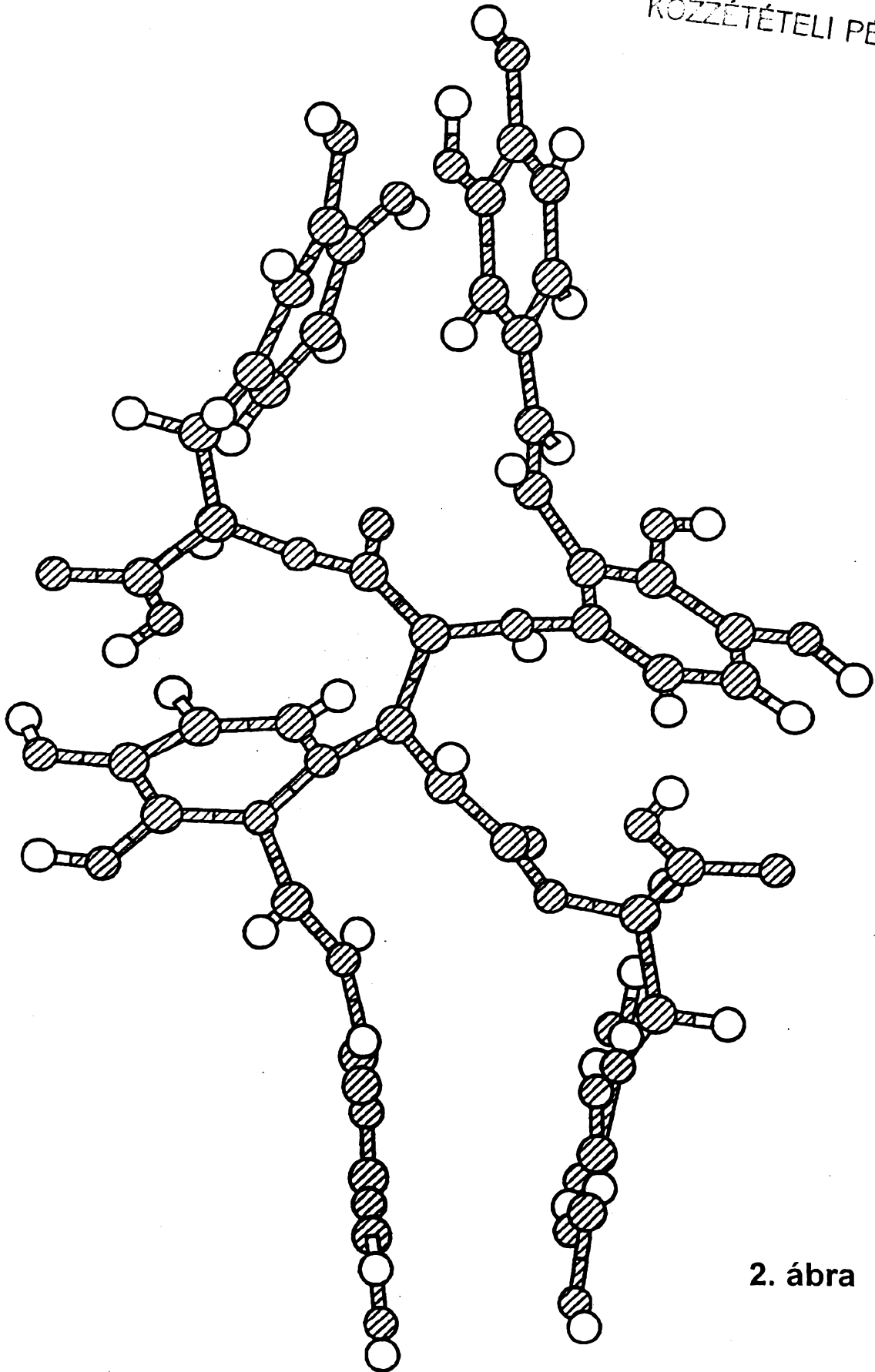


Pol 3394



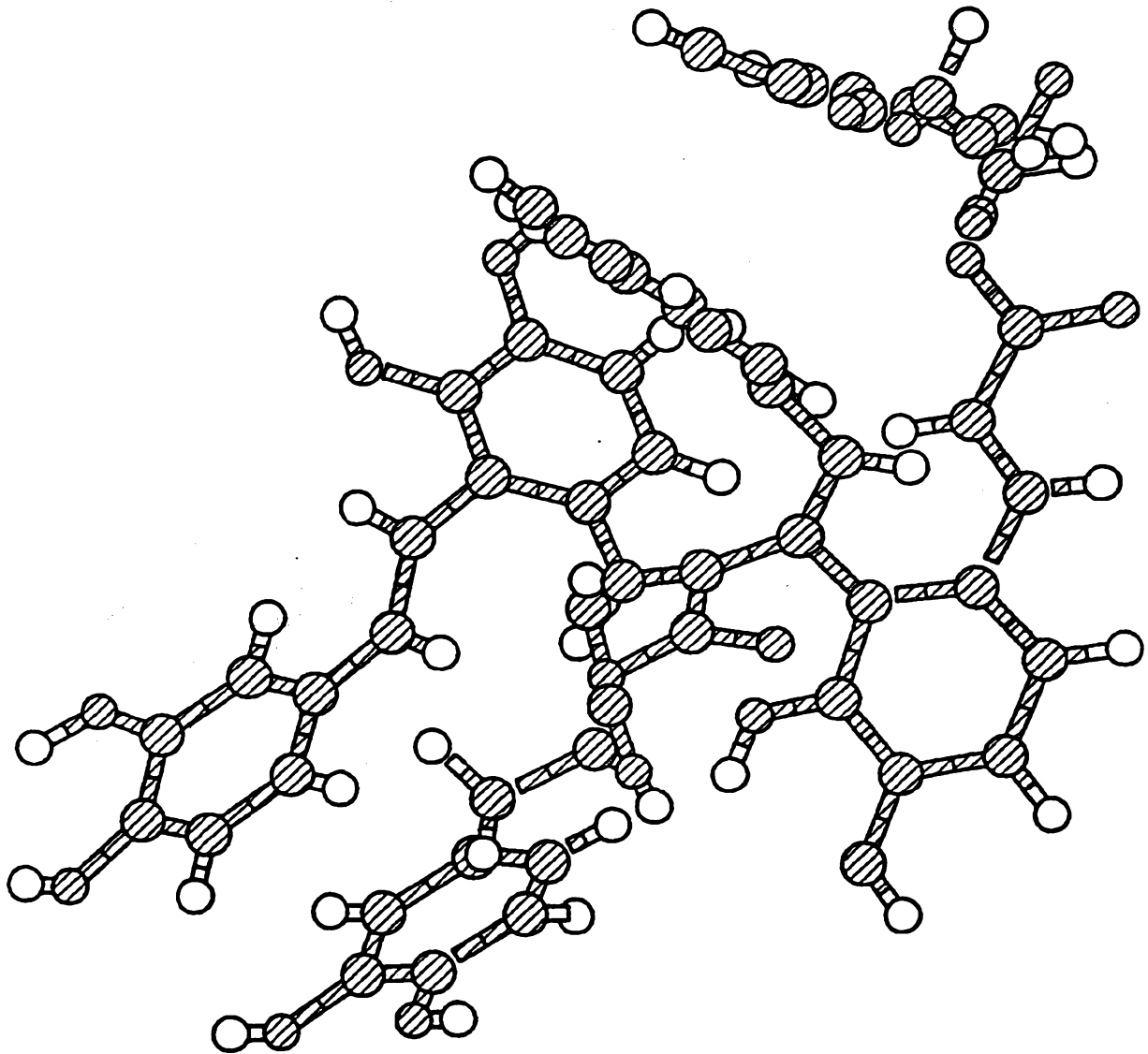
1. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

