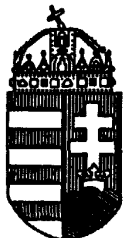


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

203 373 B

(21) A bejelentés száma: 94/90
(22) A bejelentés napja: 1990.01.10.
(30) Elsőbbségi adatok:
295 856 1989.01.11. US

(51) Int. Cl.⁵

C 08 B 37/10

A 61 K 31/70

(40) A közzététel napja: 1990.09.28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1991.07.29. SZKV 91/07

(72) Feltalálók:

Cardin, Alan Douglas, Cincinnati, Ohio (US)
Jackson, Richard Lee, Cincinnati, Ohio (US)

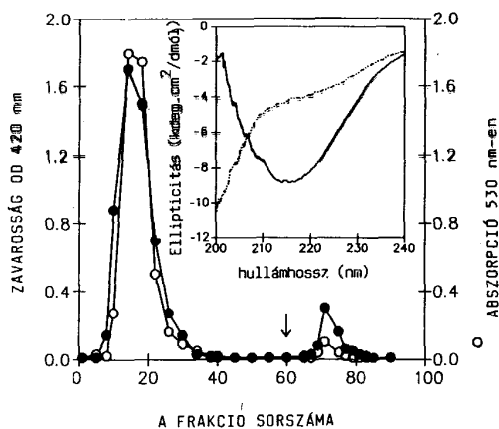
(73) Szabadalmaz:

Merrell Dow Pharmaceuticals Inc., Cincinnati,
Ohio (US)

(54) **Eljárás HIV-ellenes aktivitással rendelkező heparin előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány szerinti eljárás során HIV-ellenes aktivitású heparint állítanak elő oly módon, hogy a nyers heparint affinitás kromatográfiának vetik alá gyantához kötött (I) képletű peptid (RP135) alkalmazásával.



1. ábra

A leírás terjedelme: 9 oldal, 5 rajz

HU 203 373 B

A találmány HIV-ellenes hatással rendelkező heparin frakció elkülönítésére és ebből a HIV-ellenes aktivitású heparin előállítására vonatkozik. Az így kapott heparin humán immunelégtelenséget okozó vírus elleni aktivitással rendelkezik, így az AIDS kezelésére alkalmazható.

Jelenleg nagyvolumenű kutatás folyik a vírushatások emberben és állatban való kezelésére és gyógyítására irányuló módszerek kidolgozására. Az AIDS és az ARC gyakorisága emberben ugyanis riasztó sebességgel nő. Az AIDS-betegek esetében fennálló 5 éves túlélési arány lehangoló, ezenkívül az AIDS-betegek, akiknek immunrendszerét a fertőzés komolyan károsította, számos esetleges fertőzésben szenvednek, amilyen a Kaposi-szarkóma és a *Pneumocystis carinii* által okozott pneumonia. Az AIDS gyógyítására nem áll rendelkezésre eljárás, a jelenleg alkalmazott kezelési módszerek pedig többnyire nem rendelkeznek megfelelő bizonyítékkal a hatékonyságot illetően és számos nem kívánt mellékhatással járnak. A betegségtől való félelem társadalmi méretű elutasítást és diszkriminációt eredményez azok iránt, akik betegek vagy feltehetően ebben a betegségben szenvednek.

A retrovírusok az RNS (ribonukleinsav) vírusok egyik osztályát alkotják, amelyek reverz transzkriptáz segítségével replikálódnak. Ennek során egy komplex DNS (cDNS) szál képződik és erről állítja elő a vírus a kétszálas provirális DNS-t. Ez a provirális DNS statisztikus eloszlásban épül be a gazdasejt kromoszóma-DNS-ébe. Így válik lehetővé a vírus replikációja, a vírus genomot tartalmazó integrált DNS további transzlációja révén.

Az ismert retrovírusok között számos olyan található, amely onkogén vagy tumorkeltő. Az első két felfedezett humán retrovírusról – ezeket „humán T-sejt leukémia vírus I”-nek vagy HTLV-I-nek és HTLV-II-nek nevezték el – ténylegesen megállapították, hogy a T-limfociták megfertőzése után szörványosan leukémiát okoznak emberben.

A harmadik ilyen felfedezett humán vírusról – a HTLV-III-ról, amelyet újabban HIV-nek neveznek – azt találták, hogy a T-limfociták megfertőzése után sejtpusztulást okoz. Ezt a vírust úgy azonosították, mint a szerzett immun-elégtelenségi szindróma (AIDS) és az AIDS-szel összefüggő komplex (ARC) kórokozóját.

A HIV burok-fehérjéje egy 160 kDa molekulatömegű glikoprotein. Proteázzal ez a fehérje egy 120 kDa molekulatömegű külső fehérjére – gp 120 – és egy transzmembrán glikoproteinre – gp 41 – bontható fel. A gp 120 jelű fehérje tartalmazza azt az aminosav-szekvenciát, amely felismeri a receptort a CD 4-pozitív humán T-sejtekben.

Újabb irodalmi közlemények szerint egyes poliszulfatált poliszacharidok, mint a dextránszulfát, a tengeri algák karrageninjei, a pentozán-poliszulfát és a heparin a HIV-1 replikáció specifikus in vitro inhibitorai; ld. a következő helyeket:

- M. Ito et al., *Antiviral Res.* 7, p. 361–367, 1987;
- Baba et al., *Antiviral Res.* 9, p. 335–343, 1988;
- O. Yoshida, *Biochem. Pharmacol.* 37, p. 2887–2981, 1988;
- R. Ueno és S. Kuno, *Lancet* 1, p. 1379, 1987.

Ennek az aktivitásnak a mechanizmusát Baba et al. vizsgálták (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, p. 6132–6136, 1988).

