

Eljárás antivirális és antibakteriális hatású zsírsavakat és monoglicerideket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására

RESEARCH FOUNDATION FOR MENTAL HYGIENE, Inc., Albany,

New York, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

PCT bejelentés napja: 1988. 12. 29.

PCT bejelentés száma: PCT/US88/04696

Elsőbbség: 1987. 12. 31. (140 078)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Nemzetközi közzététel napja: 1989. 07. 13.

Nemzetközi közzététel száma: WO 89/06124

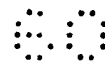
K I V O N A T

A találmány tárgya eljárás antivirális és/vagy antibakteriális gyógyszerkészítmény előállítására.

Az eljárás lényege, hogy inert gyógyszerhordozókat, egy vagy több 6-14 szénatomos telített vagy 16-20 szénatomos telítetlen zsírsavat és ezek monogliceridjeit hatásos mennyiségben összekevernek.

1084/89

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



-55223 =
A

Képviseelő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEJY IRODA

Budapest

60

NSZO⁵:

AGIK 31/225

AGIK 31/23

AGIK 31/19

Eljárás antivirális és antibakteriális hatásu zsírsavakat és monoglicerideket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására

RESEARCH FOUNDATION FOR MENTAL HYGIENE, Inc., Albany,

New York, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltalálók:

ISAACS Charles E.,

Manalapan,

~~New York,~~

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

THOMAR Halldor,

Reykjavik,

IZLAND

KIM Kwang,

Staten Island,

New York,

HEIRD William C.,

New York,

New York,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

PCT bejelentés napja: 1988. 12. 29.

PCT bejelentés száma: PCT/US88/04696

Elsőbbség:

1987. 12. 31. (140 078)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Nemzetközi közzététel napja: 1989. 07. 13.

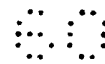
Nemzetközi közzététel száma: WO 89/06124

67763-3585/KY

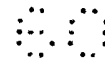


A találmány tárgya zsirsavak és monogliceridek antivirális és antibakteriális hatásán alapszik és fenti vegyületeket tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására vonatkozik. A találmány lényege főképpen a zsirsavak és a monogliceridek azon hatása, miszerint a burokkal rendelkező vírusokat inaktiválják, valamint sejteket pusztítanak el.

Számos publikáció foglalkozik az anyatej azon tulajdonságával, hogy képes megvédeni a csecsemőt a gasztrointesztinális fertőzésektől (lásd A.S. Cunningham: Halálozás anyatejjel és mesterségesen táplált csecsemőknél, J. Pediatr., 1979. 95. kötet, 685-689., M.G. Myers és munkatársai: Légzési és gasztrointesztinális megbetegedések anyatejjel és tápszerrel táplált csecsemőknél, Am. J. Dis. Child., 1984, 138. kötet, 629-632., S.A. Larsen, Jr.: Az anyatejes és a mesterséges táplálás szerepe a gasztroenteritisszel kórházban ápolotknál egy középosztálybeli populációban az Amerikai Egyesült Államokban, J. Pediatr., 1978., 92. kötet, 417-418., M.E. Fallot és munkatársai: Az anyatejes táplálás csökkenti a csecsemők kórházi ápolással járó fertőzőes megbetegedéseinek arányát, Pediatr., 1980., 65. kötet, 1121-1124., A.S. Cunningham: Az anyatejes táplálás és az egészség, J. Pediatr., 1987., 110. kötet, 658-659.). Ezen védőhatást tulnyomórészt a tejben található immunoglobulinoknak tulajdonították (lásd G.A. Loslonsky és munkatársai: Anya-ujszülött kölcsönhatások és az anyatej, az N. Gleicher által szerkesztett Reproductive Immunology c. könyvben meg-



jelent: New York, Alan R. Riss kiadásában, 1981, 171-182.,
A gazdaszervezet védekezése: Fejlődés és az anyai hozzájárulás, a L.A. Barnes által szerkesztett *Advance in Pediatrics*ban, 32. kötet, 1985, 71-100.). Mindazonáltal, arra is rámutattak már, hogy a tejben nemspecifikus faktorok is jelen vannak, amelyek képesek a kórokozók elpusztítására, illetve szaporodásuk lelassítására. Ezen védő faktorok közül egyesek tápanyagként is szolgálnak, mint például a monogliceridek és a zsírsavak. Mivel a csecsemőtápszer nem tartalmaz immunoglobulint, azt feltételezték, hogy nem is fejt ki védőhatást a gasztrointesztinális fertőzésekkel szemben. Azonban a tápszerek tartalmaznak triglicerideket, amelyekből a gyomorban és a belekben végbemenő lipolizist követően szabad zsírsavak és monogliceridek szabadulnak fel, amelyek közül néhányról bebizonyosodott, hogy inaktiválják a burokkal rendelkező vírusokat és a *Giardia lamblia*-t, ha az anyatejben vagy a tehéntejben jelen vannak (lásd J.K. Welsh és munkatársai: Semiliki Forest virus alkalmazása lipidközvetített antivirális aktivitás és anti-alfavirus immunoglobulin-A azonosítására az anyatejben, *Infect. Immun.* 1978., 19. kötet, 395-401. /I/, J.K. Welsh és munkatársai: Az antivirális lipidek, a hő és a fagyasztás hatása az anyatejben jelenlevő vírusok aktivitására, *J. Infect. Dis.*, 1979., 140. kötet, 322-328. /II/, C.E. Isaacs és munkatársai: Az anyatej membránromboló hatása: a burokkal rendelkező vírusok inaktiválása, *J. Infect. Dis.*, 1986., 154. kötet, 966-971., a fent



említett cikkek mindegyike szerepel hivatkozásként).

Az anyatej számos antivirális faktort tartalmaz, amelyek nem immunoglobulinok (lásd W.A. Falkler, Jr.: A dengue-virus egy lipid inhibitora az előtejben és az anyatejben, Arch. Virol. 1975., 47. kötet, 3-10., A.H. Fieldsteel: Arbovirus és egér-leukémia virus elleni antivirális anyagok az anyatejben, Cancer Res., 1974., 34. kötet, 712-715., T.H. Matthews és munkatársai: Lehetséges klinikai jelentőségű antivirális aktivitás az anyatejben, Lancet, 1976., II. kötet, 1387-1389., N.H. Sarkar és munkatársai: Az anyatej hatása az egér-mlődaganat virusra, Cancer Res., 1973., 33. kötet, 626-629.). Ezek faktorok közül néhány a tej nemlipid frakciójában található, de a tanulmányok többsége a lipid frakcióhoz kötött antivirális aktivitásról számol be. Az antivirális hatású lipideket legjobban Welch és munkatársai /II/ jellemezték, akik azt találták, hogy az anyatejben található telítetlen szabad zsírsavak és monogliceridek inaktiválják a burokkal rendelkező, de nem inaktiválják a burokkal nem rendelkező vírusokat.