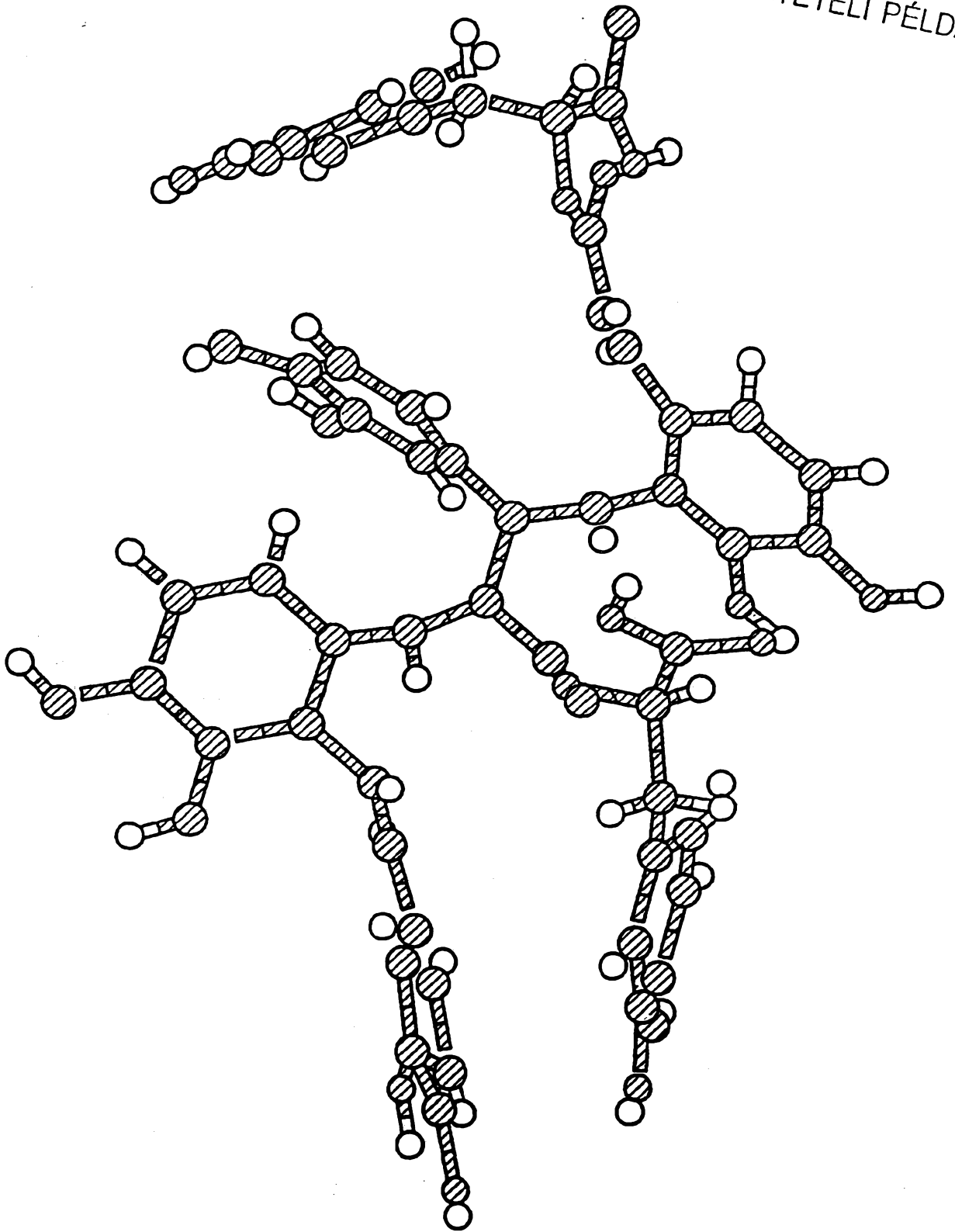


2. ábra

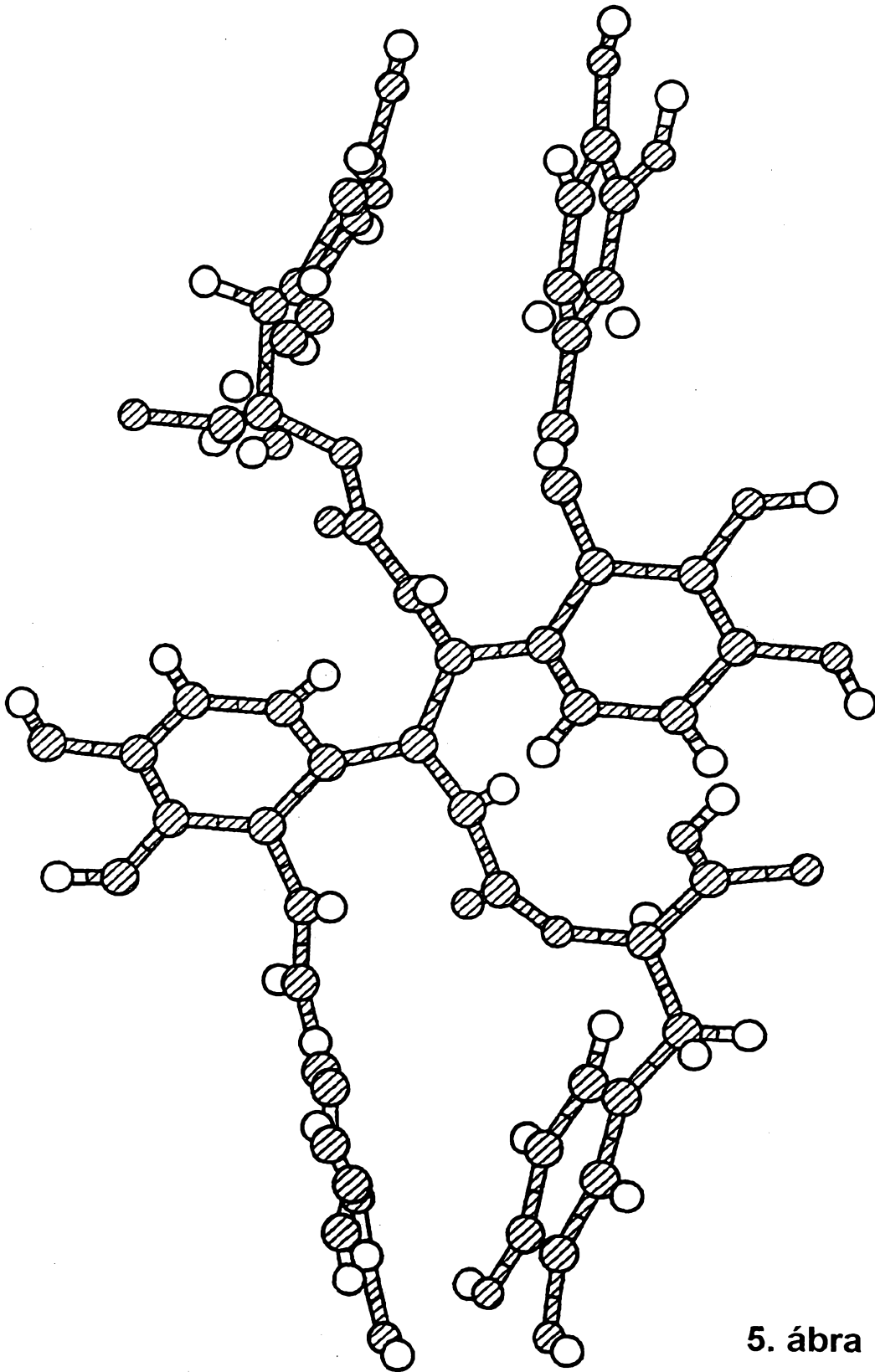
LI PÉLDÁNY



3. ábra