További újabb közlemények arra mutatnak, hogy a gp 120 307-330 és 303-321 aminosav-maradékának megfelelő szintetikus peptidok antiszérumai gátolják a HIV által indukált szincitium-képződést:

- 5 – Rusche et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, p. 2898–3202, 1988 és
- Falcker et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, p. 1932–1936, 1988.

A HIV gp 120-ban a 303-330 maradékokhoz való antitestkötődés nyilvánvalóan a vírusnak a CD 4 receptorhoz való kötődését és a plazma-membránnal való egyesülést befolyásolja.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a heparinból, mely egy szulfatált poliszacharid „HIV-ellenes heparinnak” nevezett frakció állítható elő oly módon, hogy a heparint hozzákapcsoljuk egy peptidhez, amely a HIV gp 120 protein 301-324 maradékának felel meg. Megállapítottuk, hogy a HIV-ellenes heparin aktivitása szignifikánsan magasabb – a nem frakcionált szulfatált poliszacharidéhoz képest – a szincitium-képződés és a P24 mag-vírusantigén képződése, ill. megjelenése gátlása vonatkozásában HIV-fertőzött CD 4 sejteket tartalmazó táptalajban és lényegesen csökkenti a HIV fertőzőképességét. A találmány szerinti eljárással előállított HIV-ellenes heparin az AIDS és az ARC kezelésében használható.

A gp 120 peptid-fragmentumot a szokásos affinitáskromatográfiás eljárás keretében alkalmazzuk a HIV-ellenes heparin frakció elkülönítésére.

A találmány tárgya tehát a következőkben foglalható össze: a nyers heparint affinitáskromatográfiának vetjük alá egy gyantához kötött (I) képlettel

NNTRKSIRIQRGPGRAFVITGKIG (I)

35 peptid (RP135) alkalmazásával.

Az a szulfatált poliszacharid frakció, amely a gyantához kapcsolt RP135 peptidhez kötődik, felhasználható a szincitium-képződés megelőzésére HIV-vel fertőzött CD 4⁺ sejtekben és csökkenti a HIV fertőzőképességét.

40 Az ábrák magyarázata a következő.

1. ábra. Kereskedelmi heparin készítmény (163 µg/mg, USP) frakcionálása RP135-AffiGel-10-en.

200 mg (száraz tömeg) kereskedelmi minőségű heparint (HEPAR Industries) viszünk fel egy peptid-oszlop (ágytérfogat 1 × 10 cm), amelyet 10 mM Hepes pufferrel (pH 7,4; 0,05 M NaCl) hoztunk egyensúlyba.

45 Az oszlopot intenzíven mossuk a meg nem kötött vagy nem reakcióképes heparin (URH) eltávolítására. 1 ml-es frakciókat szedünk.

50 Az oszlopot ezután a kiegyensúlyozáshoz használt, 1 M NaCl-t tartalmazó pufferrel eluáljuk (nyíl) az RP135-höz kötött magas reakcióképességű heparin (HRH) előállítására.

A heparint turbiditásméréssel mutatjuk ki, a protamin-szulfát vizsgálat (kitöltött kör) segítségével (M. W. C. Hutton et al., *Thromb. Res.* 13, p. 655–657, 1978). A vizsgálat menete röviden a következő:

55 A különböző frakciókból 10 µl-t összekeverünk 100 µl, 1 mg/ml töménységű vizes protamin-szulfát oldattal, majd a mintához hozzáadunk 240 µl puffert, amelyet az oszlop kiegyensúlyozásához használtunk. Az 1 M NaCl-t tartalmazó pufferrel eluált frakciók vizsgálatához 100 µl mintát 250 µl, 1 mg/ml töménységű protamin-szulfát oldattal keverünk össze. A zavarosság 60 got 420 nm-en mérjük.

Az uronsavat (0) a karbazol-reakcióval határozzuk meg (T. Bitter et al., Anal. Biochem. 4, p. 330, 1967).

Betét-ábra: A HRH (frakcionált heparin) hatása az RP135 távoli UV-ban észlelhető cirkuláris dikroizmusára (CD).

Az RP135 CD értékét (100 µg/ml töménységben) 60 µg/ml HRH távollétében (—) és jelenlétében (—) mérjük 10 mM pH 7,4 Hepes pufferben, amely 0,05 M NaCl-t tartalmaz. A heparin kifejezett minimumot indukál 225 nm-en; ez annak tulajdonítható, hogy a peptid-konformációban változás következik be. Maga a heparin elhanyagolható mértékben befolyásolja a CD-t.

2. ábra. JM-sejtek HIV-1 fertőzésének dózistól függő gátlása HRH-val (kitöltött kör), URH₅-tel (0) és 500,000 molekulatömegű dextrán-szulfáttal (négyzet).

A meghatározás alapján

A) a vírus által indukált szincitium-képződés és
B) a fermentálé felülúszójában a P24 virion mag-antigén-jének koncentrációja szolgál.

A GB8 törzs vírusanyagát – amelyet akut módon fertőzött JM sejtek sejtmentes táptalajából nyertünk ki – olyan táptalajjal (RPMI 1640, 10% borjúembrió-szérum) hígítjuk, amely a vizsgálandó vegyületet különböző koncentrációkban tartalmazza. 15 percen át szobahőmérsékleten való állás után sejteket adagolunk és ezen a hőmérsékleten végezzük a vírus-adszorpciót, 2 órán át. Így a fertőzést megsokszorozzuk; a fertőzés multiplicitása (MOI) 0,001 szincitium-képző egység/sejt.

A fertőzött sejtekből pelleteket képzünk és ezeket háromszor mossuk foszfátpufferes sóoldattal, reszuspendáljuk friss táptalajban (amely megfelelő koncentrációkban tartalmazza a vizsgálandó vegyületeket) és szétosztjuk egy 24 helyes szövettenyésztő lemez üreibe. 3 napi inkubálás után –37 °C-on Olympus CK2 inverz mikroszkóp felhasználásával 4 párhuzamos számlálással meghatározzuk a szincitiumok számát.