Amint arról C.E. Isaacs és munkatársai cikkükben (Az anyatej membránroncsoló hatása: a burokkal rendelkező vírusok inaktiválása, J. Infect. Dis., 1986., 154. kötet, 966-971. - itt kifejezetten hivatkozásként megemlítve) beszámolnak róla, Welsh és munkatársai munkáját megerősítették és továbbfejlesztették. Bebizonyosodott, hogy a friss anyatejből származó lipidek nem antivirális hatásúak, de



4 °C-on történő tárolás hatására és a csecsemőgyomorban aktivvá válnak a burokkal rendelkező vírusokkal szemben, valószínűleg a tej trigliceridjeiből történő zsírsavfelszabadulás hatására.

Az 1a-1c. ábrák a VSV (vesicularis stomatitis virus) részecskék negatív festődését mutatják, amely a linolsav hatására utal. VS virust 37 °C-on 30 percig inkubáltunk

a) fenntartó tápoldatban (FTO), b) linolsavban (5 mg/ml, FTO-ban) és c) linolsavban (1 mg/ml, FTO-ban).

- a) Tüskékkel borított szabályos érintetlen részecskék,
- b) a virusburok már nem érintetlen, ezáltal a festék a legtöbb részecskébe behatol,
- c) virusrészecskék a szétesés különböző fázisaiban.

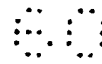
A szakasz hossza 0,1 mikrométer.

A 2a-2d. ábrák a sejtkulturák pásztázó elektronmikroszkóppal készített képeit mutatják, amelyeken az anyatej és a linolsav hatása látható. Vero sejteket 37 °C-on 30 percig inkubáltunk a) anyatejben, b) 4 °C-on 4 napig tárolt anyatejben, c) FTO-ban és d) linolsavval (1 mg/ml, FTO-ban). A tejmintákat 1:5 arányban FTO-ban higitottuk.

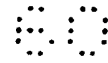
- (a és c): érintetlen sejtmembránok mikrobolyhokkal,
- (b és d): részben vagy teljesen szétesett membránok.

A szakasz hossza 1,0 mikrométer.

A friss anyatejben található lipidek nem inaktiválják a vírusokat, de a tej 4 vagy 23 °C-on pár napig történő tárolása során antivirális hatásúvá válnak. Az antivirális akti-



vitás megjelenése az aktiv lipázok jelenlététől függ és összefüggésben van a szabad zsírsavaknak a tejbe történő kibocsátásával. Egy sor zsírsavat - amelyek az anyatej lipidjeinek természetes alkotói - teszteltünk burokkal rendelkező vírusok, mint a vesicularis stomatitis virus, a herpes simplex virus és a visna virus, valamint egy burokkal nem rendelkező virus, a poliovirus ellen. A rövid és a hosszú láncu telített zsírsavaknak nagyon kicsi vagy semmi antivirális hatása nincs a legnagyobb alkalmazott koncentrációban. Ugyanakkor, a közepes lánchosszuságu telített és a hosszuláncu telítetlen zsírsavak valamennyien igen aktívak voltak a burokkal rendelkező vírusok ellen, habár a maximális virus-inaktiváláshoz szükséges zsírsavkoncentráció huszszoros tartományban változott. Ezen zsírsavak monogliceridjei szintén igen aktívaknak bizonyultak, egyes esetekben ráadásul tiszter kisebb koncentrációban mint a megfelelő szabad sav. Egyik zsírsav sem inaktiválta a poliovirust. Ugy találtuk, hogy az antivirális hatású zsírsavak a vírus burkát támadják meg, miáltal az átjárhatóvá válik, magasabb zsírsavkoncentrációknál pedig a burok és a vírusrészecskék teljesen szétesnek. Ezen zsírsavak a sejt kulturában tartott sejtek plazmamembránjának szétesését is előidézik, amely a sejt liziséhez, majd halálához vezet. Ugyanez a jelenség lép fel, ha a kulturában tartott sejteket tárolt, antivirális hatású anyatejjel inkubáljuk. Az anyatej lipidjeinek in vitro antimikrobiális hatása ennek alapján legvalószínűbben



a sejt- és virusmembránok zsírsavak által okozott szétesésének tulajdonítható.

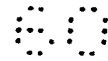
Anyagok és módszerek:

Sejtkulturák

A Vero sejteket (afrikai zöld majom vesesejt-vonal, Flow Laboratories Inc., McLean, Va.) Eagle-féle alap-tápoldatban (Eagle basal medium = BME, GIBCO Laboratories, Grand Island, New York, USA) tenyésztettük, amelyhez 10 % inaktivált foetalis borjuszérumot (GIBCO) adtunk. A juh fibroblaszt kulturákat báránycoroid plexusból nyertük és 15 % juhszérumot (Colorado Serum Co.) tartalmazó BME tápoldatban tenyésztettük. A Vero sejtek fenntartó tápoldata (FTO) BME volt 2 % foetalis borjuszérummal, a juhsejtek esetében BME 2 % juhszérummal. Minden tápoldathoz 0,1 % Gentamicint adtunk.

Virusok

A vesicularis stomatitis virus (VSV) Indiana törzsét és az 1. típusu herpes simplex virus McIntyre törzsét az Amerikai Típusú Sejtkulturagyűjteményből (American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA) szereztük be és Vero sejtekben tenyésztettük. A Visna virus K796 törzsét juh choroid plexus sejtekben tenyésztettük. Az 1. típusu poliovirus Chat törzsét R.I.Carp-tól (New York Institute for Basic Research) kaptuk és Vero sejtekben tenyésztettük.



Virustitrálás

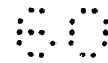
A vírusokat tízszeres hígítások 96-lyukú mikrotiter-sejtkulturalapokra (Becton Dickinson Labware, Oxnard, California, USA) történő beoltásával titráltuk (a VSV, a poli-ovirus és a HSV-1 esetén Vero sejtekbe, a visna vírus esetén juh choroid plexus sejtekbe történt a beoltás). 0,1 ml virushígítást (FTO-ban) oltottunk egy-egy lyukba és hígításonként négy lyukat használtunk. A mikrotiter lapokat a vírustól függően 2-12 napig tartottuk, naponta vizsgálva a citopátikus hatást. A virustitert Reed és Muench módszerével számítottuk (L.J. Reed és munkatársai: Am. J. Hyg., 1938., 27. kötet, 493-497.).

Tejminták

Az 1., 2. és 3. tejmintákat steril körülmények között gyűjtötték szülés után 1-5 hónappal lévő anygáktól és -86 °C-on mélyhűtve tároltuk a kísérletekben történő felhasználásig.