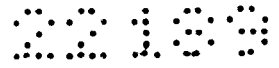


4. ábra



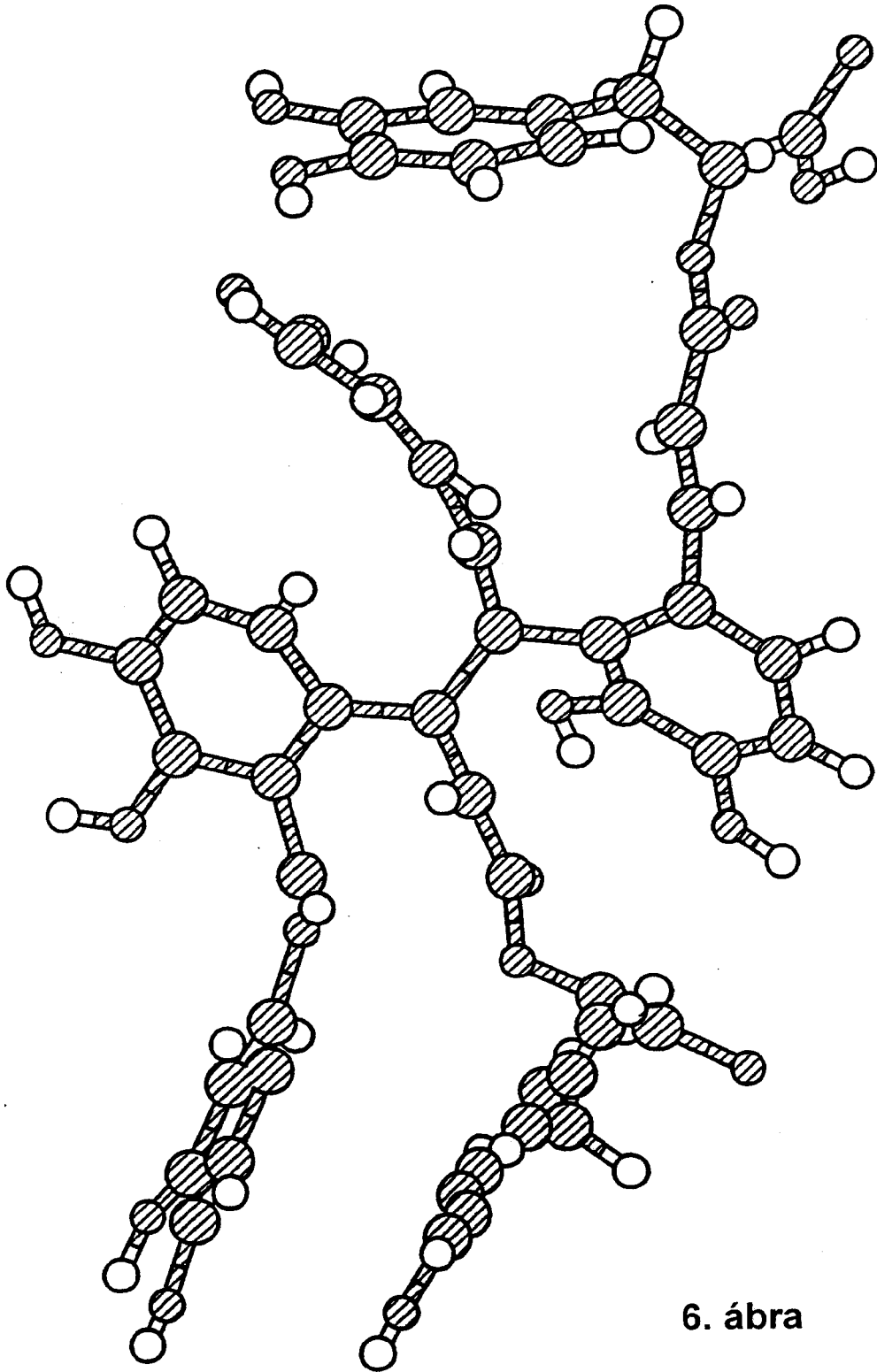
5. ábra

Pol 339F

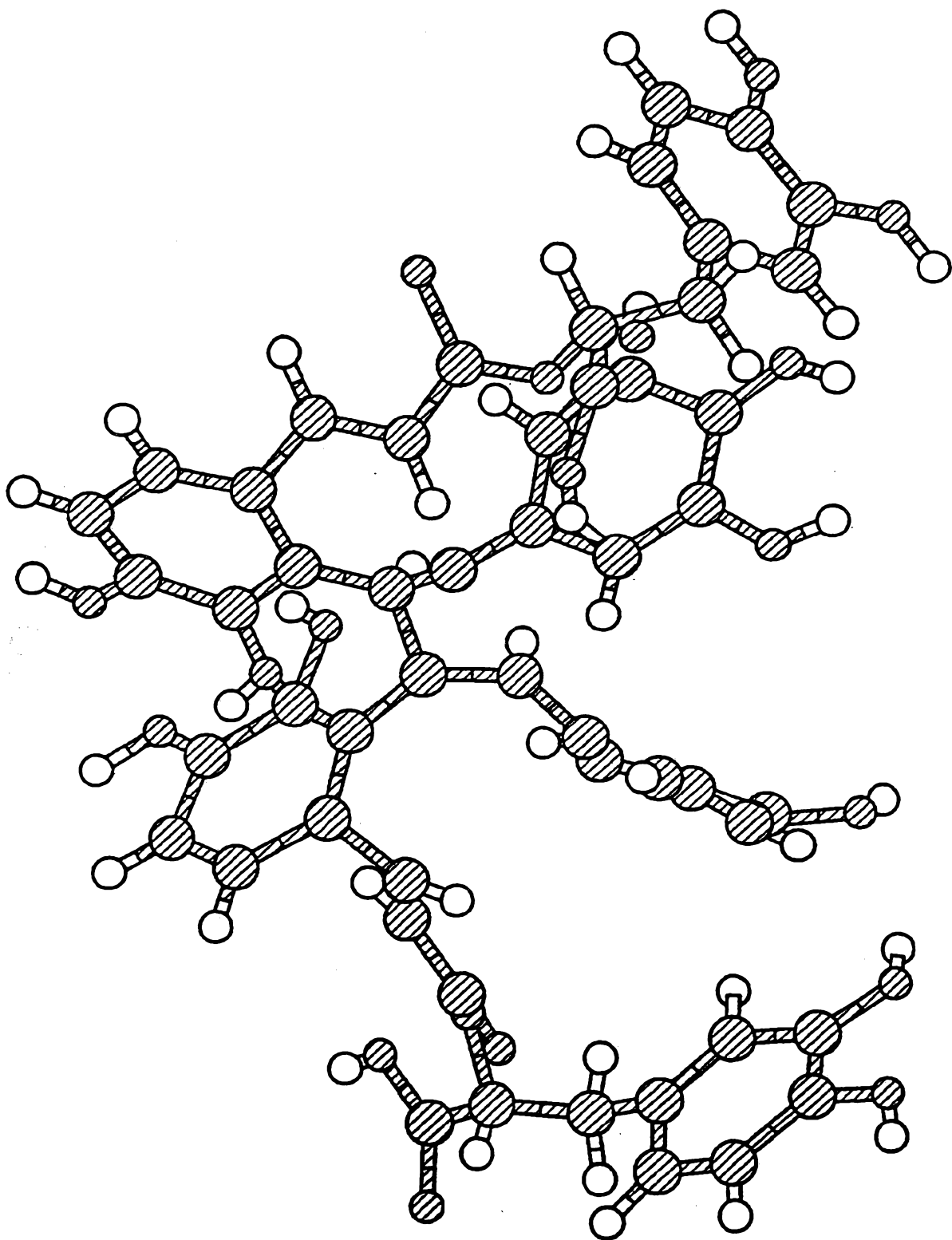