Ugyanekkor mintát veszünk a tenyészlé felülúszójából és ezt centrifugálással (200 ford./perc 5 percen át) derítjük. 0,1% Triton X-100-zal való kezelés után az „Abbott core antigen” Elisa-teszttel meghatározzuk a P24 antigén szintjét. Dózis-válasz görbékét veszünk fel a gyógyszerkoncentráció log₁₀ értékével szemben és lineáris regressziós elemzés után mindkét teszt alapján kiszámítjuk az 50%-os tényleges dózist (ED₅₀).

3. ábra. A HIV-1 GB8 törzsével fertőzött JM sejtekről készült mikrofényképek; a sejteket 10 µg/ml HRH jelenlétében (B) vagy távollétében (A) inkubáljuk, 3 napon át.

A módszerek tekintetében a 2. ábrára hivatkozunk.

A fenti periódus után az indukált szincitiumok száma lineáris marad, ill. a hígulás észlelhető (az ábrán ez nem látható). A HRH 10 µg/ml koncentrációban teljes védelmet nyújt és a sejtek nem különböztethetők meg a kontrollsejtektől, amelyeket nem fertőztünk meg (ezeket az ábra nem mutatja).

A fényképeket Olympus P7-10AK automatikus exponálási rendszer segítségével vettük fel. A végső nagytűzés a főábra esetében 200-szoros, míg a betétábra esetében 550-szeres.

4. ábra. A HRH, URH₅ és egy másik szulfatált poliszacharid a dextrán-szulfát (500,000) relatív hatékonysága 10 µg/ml (árnyékolt) és 1 µg/ml (sraffolt) koncentrációban.

A mérésekhez különböző HIV-törzseket veszünk.

A P24 antigén szinteket a következő tenyészetek felülúszó folyadékában mérjük:

- (A) a GB8 törzsszel fertőzött JM-sejtek,
(B) az RP törzsszel fertőzött C8166 sejtek és
(C) a HTLV-IIIb törzsszel fertőzött C8166 sejtek.

A módszerek megegyeznek a 2. példával kapcsolatban bemutatottakkal, azzal a különbséggel, hogy a HTLV-IIIb-vel fertőzött sejtekből a fertőzés után 4 nappal veszünk mintát.

A fertőzés MOI értékét 0,01–0,001 fertőző egység/sejt intervallumban lévőnek határoztuk meg a végponti szincitiumszámot megadó módszerrel. A HRH fokozott vírusellenes hatása valamennyi esetben nyilvánvaló az URH₅-tel vagy a dextrán-szulfáttal szemben.

A találmányt részletesen a következőkben írjuk le.

A heparin egy egyenesláncú poliszulfatált mukopoliszacharidokat tartalmazó heterogén vegyületcsoport, amelynek átlagos molekulatömege 15,000 dalton. A heparin biológiai és gyógyászati szempontból antikoaguláns aktivitása miatt jelentős szerepet játszik. A kereskedelmi heparint szarvasmarha-tüdőből vagy sertésbél-nyálkahártyából állítják elő és ez különböző cukrok polimerjeiből áll, amelynek a következők:

- elsősorban az alfa-L-iduronsav-2-szulfát,
- 2-dezoxi-2-szulfamino-alfa-D-glükóz-6-szulfát,
- beta-D-glukuronsav,
- 2-acetamido-2-dezoxi-alfa-D-glükóz és
- alfa-L-iduronsav.

A cukrok glikozid-kötésekkel kapcsolódnak össze és az egyes cukrok változó mennyiségben vannak jelen.

A találmány szerinti eljárásban bármilyen, a kereskedelembe kapható heparin felhasználható.

A szóbanforgó eljárásban alkalmazott szulfatált poliszacharid semleges vagy só (pl. nátrium-, kalcium- vagy kálium-só) alakban fordulhat elő.

A találmány szerinti eljárással előállított HIV-ellenes szulfatált poliszacharid a teljes heparinnak azt a részét vagy frakcióját jelenti, amely a gyantához kötött (I) képletű RP135 peptidhez affinitást mutat.

Feltételezhető, hogy hasonló eredmények érhetők el más, az RP135-höz hasonló peptidok alkalmazásával is. Az alábbi táblázatban feltüntetünk bizonyos ismert varianciákat más HIV-izolátumok RP135 tartományában (A. D. Cardin és H. J. R. Weintraub, Arteriosclerosis, 9, p. 21–32, 1989).

Az (I) általános képletben és a táblázatban lévő rövidítések jelentése a következő:

Aminosav	3-betűs rövidítés	1-betűs rövidítés
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Aszparagin	Asn	N
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsav	Glu	E
Glicin	Gly	G
Histidin	His	H
Izoleucin	Ile	I
Lizin	Lys	K
Fenilalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Szerin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Tirozin	Tyr	Y

Aminosav	3-betűs rövidítés	1-betűs rövidítés
Valin	Val	V
(Asn+Asp)	Asx	B
(Gln+Glu)	Glx	Z

Az (I) képletű RP135 peptid kovalensen kötődik, a szokott módon eljárva, egy kromatográfiás gyantához. A gyantához kötött RP135 peptidet pedig a szokásos

módon használjuk fel, affinitáskromatográfiával, a HIV-ellenes heparin elkülönítésére. Ezzel kapcsolatban pl. a következő közismert művekre hivatkozunk:
 – C. R. Lowe és P. G. D. Dean: Affinity Chromatography, J. Wiley and Sons, Inc., New York, 1974 és
 – W. H. Southern: Affinity Chromatography, J. Wiley and Sons, Inc., New York, 1981.