Vegyszerek

A zsírsavakat és a monoglicerideket a Sigma Chemical Co.-tól (St. Louis, Mo., USA) vásároltuk, legtisztább (puriss.) minőségben. Közvetlenül használat előtt megolvasztottuk és 10 % foetális borjuszérumot tartalmazó BME oldattal emulgeáltuk 1 perces, legnagyobb fokozaton történő vortexezéssel. A 100 mg/ml töménységű emulziókat FTO-ban hígítottuk a kívánt koncentrációra. A rövidláncú zsírsavak emulzióját 1 M NaOH hozzáadásával pH = 7-ig semlegesítettük.



A telítetlen zsírsavakat és a monoglicerideket nitrogén alatt tartottuk és az emulziókat az elkészítés után néhány percen belül felhasználtuk. Az eserine-szulfátot (fizosztigmin, Sigman) és a NaCl-ot vízben oldottuk és FTO-ban higitottuk a kísérletekben való felhasználás előtt.

Az antivirális aktivitás meghatározása

A vírus kb. 10^5 5 %-os sejtkultúra-fertőző dózisát (SFD⁵⁰) összekevertük FTO-ban ötször higitott anyatejjel vagy zsírsavak és monogliceridek FTO-ban készített emulziójával és 37 °C-on 30 percig inkubáltuk. Kontrollként FTO-val összekevert virust használtunk. Inkubálás után minden egyes elegy fertőzőképességét meghatároztuk a sorozatos higitásos végpontmeghatározás módszerét alkalmazva. A 10^{-2} - 10^{-5} higitásokat Vero sejtek egysejtrétegű kultúrájába oltottuk és a virustitert a fentiekben leírt módon meghatároztuk. A kontroll-vírus, valamint a tej-vírus és a lipid-vírus keverékek titere (\log_{10}) közötti különbséget, azaz a virustiter csökkentését használtuk az antivirális aktivitás jellemzésére.

A vírusok feldolgozása elektronmikroszkópiához

A VSV vírusokat betöményítettük és részlegesen tisztítottuk Beckman L2-65B típusu ultracentrifugával történő differenciál-centrifugálással és a mintákat (10^{10} SFD⁵⁰/ml) 37 °C-on 30 percig inkubáltuk FTO-ban, emulgeált zsírsavak jelenlétében vagy anélkül. A vírus-szuszpenziókat szénnel bevont rácstra vittük fel és 7-es pH-ju 2 %-os



foszfowolframmal negatívan festettük. A mintákat Hitachi HS 8-2-típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk 50 kV-nál.

A sejtek feldolgozása elektronmikroszkópiához

A sejtek egyrétegű kulturáit 30 percig 37 °C-on inkubáltuk FTO-val vagy tej-, illetve zsírsav-emulzióval. A sejtrétegeket ezután óvatosan lemostuk Hank-féle egyensúlyi sóoldattal (Hank's balanced salt solution) és 2 % glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M kakodilát-pufferral fixáltuk. Pufferral való mosás és 2 %-os ozmium-tetroxidos utófixálás után a sejteket etanollal történő átmosással majd az etanol elpárologtatásával szárítottuk és fröcsköléssel 10,5 nm arannyal borítottuk. Az így feldolgozott sejteket ISI-ISS40 pásztázó elektronmikroszkóppal 20 kV-nál vizsgáltuk.

A szabad zsírsavtartalom meghatározása

A tejminták 100 mikroliteréből 0,5 ml kloroform-metanol (2:1) eleggyel extraháltuk a lipideket. A felső fázist el-távolítottuk és a kloroform-réteg egy alikvotját vékonyrétegkromatográfiával választottuk el Silica Gel G lemezen (Merck and Co., Inc., Rahway, N.J., USA), olajsavat használva kvantitatív standardként hexán/dietil-éter/ecetsav (70:30:1,5) oldószerrendszerben. A kifejlesztett lemezeket króm-kénsavval való bepermetezés után elszenesítettük és a szabad zsírsavakat denzitometriásan határoztuk meg.

Eredmények:

Összefüggés a lipolízis és az antivirális aktivitás



között

Megelőző eredmények (Isaacs és munkatársai) azt mutatják, hogy az anyatej 4, 23 vagy -20°C -on különböző időig való tárolás után válik csak aktivvá a burokkal rendelkező vírusokkal szemben. Az antivirális aktivitás a zsirokat tartalmazó frakcióhoz kapcsolódik, bár a zsirmentes frakcióra is szükség van ahhoz, hogy a lipidek antivirális hatásúvá váljanak. Acélból, hogy kiderítsük, az antivirális aktivitás megjelenése valóban összefüggésben van-e a tej lipáz enzimjeivel, az 1., 2. és 3. tejmintákat 4 napig 4°C -on tartottuk két lipáz-inhibitor, 5 mM eserine-szulfát és 1 M NaCl jelenlétében, illetve anélkül. A vírus-titer (VSV esetén) 10^5 SFD⁵⁰-ról $10^{1,5}$ SFD⁵⁰-re csökkent az inhibitor nélkül tárolt tejjel történt inkubálás után, ami $10^{3,5}$ SFD⁵⁰-nel való csökkenést jelent. Ezzel szemben a lipáz-inhibitorokkal tárolt tejjel történt inkubálás után az alkalmazott koncentrációk mellett nem tapasztaltunk fertőzőképesség-csökkenést. Az inhibitorok nem voltak hatással a már antivirálissá vált anyatejre.

Egy másik, arra utaló jel, hogy az antivirális aktivitás megjelenése a tárolt anyatejben kapcsolatban áll a lipolizissal, az 1. táblázatból olvasható ki. A mélyhűtött 1. anyatejmintában nem volt kimutatható zsirsav, de 4 napos tárolás után 4°C esetén 7, 23°C esetén 12 mg/ml-re nőtt a szabad zsirsavak koncentrációja. Mindkét tárolt minta erősen antivirális hatású volt. Ugyanakkor a 3. tejminta szabad



zsírsavtartalma a tárolás hatására csak 2 mg/ml-re emelkedett és a tej nem vált antivirálissá. A 3. mintával szemben az 1. tejmintában sokkal magasabb volt a lipoprotein lipáz-tartalom, amiről az előzőekben megmutattuk, hogy összefügg a tej antivirális aktivitásának megjelenésével.

A zsírsavak és monogliceridek antivirális aktivitása

A 2. táblázatban egy sor, a tejben található zsírsav antivirális aktivitásának összehasonlítása található. A rövid láncu (vaj-, kapron- és kaprilsav) és a hosszú láncu telített (palmitin- és sztearinsav) zsírsavak semmi, vagy csak nagyon kicsi antivirális hatással rendelkeznek az alkalmazott legnagyobb koncentrációkban is. Másrészt, a közepes széláncu telített és a hosszú láncu telítetlen zsírsavak mindegyike antivirális hatású volt, de más-más koncentrációban. A 2. táblázatban láthatók a VSV-titerben tízezerszeres csökkenést okozó legkisebb koncentrációk. Kétszer kisebb koncentráció vagy nem inaktiválta a vírust, vagy csak tízszeres csökkenést okozott a titerben. Hasonló eredményeket kaptunk a HSV-1 és a visna vírus esetében is (utóbbi egy rektovírus). Ezzel szemben, ha poliovírust inkubáltunk 37 °C-on 30 percig kapronsav, laurinsav, mirisztinsav, palmitinsav, olajsav, linolsav, linolénsav, illetve arachidonsav jelenlétében, mindegyik esetben 8 mg/ml-es koncentrációban, nem történt jelentős virustiter-csökkenés a zsírsav nélkül inkubált poliovírus titeréhez képest ($10^{4.7}$ SFD⁵⁰). Az olajsav és a linolénsav nátriumsójának



antivirális hatása hasonló volt a szabad savéhoz.