11/18

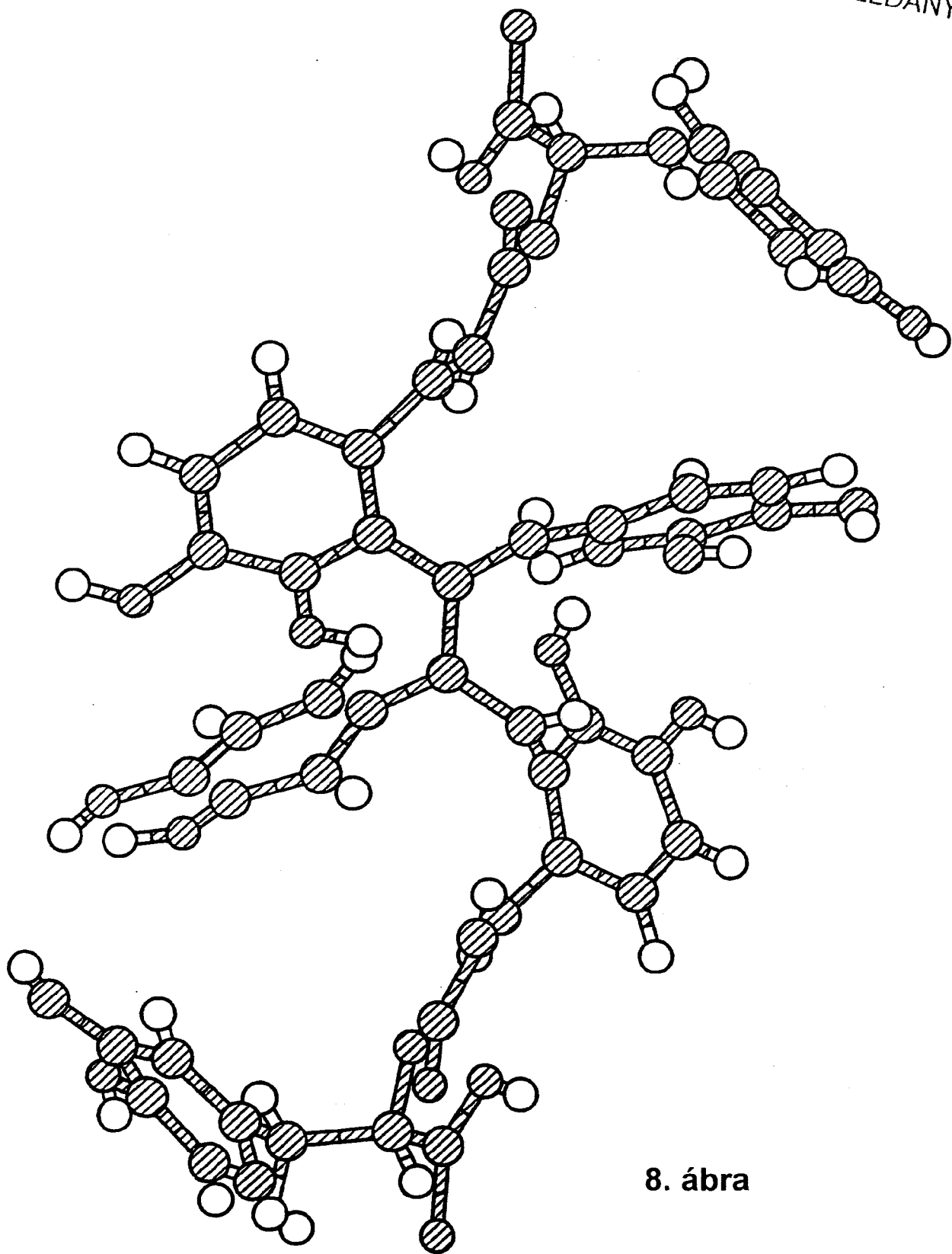
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