HIV izolátum

RP135 szekvencia variáns

III _B (BH10)	N	N	T	R	K	S	I	R	I	Q	R	G	P	G	R	A	F	V	T	I	G	K	I	G
III _B (BH8)	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RF	-	-	-	-	-	S	-	-	T	K	-	-	-	-	-	V	I	Y	A	T	-	Q	I	-
MN	Y	-	K	-	-	-	-	H	I	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	T	K	N	I	-	-
SC	-	-	-	T	R	S	-	H	I	-	-	-	-	-	-	-	Y	A	T	-	D	I	-	-
WMJ-2	-	-	V	-	R	S	-	L	S	I	-	-	-	-	-	-	R	-	R	E	I	-	-	-
LAV-MAL	-	-	-	-	R	G	-	H	F	-	-	-	-	-	Q	-	L	Y	-	T	-	I	V	-
SF-2	-	-	-	-	-	S	-	Y	I	-	-	-	-	-	-	-	H	-	T	-	R	I	-	-
NY5	-	-	-	K	-	G	-	A	I	-	-	-	-	-	-	T	L	Y	A	R	E	-	I	-
Z3	SDKKI	-	Q	S	-	-	-	R	I	-	-	-	-	-	K	V	-	Y	A	K	-	G	I	T

A gyantának oldhatatlannak kell lennie az alkalmazott oldószerekben és pufferekben; mechanikusan és kémiaiilag stabilnak kell lennie; jó áramlási tulajdonságokkal kell rendelkeznie; könnyen kapcsolhatóan kell lennie az (I) képletű peptidhez; és nagy felülettel kell rendelkeznie, amely hozzáférhető az abszorbeálandó szubsztát számára. A megfelelő gyantákra példák a következők:

- agaróz, üveg, cellulóz stb. és
- kétkomponensű keverékek vagy kémiaiilag módosított mátrixok, pl. agarózzal bevont poliakrilamid, poliakril-gyantával bevont vas-részecskék, glicidoxi-gyantával bevont üveg stb.

Vízoldhatatlan gyanták pl. azok, amelyek hidroxil-, amino- vagy karboxil-csoportokat vagy halogénatomokat tartalmaznak.

A hidroxil-csoportot tartalmazó vízoldhatatlan gyantákra példák a következők:

- poliszacharidok (pl. cellulóz, agaróz, térfalós dextrán stb.),
- hidroxil-alkil-polisztirol-gyanták (pl. hidroxil-alkilezett stírol-divinil-benzol kopolimer stb.),
- polivinil-alkoholok stb.

Az amino-csoportot tartalmazó vízoldhatatlan gyantákra példák a következők:

- amino-alkil-poliszacharidok (pl. amino-alkil-cellulóz, így amino-etil-cellulóz vagy amino-hexil-cellulóz; amino-alkil-agaróz, így amino-hexil-agaróz stb.),
- p-amino-benzil-poliszacharidok (pl. p-amino-benzil-cellulóz, p-amino-benzil-agaróz stb.),
- kitozán,
- amino-alkil-polisztirol gyanták (pl. amino-alkilezett stírol-divinil-benzol-kopolimer),
- poliakril-amidok és amino-alkil-poliakril-amidok (pl. amino-etil-poliakrilamid stb.) és
- porózus amino-alkil-üvegek (pl. porózus amino-propil-üveg stb.).

Példák a karboxil-csoportot tartalmazó vízoldhatatlan gyantákra a következők:

- 30 – karboxi-alkil-poliszacharidok (pl. karboxi-alkil-agaróz, így karboxi-hexil-agaróz vagy karboxi-pentil-agaróz; karboxi-alkil-cellulóz, így karboxi-metil-cellulóz, karboxi-alkil-térfalós dextrán, így karboxi-metil-térfalós dextrán stb.),

- 35 – karboxi-alkil-poliakril-amidok (pl. karboxi-metil-poliakril-amid stb.) és
- karbonsav-gyanták (pl. akrilsav-divinil-benzol kopolimer stb.).

Példák a halogénatomot tartalmazó vízoldhatatlan gyantákra a következők:

- 40 – halogén-alkil-polistírol-gyanták (pl. klórmetilézett stírol-divinil-benzol kopolimer).

Ha halogén-alkil-polistírolt alkalmazunk, ez kívánt esetben egy aktívabb alakká alakítható át. Egy halogén-alkil-polistírol gyanta pl. dialkil-szulfiddal végzett reagáltatással dialkil-tio-alkil-polistírol gyantává alakítható át, amelynek aktivitása magasabb a halogén-alkil-polistírol gyantáénál.

Ha a gyanta egy hidroxil-csoportot tartalmaz, aktiválható pl. a következőkkel:

- 50 – cianogén halogéniddel (pl. brómcian),
- monoepoxiddal (pl. epiklór-hidrin),
- bioxiránnal (pl. 1,4-bisz(2,3-epoxi-propoxi)-bután),
- halogén-acetil-halogéniddel (pl. klór-acetil-klorid),
- 55 majd a kapott aktivált gyantát az (I) képletű peptiddel reagáltatjuk, vagy az (I) képletű peptidben jelenlévő szerint vagy treonin maradék szabad hidroxil-csoportjával reagáltatjuk.

Ha a gyantában egy amino-csoport van jelen, a következőképpen aktiválható:

- 60 (1) egy alifás dialdehiddel (pl. glutár-aldehiddel); az aktivált gyantát ezután az (I) képletű peptiddel reagáltatjuk, majd a kapott Schiff-bázist egy redukálószerrel (pl. nátrium-bórhidriddel) redukáljuk, vagy

65

- halogéniánnal (pl. brómcíánnal); az aktivált gyantát ezután reagáltatjuk az (I) képletű peptiddel, vagy
- (3) egy mono-epoxiddal vagy egy bisz(epoxiddal), majd a kapott aktivált gyanta reagáltatható az (I) képletű peptiddel, vagy
- (4) diazotálással, majd a gyantát az (I) képletű peptiddel reagáltatjuk.