A lipolízis más termékeit, mint például a zsírsavak 1-monogliceridjeit is teszteltük antivirális aktivitás szempontjából (3. táblázat). Az összes tesztelt monoglicerid (a monomirisztin és a monoolein kivételével) antivirális hatású volt, mégpedig 5-10-szer alacsonyabb koncentrációban (millimólban), mint a megfelelő zsírsav.

A fenti, anyatejjel, csecsemő-gyomortartalommal és tisztított lipidekkel végzett kísérletek arra utalnak, hogy az anyatej trigliceridjeiből tárolás során vagy a gyomor-bél traktusban keletkező monogliceridek és zsírsavak elpusztítják a burokkal rendelkező vírusokat és nagyon valószínű, hogy in vivo védő hatást fejtenek ki az anyatejjel táplált csecsemőkre.

Kísérleteket végeztünk acélból is, hogy meghatározzuk a vírus inaktiválásához szükséges időt. A vírust monolaurinnal inkubáltuk FT0-ban:

3a. táblázat

A vírus-inaktiválás időfüggése

<u>Inkubációs idő (perc)</u>	<u>A HSV-1 titer csökkenése</u>
30	$\geq 4,0$
10	$\geq 4,0$
5	$\geq 4,0$
1	$\geq 4,0$
0,5	$\geq 4,0$



Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a vírus elpusztítása igen gyorsan végbemegy és valószínűleg megtörténik, mielőtt a monoglicerid vagy a szabad zsírsav érintkezésbe kerül a vírusburokkal. Linolsavval inkubált VSV negatívan festett elektronmikroszkópos képe azt mutatja, hogy 0,5 mg/ml-es koncentrációnál a vírusburok átjárhatóvá vált és ezáltal a festék több részecskébe be tud jutni. A hatás sokkal kifejezettebb 1 mg/ml linolsavkoncentrációnál, amikor a részecskék már szét is esnek.

A zsírsavak hatása a vírusrészecskékre

A zsírsavak vírusrészecskékre gyakorolt hatásának tanulmányozása céljából VSV-t betöményítettünk és részlegesen tisztítottunk, majd 37 °C-on 30 percig inkubáltuk FTO-ban linolsavval és anélkül. A zsírsav nélkül inkubált vírus negatív festése azt mutatta, hogy jellegzetes, tüskékkel borított lövedék alakú részecskék jellemzőek, amelyek összetekeredett nukleokapszidokat tartalmaznak (1a. ábra). 0,5 mg/ml linolsavval való inkubálás átjárhatóvá teszi a vírusburokot, ezáltal festék juthat be sok részecskébe (1b. ábra). A hatás sokkal kifejezettebb, ha 1 mg/ml linolsavat használunk (1c. ábra), ekkor a részecskék szétesése is megtörténik. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz használt minták titrálása alapján 0,5 mg/ml linolsav esetén a vírus-titer tízszeresen csökken, míg 1 mg/ml ezerszeres csökkenést okoz. Hasonló eredmények kaphatók, ha VSV-t alacsony koncentrációban arachidonsavval inkubáljuk, majd a víruso-



kat negatív festéssel vizsgáljuk.

A sejtmembrán zsírsavak hatására történő szétesése

A zsírsavakkal kezelt VSV negatív festése arra mutat, hogy a vírus inaktiválása a vírusburok szétesésének a következménye, amely vírusburok a gazdasejt plazmamembránjából jön létre. A sejtmembránra kifejtett hatás tanulmányozása céljából Vero sejtek vagy juh fibroblasztok egyrétegű kulturáit 37 °C-on 30 percig inkubáltuk FT0-ban, linolsav nélkül, illetve 1 mg/ml linolsav jelenlétében, majd pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A kontrollsejtek esetében, amelyeket csak FT0-val inkubáltunk, a sejtmembrán érintetlen (2c. ábra), míg az 1 mg/ml linolsavval kezelt sejteknél a sejtmembrán részben vagy teljesen szétesett, a sejt lizisét okozva. Ugyanez a hatás figyelhető meg a 4 °C-on 4 napig tartott tejjel kezelt sejteknél is (2b. ábra). Ez a tejminta (az 1. számú) (1. táblázat) 7 mg/ml zsírsavat tartalmazott és erősen antivirális hatása volt. Másrészt, a 4 napig 86 °C-on tárolt 1. tejminta (1. táblázat) semmiféle hatással nem volt a sejtmembránra (2a. ábra).

Az 1a-1c. ábrák mikroszkópos felvételei a linolsav hatását mutatják negatívan festett VSV részecskékre. Az elektronmikroszkópos felvételekhez használt minták titrálása 0,5 mg/ml linolsav esetén tízszeres virustiter-csökkenést mutat, míg 1 mg/ml koncentrációnál a csökkenés tízezerszeres. Hasonló eredmények kaphatók alacsony koncentrációban alkalmazott arachidonsavval történő inkubálás után

végzett negatív festésű VSV vírusoknál.

Ezután azt vizsgáltuk meg, vajon az antivirális zsírsavak hatása additív-e, tehát egy keverék egyik antivirális komponense koncentrációjának csökkenése kompenzálható-e egy másik zsírsav hozzáadásával vagy annak a koncentrációjának növelésével. Olyan zsírsavkeverékeket állítottunk össze, amelyekben az egyes zsírsavak koncentrációja akkora volt, amely vagy nem inaktiválja a vírust, vagy csak kevesebb, mint tízszeres csökkenést okoz a titerben. A zsírsavkeverékeket FTO-ban inkubáltuk a vírussal. Az eredményeket a 4. táblázatban foglaltuk össze. Az a tény, hogy lehetséges antivirális hatású keveréket összeállítani közepes hosszúságú és hosszú láncú zsírsavakból, azt jelzi, hogy a magas koncentrációban használt közepes hosszúságú zsírsavak in vivo potenciális toxikus hatása és az antivirális hatású hosszú láncú zsírsavak szérumalbumin vagy más plazmafehérjék által történő megkötéséből származó aktivitáscsökkenés között egyensúly állítható be.