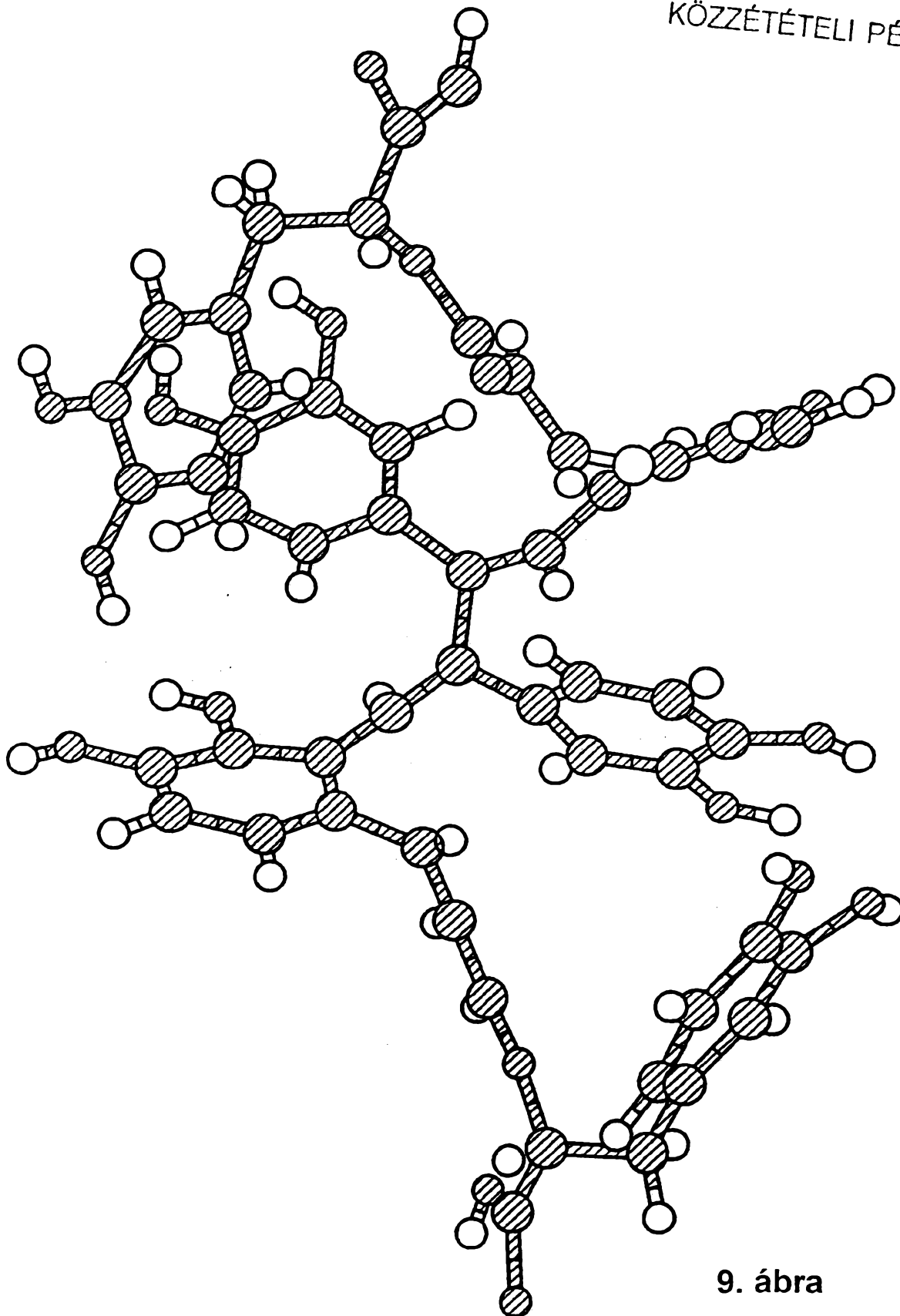
6. ábra



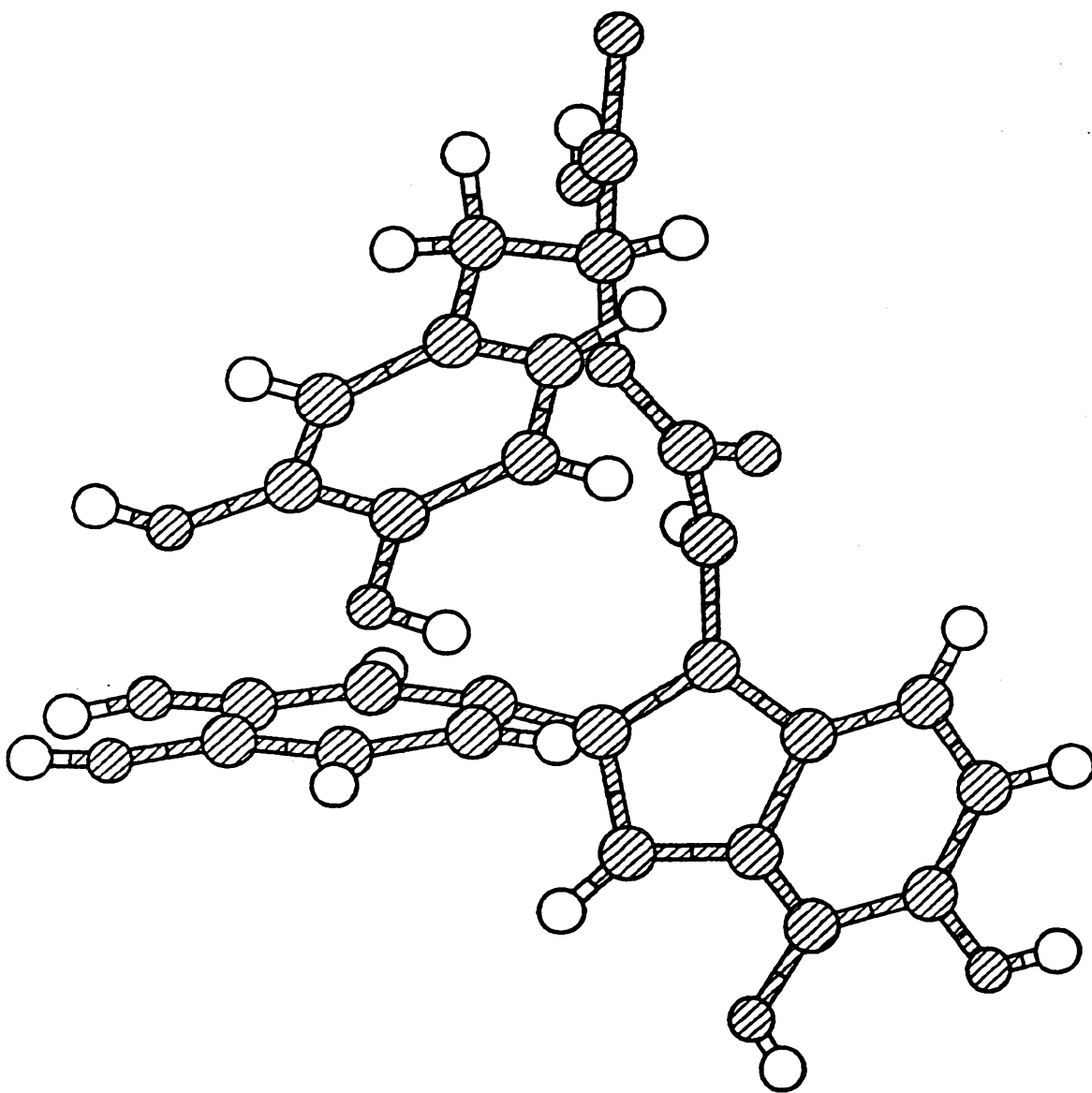
7. ábra