Ha a gyanta karboxil-csoportot tartalmaz, közvetlenül reagáltatható az (I) képletű peptiddel, savamid képződése közben vagy a szabad karboxil-csoport karbodiimiddal reagáltatva egy primer aminhoz kapcsolható.

Ha a gyanta egy halogénatomot tartalmaz, közvetlenül reagáltatható az (I) képletű peptiddel; ennek során a halogénatomot egy szabad amino-, karboxil- vagy hidroxil-csoport kiszorítja a gyantából.

A találmány szerinti eljárás végrehajtásában felhasználható gyanták közé tartozik számos, a kereskedelemben hozzáférhető, származékképzéssel átalakított gyanta, amely egyszerűen alkalmazható, a leírásban ismertetett technikák szerint vagy a szakember számára egyébként önmagukban ismert eljárások szerint, a találmány tárgyát képező eljárással kinyerhető, gyantához kötött peptidek előállítására.

Az említett mátrixokra példák a következők: Speharose[®] (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Svédország); Affi-Gel[®] 202, Affi-Gel-10 és -11 (Bio-Rad Inc., AEA), Eupergit (Röhm Pharma, Weiterstadt, NSZK) stb.

Ezek a funkcionális származékok képesek arra, hogy közvetlenül kötődjenek az (I) képletű peptidhez.

Egy, a találmány szerinti, gyantához kötött peptidben a peptid mennyisége kb. előnyösen kb. 2–300 µmol/l g (a gyantához kötött peptid nedves alakja esetében), de lehet ennél kevesebb vagy több, a kapcsolás határfokától függően. A "nedves alak" kifejezés a gyantához kötött peptid nedves tömegére utal, amint azt a vizes szuszpenzió szűrése után mérjük.

A frakcionálандó heparin oldat pH értéke előnyösen kb. 7–8,5. A 7-nél alacsonyabb pH-jú heparin oldatok azonban ugyancsak alkalmazhatók, legalábbis egyes esetekben, pl. epoxidok alkalmazása esetén, vagy ha a kötéseket vízdíázható, karbodiimid gyantával való reagáltatással alakítjuk ki. Ha a heparin-oldatot a gyantához kötött peptiddel frakcionáljuk, alkalmazhatunk folyamatos eljárást (pl. oszlopot) vagy szakaszos eljárást, amikor a gyantához kötött peptidet „sarzsokban” használjuk fel.

Ha pl. oszlopot alkalmazunk, úgy járunk el, hogy a gyantához kötött peptidet betöltjük az oszlopba, majd etanol-amin tartalmú oldattal mossuk a főlösléges vagy maradék gyanta (a peptidhez nem kötött funkció csoportok) blokkolására. Ezt követően vizes mosást végzünk a sók eltávolítására, és puffer-oldatot adagolunk az oszlop kiegyensúlyozására, a heparin vagy más szulfatált poliszacharid peptidhez való kötése szempontjából optimális körülmények között. A heparint vagy más szulfatált poliszacharidot tartalmazó oldatot átvezetjük az oszlopon és a rendszert a fent említett puffer-oldattal öblítjük át. Végül az adszorbeált heparint vagy más szulfatált poliszacharid frakciót eluálással eltávolítjuk a gyantáról. Ez pl. növekvő só-grádienssel történhet. Az így kapott szulfatált poliszacharid frakció tisztított alakban van jelen és lényegében mentes sok eredeti szennyezéstől.

Ha viszont a szakaszos eljárás szerint járunk el, a

heparint tartalmazó oldatot hozzáadjuk az adszorbenst tartalmazó szuszpenzióhoz. A kapott keverék pH-ját 2,5–8,5 közé (előnyösen 6,5–8,5-re) állítjuk be és keveretjük, a szulfatált poliszacharidoknak az adszorbensre való szelektív adszorbeáltságára. A szulfatált poliszacharidokat hordozó adszorbenst kinyerjük, mossuk, majd a szulfatált poliszacharidot tiszta formában kinyerjük. A poliszacharidot a gyantáról egy magas sókoncentrációjú pufferrel – amilyen pl. a 0,2–1,0 M NaCl-oldat – választjuk le, vagy 10-nél magasabb – előnyösen 10–11,5 közötti – pH beállításával, vagy a pH csökkentésével.

Az egymással érintkezésbe hozott szulfatált poliszacharid-tartalmú oldat és az adszorbens aránya különböző paraméterektől függ, amilyenek a következők:

- az oldatban levő szulfatált poliszacharid összmenyisége,
- az alkalmazott konkrét adszorbens,
- a kiválasztott munkafeltételek, különösen a szulfatált poliszacharid oldat koncentrációja és
- a szennyezések minősége és mennyisége.

Ezek az intervallumot meghatározó műveletek azonban a szakember tevékenységi körébe tartoznak, a leírásban ismertetettek alapján.

A HIV-ellenes szulfatált poliszacharid a szincitiumképződés megakadályozására használható fel a HIV-1 vírussal vagy más hasonló – gp120 felületi fehérjét tartalmazó – vírussal fertőzött sejtekben. A HIV-ellenes szulfatált poliszacharidok felhasználhatók az AIDS, az ARC és más betegségek kezelésére, amelyeket a HIV-1 retrovírus vagy más hasonló, gp120 felületi fehérjével rendelkező vírus okoz.

A szincitiumképződésének a HIV-vel fertőzött sejtekben való megakadályozására szükséges mennyiség, amelyet a HIV-ellenes szulfatált poliszacharidból veszünk, bármilyen hatásos mennyiség lehet. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a HIV-ellenes szulfatált poliszacharid 10 µg/ml koncentrációban alkalmazva a szincitiumképződés teljes gátlását eredményezi, ezen kívül a P24 antigén szintjét (ez a vírus-replikáció indikátora) $3,0 \times 10^2$ alá csökkenti.