Antivirális tejminták hatása a HIV-titerre

Anyatej- és csecsemőgyomor-tartalom-mintákat, amelyek HSV-1 és VSV ellen hatásosnak bizonyultak HIV (AIDS-vírus) ellen teszteltünk. Az eredményeket az 5. táblázat tartalmazza.

Mint a többi burokkal rendelkező vírus tesztelésénél, a HIV vírusokat ötszörösen hígítottuk sIgA-ra kimerített anyatejjel vagy gyomortartalommal. Ezért a hígítatlan minta



anti-HIV aktivitása nagyobb, mint a teszt-elegyen mért ezer-százezerszeres titercsökkenés. Az eredmények azt is mutatják, hogy a HIV ugyanannyira érzékeny a tej lipidjeinek inaktiváló hatásával szemben, mint a többi burokkal rendelkező vírus, amelyeket teszteltünk. Ezért lehetséges lenne nagyszámu lipidkeverék-mintát például HSV-1-gyel szemben tesztelni, ami sokkal olcsóbb, mint a HIV elleni tesztelés, majd azután csak az igéretes keverékeket kellene az AIDS-vírus ellen tesztelni.

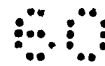
Egy antivirális monoglicerid hatása a CMV titerre

Monokaprint (10:1), amely előzőleg 2 mM koncentrációban a HSV-1 hatásos inaktivátorának bizonyult, három különböző CMV törzs ellen teszteltünk. A vírusokat 10 % foetális borjuszérumot tartalmazó fenntartó tápoldatban inkubáltuk. Az eredmények, melyeket a 6. táblázatban foglaltunk össze, arra utalnak, hogy a CMV, csakugy mint más burokkal rendelkező vírusok, mint a HSV-1 és a HIV, inaktiválható szérumszertartalmu tápoldatban.

HSV-1 inaktiválása monogliceridek által humán szérumban

HSV-1 virust közvetlenül humán szérumhoz adtunk és a vírus inaktiválását monokaprin (10:0), illetve monolaurin (12:0) jelenlétében inkubáltuk. Az eredmények a 7. táblázatban láthatók.

A monolaurin 4 mg/ml koncentrációban csak századrésziére csökkentette a HSV-1 titert, míg a monokaprin ugyanebben a



koncentrációban tizezerszeres titercsökkenést idézett elő. In vitro kísérleteinkben a monolaurin nagyobb antivirális aktivitást mutatott moláris koncentrációra vonatkoztatva, mint a monokaprin. A szérumban kapott eredmények azt sugallják, hogy a nem-specifikus kölcsönhatások, amelyek a szérumban fellépnek, valamint a plazma és más vértermékek legalább olyan fontosak, mint az eredendő antivirális aktivitás, annak meghatározásában, hogy mely monoglicerideket kell alkalmazni az emberi vér és vértermékek esetén a vírus-kórokozók inaktiválása céljából.

A HSV-1 monogliceridek által történő inaktiválása
csecsemőtápszerben

Ha monoglicerideket adunk egy másik összetett folyadékrendszerhez, a csecsemőtápszerhez (Enfamil), különbségeket figyelhetünk meg a HSV-1 elpusztításában, a szérumhoz hasonlóan. Amint a 8. táblázatban összefoglalt adatokból látható, a csecsemőtápszerben, csakugy, mint a humán szérumban, a monokaprin tűnik a leghatékonyabbnak a burokkal rendelkező vírusokkal szemben. A fenntartó tápoldatban a monolinolein ugyanolyan virustitercsökkenést okozott, mint a monokaprin, de harmadakkora koncentrációban (moláris koncentráció). A csecsemőtápszerben a monokaprin az alkalmazott koncentrációban több mint hatvanszor volt hatékonyabb, mint a monolinolein.



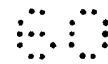
Monogliceridek hozzáadásának hatása az emberi vér
vörös- és fehérvérsejtjeire

3 mg/ml-es koncentrációban, amely előzőleg antivirálisnak bizonyult, monokaprint adtunk emberi teljes vérmintákhoz és az össz-vörösvérsejtszámot és az össz-fehérvérsejtszámot összehasonlítottuk az ugyanerre a mintára a lipid-hozzáadás előtt kapott értékekkel. A 9. táblázatban felsorolt adatok azt mutatják, hogy a monokaprin olyan koncentrációban, amely a burokkal rendelkező vírusokból $4,0 \log_{10}$ egyedet elpusztít, ha humán szérumhoz adjuk, a teljes vérben nem okozza sem a vörös-, sem a fehérvérsejtek lizisét.

Az anyatej és a tisztított monogliceridek antibakteriális hatása

A zsírsavak és a monogliceridek nemcsak antivirális, hanem antibakteriális hatással is rendelkeznek. Anyatejjel táplált csecsemők gyomorszondával nyert gyomortartalmát (amelyet Dr. William C. Heird-től, a Columbia Presbiteriánus Orvosi Központból kaptunk) antibakteriális hatás szempontjából *Staphylococcus epidermis* (Gram +), *Escherichia coli* (Gram -) és *Salmonella enteritidis* (Gram -) ellen teszteltük. Az eredmények a 10. táblázatban láthatók.

Az antivirális gyomortartalmak egyben antibakteriális hatásuk is voltak, egyaránt elpusztítva a Gram + és Gram - baktériumokat. Mivel az anyatej mind közepes, mind hosszú láncu zsírsavakat tartalmaz, ezután azt határoztuk meg, hogy a Gram + és Gram - baktériumok egyformán érzékenyek-e a kü-



lönböző lánchosszuságu zsirsavakra. Az eredményeket a 11. táblázat tartalmazza.

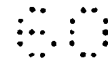
A Gram + baktériumokat összemérhetően inaktiválták a közepes láncu telített és a hosszú láncu telítetlen monogliceridek. Ugyanakkor, a Gram - baktériumok, az *E. coli* és a *S. enteritidis* esetében a hosszú láncu telítetlen zsirsavak és a monolaurin hatástalannak bizonyultak. A *H. influenza* virust azonban inaktiválta a monolaurin, tehát a különböző Gram - baktériumok eltérő érzékenységek lehetnek a monogliceridekkel szemben. A baktériumok inaktiválásában fellépő különbségek oka a baktériumok fala, membránja vagy mindkettő lehet. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk (nem közöltük) monolaurinnal kezelt *S. epidermidis*ről, amelyeken látható, hogy a baktériumok teljesen szétestek. Ezért lehetséges úgy manipulálni a különböző monogliceridekkel és koncentrációjukkal, hogy bizonyos membránokat szétroncsoljunk, másokat viszont érintetlenül hagyjunk.