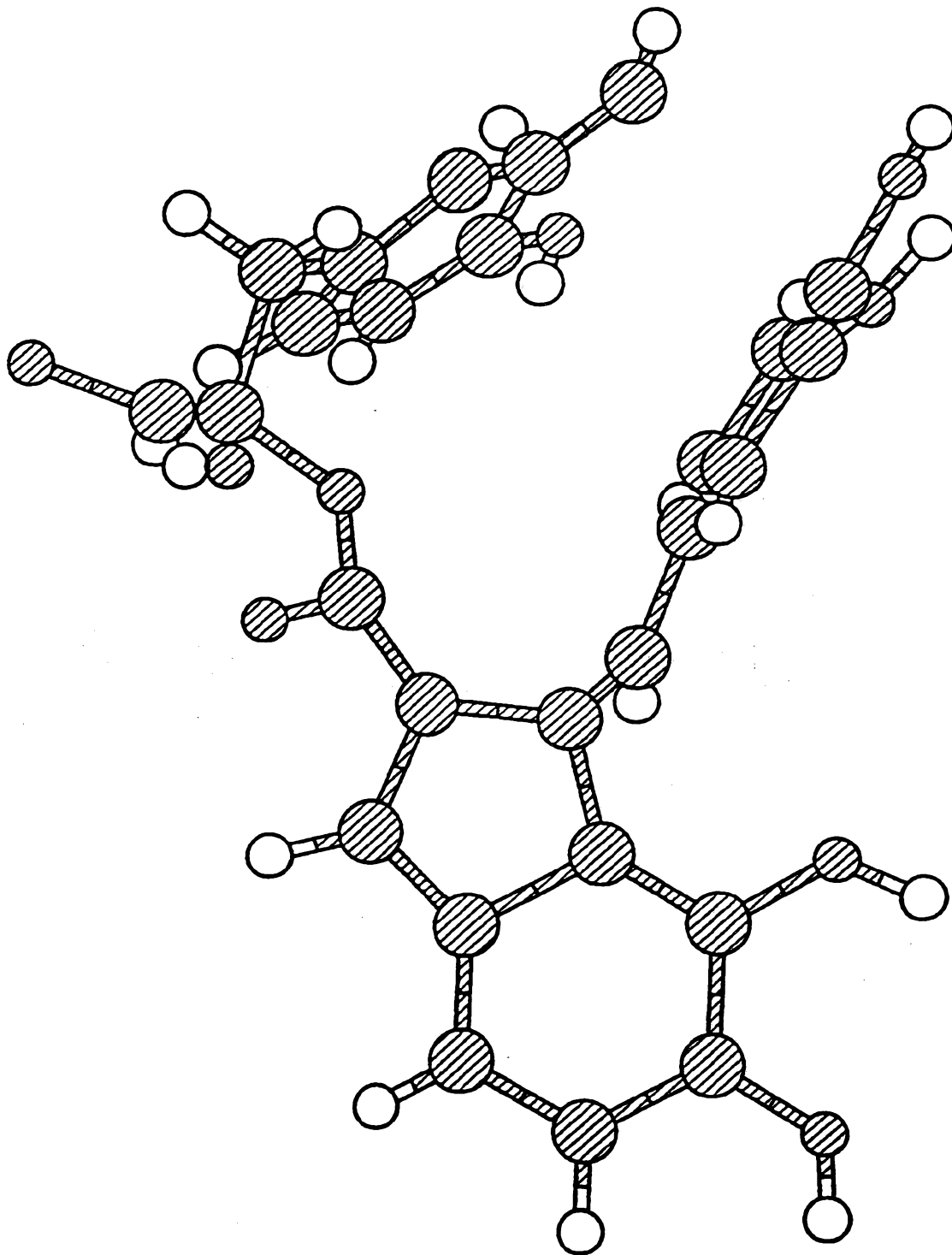
8. ábra



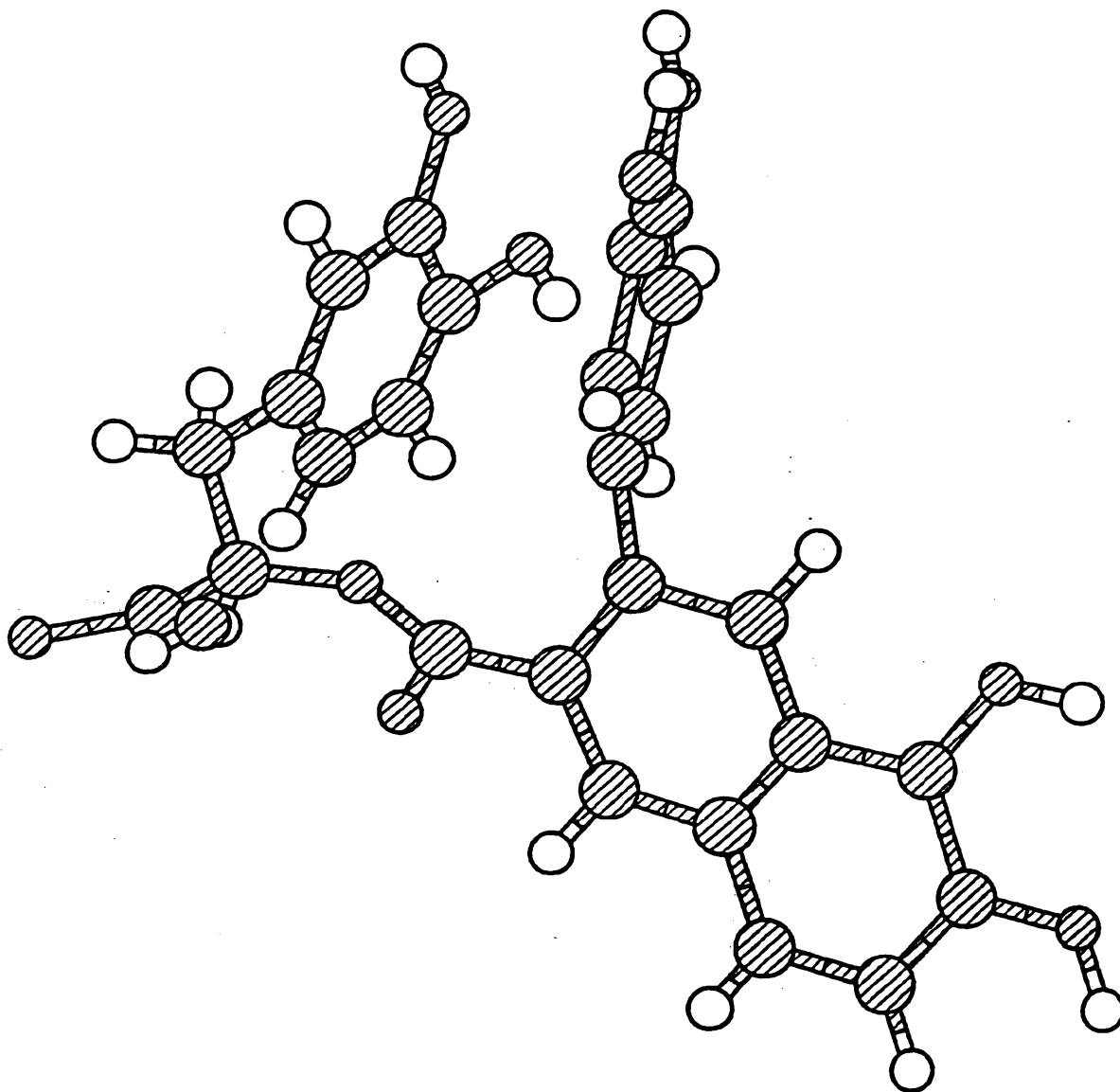
9. ábra



10. ábra