Az AIDS, ARC vagy más, a HIV-fertőzés által okozott betegség kezelésére bevitt HIV-ellenes szulfatált poliszacharid-mennyiség tág határok között változhat az alkalmazott konkrét dóziségség, a kezelés időtartama, a kezelendő beteg kora és neme, a kezelt betegség minősége és előrehaladottsága és más tényezők függvényében, amelyek a vonatkozó szakterületek szakemberei számára ismertek.

A HIV-ellenes szulfatált poliszacharid ezen kívül alkalmazható más szerekkel együtt is, amelyekről ismert, hogy felhasználhatók a retrovirális betegségek kezelésére, ill. a retrovírusok által okozott betegségekkel, állapotokkal összefüggő komplikációk és tünetek kezelésére.

A HIV-ellenes szulfatált poliszacharidnak a HIV ellen hatásos mennyisége, amelyet be kell adagolnunk, általában a kb. 15 mg/kg – 500 mg/kg tartományba esik. Egy egységsdózis 25–500 mg szulfatált poliszacharidot tartalmazhat és naponta egy vagy több alkalommal vehető be. A HIV-ellenes szulfatált poliszacharid egy gyógyászati szempontból elfogadható vívőanyaggal együtt adagolható be, a szokásos adagolási formák alkalmazásával, orálisan vagy parenterálisan.

Orális bevitelhez a HIV-ellenes szulfatált poliszacharidot szilárd vagy folyékony készítményekké alakíthat-

juk át, amilyen a kapszula, pirula, tablettá, ostya, cukorka, ömledék, por, oldat, szuszpenzió vagy emulzió.

A szilárd egységadagolási alak lehet egy kapszula, mégpedig a szokásos kemény vagy lágy héjú zselatin-kapszula típus, amely pl. a felületaktív anyagot, kenőanyagot, és közömbös töltőanyagot, így laktózt, szacharózt, kalcium-foszfátot és kukoricakeményítőt tartalmaz.

Egy másik foganatosítási mód szerint a találmány szerinti vegyület tablettázható, a szokásos tablettá-alapanyagok segítségével, amilyenek a laktóz, szacharóz és kukoricakeményítő, a következő anyagok hozzáadásával:

- kötőanyagok, mint akácmézga, kukoricakeményítő vagy zselatin;
- szétcséslést elősegítő anyagok, amelyek rendeltetése, hogy a tablettá szétcséslését és oldódását segítsék elő a bevitel után; ilyen pl. a burgonyakeményítő, algin-sav, kukoricakeményítő és a guar-gumi;
- kenőanyagok, amelyek rendeltetése a tablettágranulátumok áramlási tulajdonságainak javítása és annak megakadályozása, hogy a tablettá anyaga hozzáadapadjon a tablettázó szerszám felületéhez; ilyen pl. a talkum, sztearinsav, a magnézium-, kalcium- vagy cink-sztearát,
- festékek, színezékek és színezékek, amelyek rendeltetése a tabletták esztétikai tulajdonságainak javítása és a beteg számára elfogadhatóbbá tétele.

Az orális folyékony adagolási alakokban való felhasználás szempontjából megfelelő adalékanyagok közé tartoznak a hígítók, pl. a víz és az alkoholok, pl. az etanol, benzil-alkohol és a polietilén-alkoholok, adott esetben gyógyászati szempontból elfogadható felületaktív anyagok, szuszpendálószerke vagy emulgeálószerke hozzáadásával.

A találmány szerinti HIV-ellenes szulfatált poliszacharid bevitel parenterálisan is, azaz szubkután, intravénán, intramuszkulárisan vagy intraperitoneálisan. A készítmények a vegyület injektálható dózisát tartalmazzák egy fiziológiai szempontból elfogadható hígítóban, egy gyógyászati szempontból elfogadható vívígyanyaggal együtt, amely a következő lehet:

- steril folyadék vagy folyadékelegy, mint víz, sóoldat, vizes dextróz és hasonló cukoroldatok,
- egy alkohol, mint etanol, izopropanol vagy hexadecil-alkohol,
- glikolok, pl. propilén-glikol vagy polietilén-glikol,
- glicerín-ketálok, pl. 2,2-dimetil-1,3-dioxolán-4-metanol,
- éterek, pl. polietilén-glikol 400,
- olajok,
- zsírsav, zsírsav-észter vagy -glicerid, acetilezett zsírsav-glicerid,

adott esetben gyógyászati szempontból elfogadható felületaktív anyagok, pl. szappanok vagy detergensek, szuszpendálószerke pl. pektin, karbomerek, metil-cellulóz, hidroxipropil-metil-cellulóz, vagy karboxi-metil-cellulóz-, vagy emulgeálószerke és más, a gyógyszerkészítésben szokásos hatásfokozók mellett.

A találmány szerinti gyógyszerkészítményekben használható olajokra jellegzetes példák a következők:

petróleum; állati, növényi vagy szintetikus olajok, pl. mogoróolaj, szójaolaj, szezámolaj, gyapotmagolaj, kukoricaolaj, olívaolaj, petrolátum és ásványolaj.

Megfelelő zsírsav pl. az olajsav, sztearinsav és az izosztearinsav.

Megfelelő zsírsav-észter pl. az etil-oleát és az izopropil-mirisztát.

5 Megfelelő szappan pl. A zsírsav-alkálifém-, ammónium- és trietanolamin-só.

Megfelelő detergensek pl. a következők:

- *kationos detergensek*, pl. a dimetil-dialkil-ammónium-halogenidek, alkil-piridinium-halogenidek, és az alkil-amin-acetátok,
- *anionos detergensek*, pl. az alkil-, aril- és olefin-szulfonátok,
- alkil-, olefin-éter- és monoglicerid-szulfátok és -szulfosukcinátok,
- 15 - *nemionos detergensek*, pl. a zsíramin-oxidok, zsírsavak alkanol-amidjai,
- polioxi-etilén-polipropilén-kopolimerek,
- *amfoter detergensek*, pl. az alkil-beta-amino-propionátok és 2-alkil-imidazolin-kvaterner ammónium-sók,
- 20 valamint az előbbieke keverékei.