Az anyatej nemcsak tárolás során, hanem a csecsemőgyomorban is antivirális hatásúvá válik az etetéstől számított egy órán belül. A tárolt tejben fellépő antivirális aktivitás a tejben található lipoprotein-lipázok szintjével van összefüggésben, arra utalva, hogy oka a lipid hidrolízis során felszabaduló zsirsavakban és más termékekben rejlik. Hasonló eredményekről számoltak be előzőleg Welsh és munká-



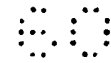
társai /I, II/. Az itt közölt adatok azt mutatják, hogy a tárolt anyatej antivibrális hatását a lipolízis okozza, az anyatejben leggyakrabban megtalálható kilenc zsírsav közül pedig hét igen aktívan pusztítja el a burokkal rendelkező vírusokat. Legaktívabbnak a többszörösen telítetlen hosszú láncú zsírsavak bizonyultak, de a közepes hosszúságú telített zsírsavak, különösen a laurinsav és a mirisztinsav szintén mutattak aktivitást. A monokaprin és a monolaurin a megfelelő szabad zsírsavaknál tiszter alacsonyabb koncentrációban mutatott aktivitást, míg a monomirisztin egyenletesen kevésbé aktívnak bizonyult. A hosszú láncú zsírsavak, amelyek az anyatejben található zsírsavak mintegy 30 %-át teszik ki, és a rövid láncú zsírsavak, amelyek elterjedtebbek a tehéntejben, nem, vagy csak alig voltak antivirális hatásúak. A zsírsavkoncentráció, amely tízezerszeres csökkenést okoz a virustiterekben *in vitro* (2. táblázat), az anyatejben található zsírsavkoncentrációk tartományába esik. Az eredmények arra utalnak, hogy amint a tej trigliceridjeinek lipolízise előrehalad, tárolás során vagy a gyomor-bél traktusban, az antivirális lipidek két fajtája, monogliceridek és szabad zsírsavak keletkeznek. Lehetséges, hogy a lipidek ezen két fajtája különböző hatékonysággal rendelkezik, a belekben található kórokozók ellen. Ez igaz lehet az egyes lipidosztályok tagjai esetében is.

Az eredmények hasonlóak a különböző vírusokkal korábban végzett tanulmányokéihoz és megerősítik a tejben található



legtöbb zsírsav antivirális hatását. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok azt mutatják, hogy az antivirális hatást elsősorban a vírusburok zsírsavak hatására bekövetkező szétesése okozza. Hasonló eredményekről számolnak be Sarkar és munkatársai, akik az anyatej tejszin-frakciójával egér emlődaganat vírusát kezelték és a vírusburok szétesését figyelték meg. A jelen tanulmány beszámol kulturában tartott sejtek plazmamembránjának széteséséről, zsírsavakat és tárolt tejet olyan koncentrációban alkalmazva, amelyek inaktiválják a burokkal rendelkező vírusokat. Az erősen antivirális hatásnak bizonyult zsírsavak és monogliceridek esetében azt találták, hogy sejtmembránok fuzióját idézik elő. Bár a pontos mechanizmus még nem tisztázott, a jelek arra utalnak, hogy a zsírsavak és monoészterek beépülnek a lipidmembránba és a kettős réteg destabilizálását okozzák. Egy hasonló mechanizmus a sejtmembrán és a vírusburok teljes széteséséhez vezethet. A jelen tanulmányban nem vizsgáltuk a sejtek és a burokkal rendelkező vírusok érzékenységét különböző zsírsavkoncentrációknál. Mindazonáltal, egy, hidrofób alkoholokat vizsgáló tanulmány azt mutatta, hogy a vírusok már olyan koncentrációknál elpusztulnak, amelyek látszólag semmiféle hatással nincsenek a tenyésztett sejtekre.

Számos tanulmány azt mutatta, hogy az anyatejjel táplált csecsemőknél sokkal kisebb a fertőzések, különösen a gastrointesztinális fertőzések előfordulási aránya, mint a mesterségesen táplált csecsemőknél. Mindazonáltal, az anya-



tej zsírsavainak és azok származékainak betegségmegelőző hatása még nem elfogadott tény, annak ellenére, hogy in vitro antimikrobiális hatásuk jól ismert. Bár a legtöbb gasztrointesztinális vírusnak nincs burka, a csecsemők nekrotizációs enterocolitisét egy burokkal rendelkező vírus, a humán bél-koronavírus okozza. A *Giardia lamblia*, egy belekben élősködő protozoa, amely gyermekeket fertőz meg, in vitro elpusztul az anyatej zsírsavainak hatására, jelezve a zsírsavaknak egy lehetséges anti-giardiális hatását a belekben. Mivel a zsírsavak a sejteket plazmamembránjuk szétroncsolásával pusztítják el, valószínű, hogy nemcsak a *Giardiát*, hanem más élősködő protozoákat is képesek elöltni. Habár néhány tanulmány az emberi és állati, tejfogyasztás utáni gyomortartalom antimikrobiális hatására utal, kiterjedtebb vizsgálatok szükségesek az aktív faktorok jellemzésére és szerepük tisztázására a gasztrointesztinális fertőzések megelőzésében és e fertőzésekkel való felgyógyulásban.

A találmány lényege, hogy a zsírsavak és azok monogliceridjei antivirális és/vagy antibakteriális hatással rendelkeznek. Az alkalmazott vegyületek a 4-22 szénatomig terjedő hosszúságú telített vagy telítetlen zsírsavak csoportjából, valamint az említett zsírsavak glicerinnel alkotott észterei közül választhatók. Előnyben részesített vegyületek a 6-14 szénatomos telített zsírsavak, valamint ezek monogliceridjei, és a 16-20 szénatomos egyszeresen és többszörösen telítetlen zsírsavak, valamint ezek monogliceridjei.



A zsírsavak és azok monogliceridjei könnyen hozzáférhetőek. Ha mégis szükséges, a kívánt monogliceridek előállíthatók a megfelelő zsírsav vagy zsírsavak glicerinnel történő észterezésével, az ismert módszerek szerint.

A fent leírt vegyületek antivirális és/vagy antibakteriális hatást mutatnak. A jelen találmány szerint vírus- vagy baktériumtartalmú közegek, mint például a vér zsírsavaknak és/vagy azok monogliceridjeinek hatásos mennyiségével kezelhetők. Szintén a találmány tárgyához tartozik, hogy vírussal vagy baktériummal fertőzött emberek vagy melegvérű állatok a találmány szerint előállított elegy alkalmazásával kezelhetők a fertőzés ellen.

Megelőzés célját szolgáló kezelésre a fent említett vegyületek közül egy vagy több alkalmazható ember vagy melegvérű állat esetében, orálisan, parenterálisan, intravénán, topikusan vagy rektálisan, szokványos gyógyszerkészítmény, azaz olyan készítmény hatóanyagaként, amely alapvetően egy közömbös gyógyszerhordozóból és a hatóanyag hatásos mennyiségéből áll, mint például a tableta, a drázsé, a kapszula, az ostya, a por, az oldat, a szuszpenzió, az emulzió, a végbélkup, a krém és hasonló. A jelen találmányban szereplő vegyületek ilyen alkalmazásra szolgáló hatásos mennyisége nagyságrendileg a kb. 0,001-4 mg/testtömegkg tartományba esik, kedvezőbben kb. a 0,01-3 mg/testtömegkg tartományba, naponta egy-négyszer alkalmazva.