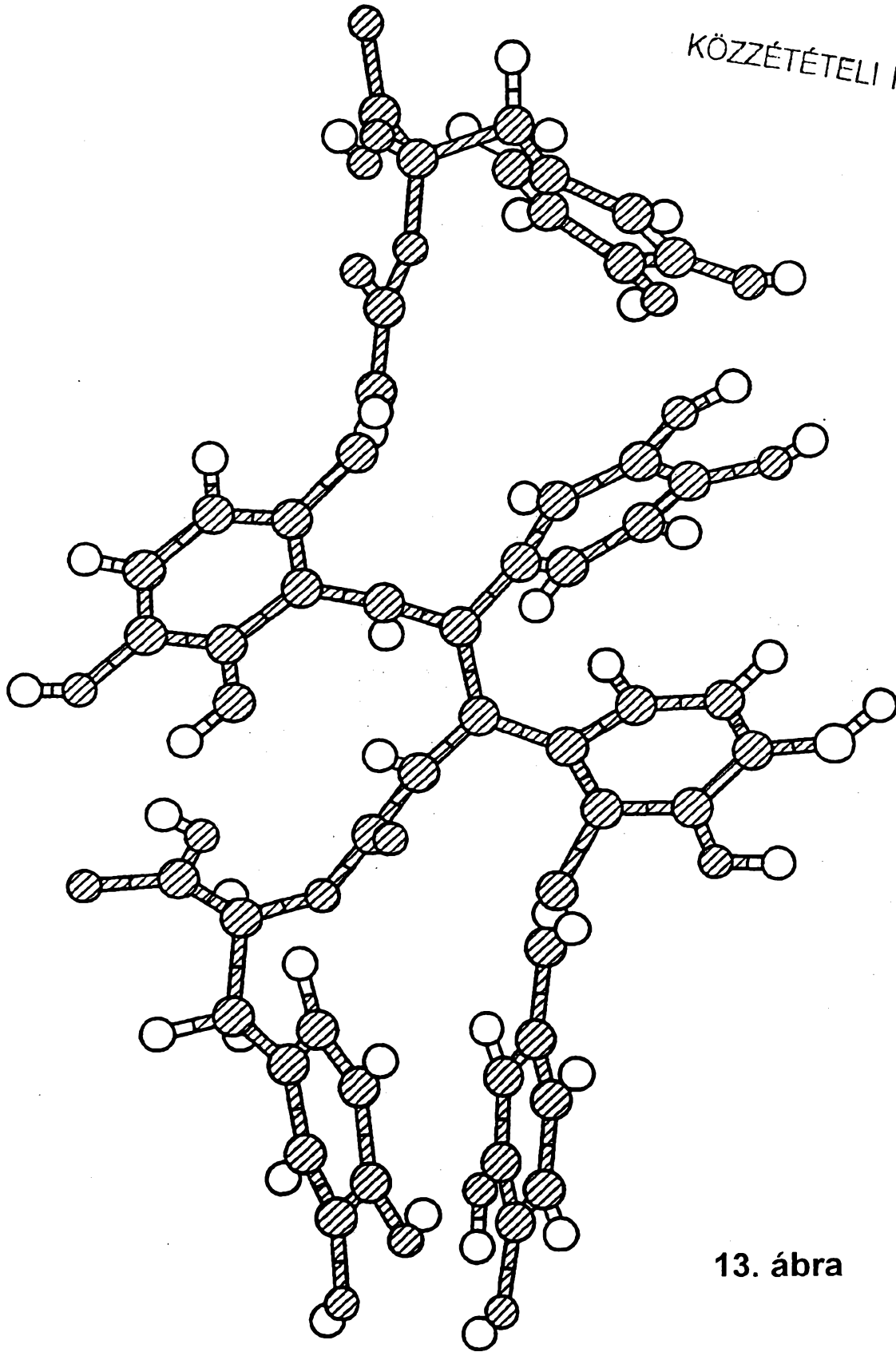


11. ábra



12. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



13. ábra