A találmány szerinti parenterális készítmények általában kb. 0,5 – kb. 25 tömeg% mennyiségben tartalmazzák az oldatban a HIV-ellenes anyagot. Előnyösen alkalmazhatunk tartósítószerkeket és puffereket is. Az injekció helyén fellépő gyulladás minimálisra csökkentése vagy kiküszöbölése érdekében ezek a készítmények tartalmazhatnak egy nemionos felületaktív anyagot, amelynek hidrofíll/lipofíll mérlege (HLB) kb. 12- kb. 17.

A felületaktív anyag mennyisége ezekben a készítményekben kb. 5 – kb. 15 tömeg%. A felületaktív anyag lehet egyetlen komponens, amelynek HLB-értéke az előbbi, vagy állhat 2 vagy több komponensből, amelyek a keresett HLB-t eredményezik.

Jellegzetes példája a parenterális készítményekben használt felületaktív anyagoknak a polietilén-szorbitán-zsírsav-észterek, pl. a szorbitán-monooléat és az etilén-oxid nagy molekulatömegű, egy hidrofób bázissal képezett adduktjai, amely hidrofób bázis a propilén-oxid és a propilén-glikol kondenzációjával állítható elő.

Példák

45 A következő példák a találmány különböző jellegzetességeit mutatják be.

1. példa

Az RP135 peptid előállítás

50 Az RP135 peptidet (1. PNAS 85, p. 3198-3202, 1988) szilárd fázisú módszerekkel állítjuk elő, egy Applied Biosystems 430A szintetizátor alkalmazásával, 0,5 mmól BocGly(PAM) gyantán (0,8 mmól/g; Applied Biosystems). Az N^{al}-terc.Boc-védett aminosavakat kétszeresen kapcsoljuk, előre képzett szimmetrikus anhidridjeik alakjában, először N,N-dimetil-formamidban, majd diklór-metánban, a gyártó által rendelkezésre bocsátott eljárások szerint. Az Asn, Arg és Gln kettős kapcsolását 1-hidroxi-benzotriazol-észter alakban vég-
55 gezzük. Minden egyes aminosav között egy ecetsavanhidrides zárólépést iktatunk be.

Az oldallánc-védelem a következő:

Lys(2-ClZ), Arg(Tos), Ser(Bzl), Thr(Bzl).

65 A peptidet védőcsoport-mentesítjük és leválasztjuk a gyantától (0,25 mmól). Ez úgy történik, hogy 40 percen

át sós-jeges fürdőben -5°C -on 5% anizolt tartalmazó folyékony hidrogén-fluoriddal (HF) kezeljük. A HF-t vákuumban eltávolítjuk, és a peptidet 30%-os ecetsavval, majd 30%-os acetonitrilrel extraháljuk a gyantáról.

A szűrleteket liofilizáljuk és a maradékot 6M karbamid oldatban oldjuk. A peptidet Beckman C18 oszlopon (5 cm $\times$ 150 mm) tisztítjuk, 80 ml/perc áramlási sebesség mellett, 15 percen át, 20-25%-os lineáris acetonitril-grádienssel 0,1%-os trifluor-ecetsavban. A fő csúcsot elkülönítjük és liofilizáljuk. 137,9 mg keresett terméket kapunk.

Az aminosav-elemzés eredménye (6 N HCl, 48 óra, 106°C): Asx 1,79(2), Thr 1,98(2), Ser 0,81(1), Glx 0,98(1), Pro 0,94(1), Gly 4,14(4), Ala 1,01(1), Val 1,09(1), Ile 3,85(4), Phe 0,98(1), Lys 2,07(2), Arg 3,75(4);

FAB-MS (M+M)⁺: 2640,1 $\pm$ 1 m.u. (számított MT = 2638,5).

2. példa

Az AffiGel-10-hez kötött RP135 peptid előállítás

10 ml AffiGel-10-hez (BioRad) 0,1 M pH 6,0-10,0 MOPS kapcsoló pufferben hozzáadunk 100-300 mg RP135-öt, kapcsoló pufferben oldva. A kapcsolási reakciót 4°C -on végezzük, enyhe rázás közben, 4 órán át. A gyantán maradó aktív észtereket oly módon blokkoljuk, hogy 1 ml géltre számítva 0,1 ml 1 M pH 8 glicin-etil-észter oldatot vagy 0,1 ml 1 M pH 8 etanol-amin-klórhidrát oldatot adagolunk, majd a rendszert 1 órán át inkubáljuk. A gyantát ezután egy oszlopba töltjük és alaposan mossuk 0,01 M Hepes pufferrel (pH 7,4; 0,05 M NaCl).

3. példa

A HIV-ellenes heparin elkülönítése affinitáskromatográfiával, AffiGel-10-hez kötött RP135 peptid felhasználásával

A kereskedelembe kapható heparin-készítmény RP135-Affi-Gel-10-zel végzett frakcionálását az 1. ábra mutatja be. A peptidoszlop a teljes heparin-mennyiségnek kb. 2%-át (az uronsav és a száraz tömeg alapján meghatározva) tartja vissza. Az eluálást 1 M NaCl oldattal végezzük. Az így kapott HIV-elleni aktivitású heparin, fizikai-kémiai adatai megegyeznek a kiindulási heparin megfelelő azonosítási adataival.

A meg nem kötött heparin (URH₂) öt egymás utáni átervezése a megkötött vagy magas reakcióképességű heparin (HRH) mennyiségének csökkentését eredményezi úgy, hogy az ötödik átengedés után HRH nem mutatható ki.