Ha jelen találmányba szereplő vegyületeket megelőzési



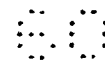
célokra használjuk, olyan közegekben, mint például a vér, különösen kémcsőben vagy más szokványos kórházi vagy orvosi edényt vagy fémeszközt alkalmazva, a vegyületeket célszerű töményebb dózisokban beadni. Ajánlatos a vegyületeket kb. 10 mikrogramm/ml-500 mikrogramm/ml vérkoncentrációban, kedvezőbben kb. 25 mg/ml-200 mg/ml vérkoncentrációban, legkedvezőbben kb. 75 mg/ml-100 mg/ml vérkoncentrációban alkalmazni.

1. táblázat

Szabad zsírsavak és a tejben^a mérhető antivirális aktivitás

Tejminta	Tárolási hőm./idő (°C/nap)	Szabad zsír- savak (mg/ml)	VSV-titer csökkenése (log ₁₀)	Lipoprotein lipáz (U/ml)
1.	-86/4	0,5	0	336
	23/4	12,0	4,0	
	4/4	7,0	4,0	
3.	-86/4	0,5	0	20
	23/4	2,0	0	
	4/4	2,0	0	

a = Ugyanezeket az eredményeket kaptuk a friss és a -86 °C-on tárolt tej esetében.



2. táblázat

Virusinaktiválás zsirsavakkal 37 °C-on 30 percig történő
inkubálás után

Zsirsav	Koncentráció ^a mg/ml-ben (mM-ban)	A virustiter csökkenése (log ₁₀)		
		VSV	HSV-1	VV ^b
vajsav(4:0) ^c	10(113)	0	N.A. ^d	N.A.
kapronsav(6:0)	10(86)	0	N.A.	N.A.
kaprilsav(8:0)	10(69)	1,8	N.A.	≥ 3,2
kaprinsav(10:0)	4(22)	≥ 4,0 ^e	≥ 4,0	≥ 3,2
laurinsav(12:0)	2(10)	≥ 4,0	≥ 4,0	≥ 3,2
mirisztinsav(14:0)	4(16)	≥ 4,0	≥ 4,0	1,7
palmitinsav(16:0)	20(78)	1,0	1,0	0,7
palmitolsav(16:1)	2(15)	≥ 4,0	≥ 4,0	≥ 3,2
sztearinsav(18:0)	20(70)	0	N.A.	N.A.
olajsav(18:1,cisz)	2(7)	≥ 4,0	≥ 4,0	≥ 3,2
elaidsav(18:1, transz)	2(7)	≥ 4,0	N.A.	N.A.
linolsav(18:2)	1(3,5)	≥ 4,0	≥ 4,0	≥ 3,2
linolénsav(18:3)	1(3,6)	≥ 4,0	≥ 4,0	≥ 3,2
arachidonsav(20:4)	0,5(1,6)	≥ 4,0	N.A.	N.A.

a = A zsirsav koncentrációja a 37 °C-on 30 percig inkubált
viruskeverékekben. Minden zsirsavat két koncentrációban
teszteltünk. Az itt szereplő vagy a legkisebb

koncentráció, amely $4,0 \log_{10}$ egységgel csökkentette a virustitert, vagy a legnagyobb vizsgált koncentráció (a vajsav, a kapronsav, a kaprilsav, a palmitinsav és a sztearinsav esetében)

b = VV = Visna virus

c = szénatomok száma: kettős kötések száma

d = N.A. = nincs adat

e = A kontrollvirus titere (\log_{10}), amelyet csak FT0-ban inkubáltunk, 5,5 volt, míg a zsirsav-virus keverék 10^{-2} - 10^{-5} higitásában nem volt kimutatható a vírus. Nem volt lehetséges ezeket a keverékeket kisebb higitásban (10^{-1} vagy higitatlan) tesztelni, mert toxikusak voltak a sejttenyészetekre. Feltéve, hogy a 10^{-1} higitásban volt fertőzőképes vírus, a zsirsav-virus keverék legmagasabb lehetséges titere $10^{1,5}$ SFD volt, és a virustiter csökkenése (\log_{10}) 4,0-gyel egyenlő ($5,5-1,5 = 4,0$). Ha a keverék titere kevesebb volt, mint $10^{1,5}$, a titercsökkenés nagyobb, mint 4,0.

3. táblázat

Virusinaktiválás monogliceridekkel 37 °C-on 30 percig
történt inkubálás után

Monoglicerid	Koncentráció ^a (mg/ml-ben, mM-ban)	Virustiter csökkenése	
		VSV	HSV-1
monokaprilin(8:0) ^b	2,0(9)	≥ 4,0	N.A. ^c
monokaprin(10:0)	0,5(2)	≥ 4,0	≥ 3,7
monolaurin(12:0)	0,25(0,9)	≥ 4,0	≥ 3,7
monomirisztin(14:0)	2,0(13)	3,0	N.A.
monoolein(18:1)	1,0(2,8 ^d)	2,3	N.A.
monolinolein(18:2)	0,25(0,7)	≥ 4,0	N.A.

a = A legkisebb koncentráció, amely 3,0 log₁₀-szeres csökkenést okoz a virustiterben.

b = szénatomok száma: kettős kötések száma

c = N.A. = nincs adat

d = A vizsgált koncentrációk (0,5-4 mg/ml) legmagasabb anti-virális aktivitása. Ugyanezt az eredményt kaptuk, ha a monogliceridet etanolban oldottuk és a virushoz való hozzáadása előtt higitottuk 1:100 arányban FTO-ban.



4. táblázat

Zsirsavkeverékek antivirális aktivitása

Zsirsav- keverék	Az egyes zsirsavak koncentr. (mg/ml)	Össz zsír- savkoncent- ráció (mg/ml)	A VSV titer csökkenése (log ₁₀)
kaprinsav	2	3	≥ 3,7
laurinsav	1		
laurinsav	1	2	≥ 3,7
mirisztinsav	1		
laurinsav	1	2	≥ 3,7
olajsav	1		
olajsav	1	1,5	≥ 3,7
linolsav	0,5		
laurinsav	0,7		
olajsav	0,7	1,7	≥ 3,7
linolsav	0,3		



5. táblázat

HIV inaktiválása antivirális anyatejjel

Minta	Tárolás	a HIV-titer csökkenése (log ₁₀)
1.	friss	0
1.	4 ⁰	5,0
2.	friss	0
2.	4 ⁰	5,0
3.	friss	0
3.	4 ⁰	3,5
4.	friss	0
4.	gyomortartalom (3 órás)	3,0

6. táblázat

CMV-inaktiválás tisztított lipidekkel

Tesztelt CMV törzs	A CMV-titer csökkenése (log ₁₀ SFD 50 %) ^x
AD 169	≥ 3,69
Espilat	≥ 3,50
Towne	≥ 2,67

SFD 50 % = 50 %-os sejtkultúra fertőző dózis

7. táblázat

HSV-1 inaktiválás humán szérumban

Hozzáadott monoglicerid ^x	A HSV-1 titer csökkenése (log ₁₀)
--------------------------------------	--

kontroll	0
monokaprin 1 mg/ml	0,8
monokaprin 2 mg/ml	1,8
monokaprin 4 mg/ml	≥ 4,0
monolaurin 1 mg/ml	0,8
monolaurin 2 mg/ml	1,5
monolaurin 4 mg/ml	2,0

x = Az inkubációs keverék humán szérumot, HSV-1-et
(titer: 5,5) és a jelzett monogliceridet tartal-
mazta.



8. táblázat

HSV-1 előlése csecsemőtápszerben

Hozzáadott monoglicerid ^x	A HSV-1 titer csökkenése (log ₁₀)
monokaprin 0,5 mg/ml	0
monokaprin 1 mg/ml	0,3
monokaprin 2 mg/ml	2,3
monolaurin 0,5 mg/ml	0,3
monolaurin 1 mg/ml	0,3
monolaurin 2 mg/ml	1,0
monoolein 0,5 mg/ml	0
monoolein 1 mg/ml	0
monoolein 2 mg/ml	0
monolinolein 0,5 mg/ml	0
monolinolein 1 mg/ml	0,3
monolinolein 2 mg/ml	0,5

x = Az inkubációs keverék csecsemőtápszert, HSV-1-et
(titer: 5,5) és a jelzett monogliceridet tartal-
mazta.



9. táblázat

Vérsejtek stabilitása a hozzáadott monogliceridekkel
szemben

Minta	Vörösvérsejtek ^x		Fehérvérsejtek ^x	
	kezeletlen	kezelt	kezeletlen	kezelt
1.	4,59	4,46	8,8	10,2
2.	5,10	4,78	6,9	7,7
3.	5,30	5,19	7,7	8,5
4.	4,94	4,74	6,3	7,4
5.	5,08	4,36	10,3	11,1

x = egység - $10^3/\text{mm}^3$ x = egység - $10^6/\text{mm}^3$



10. táblázat

Anyatej-gyomortartalom antivirális és antibakteriális
aktivitása^x

Minta	log ₁₀ csökkenés a HSV-1-titerben 1 órás humán gyomor- tartalomban	log ₁₀ csökkenés a bakteriális titerben 1 órás humán gyomor- tartalomban ^{xx} S. epider- midis	E. coli	S. enteri- tidis
-------	--	--	---------	---------------------

1.	≥ 4,0		≥ 5,0	
2.	≥ 4,0	≥ 5,0	≥ 4,0	≥ 4,0
3.	≥ 4,0	≥ 4,0		
4.	≥ 4,0			

x = Maga az elfogyasztott tej antivirális és antibakteriális
hatásra vizsgálva nem mutatott aktivitást.

xx = Valamennyi mintát nem teszteltük ismét valamennyi bak-
tériumtörzsre, mert a gyomortartalom nem volt elegendő
mennyiségű.

11. táblázat

Gram + és Gram - baktériumok inaktiválása monogliceridekkel

Monoglicerid ¹	A baktériumkoncentráció csökkenése				
	E. coli ²	S. enteritidis ²	H. influenzae ^{2,3}	S. epidermidis ⁴	B csoport streptococcus ⁴
monokapriolil					
(8:0)	≥ 5,0	-	≥ 8,0	≥ 4,0	-
monokaprin					
(10:0)	≥ 5,0	-	≥ 8,0	≥ 4,0	4,5
monolaurin					
(12:0)	0	0	≥ 8,0	≥ 4,0	4,5
monoolein					
(18:1)	0	0	-	≥ 4,0	-
monolinolein					
(18:2)	-	-	-	-	4,5
monoeikozenoin					
(20:1)	0	0	-	≥ 4,0	-

1 = minden monogliceridet 2 mg/ml-ben alkalmaztunk,

2 = Gram -,

3 = Hemophilus influenzae,

4 = Gram +.



Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás antivirális és/vagy antibakteriális gyógyszerkészítmény előállítására, azzal j e l l e m e z v e , hogy inert gyógyszerhordozókat, egy vagy több zsírsavat és ezek monogliceridjeit hatásos mennyiségben összekeverjük.

2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal j e l l e m e z v e , hogy 1-6 ilyen vegyületet keverünk össze.

3. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal j e l l e m e z v e , hogy 1-4 ilyen vegyületet keverünk össze.

4. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal j e l l e m e z v e , hogy zsírsavként 6-14 szénatomos telített zsírsavat alkalmazunk.

5. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal j e l l e m e z v e , hogy zsírsavként 16-20 szénatomos egyszere- sen vagy többszörösen telítetlen zsírsavat használunk.

6. Eljárás emberben vagy melegvérű állatban fellépő vagy fennálló vírusos vagy bakteriális fertőzés megelőzésére vagy kezelésére, azzal j e l l e m e z v e , hogy az említett egyedek a zsírsavak és azok monogliceridjei közül választott egy vagy több vegyület hatásos antivirális vagy antibakteriális mennyiségét orálisan, parenterálisan, intra- vénásan vagy rektálisan adagolva kapják.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e , hogy zsírsavként 6-14 szénatomos telített zsír- savat használunk.

8. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e - m e z v e , hogy zsirsavként 16-20 szénatomos egyszeresen vagy többszörösen telítetlen zsirsavat használunk.

9. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e - m e z v e , hogy a vírusfertőzés AIDS virussal történt.

10. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e - m e z v e , hogy a vírusfertőzés herpes virussal történt.

11. Eljárás vérben kialakuló vagy fennálló vírusos vagy bakteriális aktivitás megelőzésére vagy kezelésére, azzal j e l l e m e z v e , hogy az említett vért a zsirsavakból és azok monogliceridjeiből álló csoportból választott egy vagy több vegyület hatékony antivirális vagy antibakteriális mennyiségével hozzuk érintkezésbe.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e - m e z v e , hogy zsirsavként 6-14 szénatomos telített zsirsavat használunk.

13. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e - m e z v e , hogy zsirsavként 16-20 szénatomos egyszeresen vagy többszörösen telítetlen zsirsavat használunk.

14. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e - m e z v e , hogy a vírus az AIDS vírus.

15. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e - m e z v e , hogy a vírus a herpes vírus.

16. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e -
m e z v e , hogy a vér kémcsövekben van.

A meghatalmazott:

„DANUBIA” SZABADALMI ÉS VÉDELMI IRODA

28.

szé melkine

Cherzanos Melinda