Egy kontrolloszlopon, amelyet úgy készítettünk el, hogy etanol-amint kapcsolunk AffiGel-10-hez, nem volt megfigyelhető a heparin megkötése.

Az 1. ábrán szereplő betéttábla azt mutatja be, hogy a CD-elemzés eredményei alapján a HRH növeli a PR 135 rendezett szerkezetét (17% alfa-helix, 43% beta-helix, 40% statisztikus elrendeződésű csavar).

Az oldatban lévő RP135 túlnyomóan véletlenszerű szerkezetű (17% alfa-helix, 13% beta-helix, 70% statisztikus elrendeződésű csavar). Így megállapítható, hogy a heparinhoz kötődve az RP135 peptid-konformációja változáson megy át, amely a specifikus kölcsönhatásra jellemző.

Ezek az észleletek arra mutatnak, hogy az RP135 iránt legmagasabb affinitást mutató heparinfrakció elkü-

lönült a nyers kereskedelmi heparinkészítményből. Az a körülmény, hogy a nyers heparin nem kötődik az etanol-amin-AffiGel-10-hez és a peptid-oszlopon végzett egymás utáni kromatografálás során elveszti a HRH-t, arra mutat, hogy szelektív kölcsönhatás megy végbe: az RP135 specifikusan frakcionálja a heparint.

Így levonható az a következtetés, hogy az RP135 által képviselt szekvencia a gp120-ban megköti a glikóz-aminoglikánokat.

1. táblázat

A gp120 feltételezett heparinkötő szakaszai

gp120 - ¹⁶⁵I ST S K R G K V Q K E Y A F F Y K

gp120 - ³⁰⁶N N N T R K S I R I Q R G P G R A F (RP-135)

gp120 - ⁴⁷⁷S E L Y K Y K V V K I E P L G V A P

gp120 - ⁴⁹⁴P T K A K R R V V Q R E K R A V G I

A gp41 feltételezett heparinkötő szakaszai

gp41 - ²²⁷G E R D R D R S I R L V N G S L A L

gp41 - ²⁷¹V E L L G R R G W E A L K Y W W N L

gp41 - ³²⁵A Y R A I R H I P R R I R Q G L E R

Az 1. táblázat a gp120 és a gp41 további feltételezhető heparinkötő szakaszait mutatja be, amelyek a glikózamino-glikánok és más szulfatált poliszacharidek megkötésekor funkcionálnak. Ezek a területek nagy pozitív töltéssűrűséget mutatnak; ez a heparinkötés esetében aktuális két egyezményes szekvencia-típusnak;

X-B₂-X-B-X és X-B₂-X₂-B-X, ahol

B és X bázisos, ill. töltés nélküli csoportnak

felel meg. Ezt korábban A. D. Cardin és H. J. R.

Weintraub határozta meg (Arteriosclerosis, Vol. 9, p. 21-22., 1989).

Az ezeknek a területeknek megfelelő szintetikus peptidok valószínűleg - az RP135-höz hasonlóan - alkalmazhatók a szulfatált poliszacharidok frakcionálására. Így fokozott gátló hatás érhető el a HIV-vel szemben.

A 2. táblázat a vitronektin heparinkötő tartományát és e vegyület szekvenciájának az RP135-éhez való hasonlóságát mutatja be. Következésképp az AffiGel-hez kapcsolt vitronektin szintén felhasználható heparin vagy más szulfatált poliszacharid frakciók előállítására, amelyek magas affinitást mutatnak a gp120/gp41 iránt és amelyek HIV-ellenes aktivitása magasabb.

4. példa

A HIV-ellenes heparin szincitium-képződést megelőző képessége és a P24 vírus-mag antigén kifejeződése JM sejtek és GB8 vírustörzs alkalmazása esetén

Annak kimutatására, hogy az RP135-höz kötődő heparin blokkolja a HIV-fertőzést, CD4⁺ T-sejteket (JM) a HIV-1 egy klinikailag izolált törzse - GB8 (24) - hatásának tesztünk ki. A vírust először HRH-val inkubáljuk 15 percen át, majd hozzáadjuk a sejteket. 2 órás adszorpció után a vírus-inokulumot eltávolítjuk és a sejteket háromszor mossuk, a bevitt vírus nyomainak eltávolítására. A vírusellenes hatást 3 napi inkubálás után határoz-

2. táblázat
RP135; a gp120 heparinkötő tartományának feltételezhető, a vitronektin heparinkötő tartományához hasonló szekvenciája
[X-B-B-B-X-X-B-X]^a

RP-135	307N	N	T	R	K	S	I	R	I	Q	R	G	P	G	R	A	F	V	T	I	G	K	I	G
VITRO-NEKTIN ^b	353H	R	N	R	K	G	Y	R	S	Q	R	G	H	S	R	G	R	N	Q	N	S	R	R	P

- ^a A heparinkötés egyezményes szekvenciája, amelyben
B egy bázisos maradék előfordulásának valószínűsége és
X egy töltés nélküli maradék.
- ^b A vitronektin heparinkötő szekvenciája, Suzuki et al. szerint (Embo J. 4, p. 2519, 1985).
A körülrajzolt területek szerkezeti hasonlóságokra mutatnak. A tulajdonságok megőrzése mellett végbemenő helyettesítéseket maradékpárokkal jelezzük, amelyek a következő csoportokba sorolhatók:
S,T,A,G,P; N,D,E,Q; R,K,H; M,L,L,V; F,Y,W.

zük meg oly módon, hogy a négy párhuzamos kísérletben talált szincitiumok számának átlagát felvesszük a szulfatált poliszacharid koncentrációjának log₁₀ értékével szemben.

Azt találtuk (2A. ábra), hogy a HRH 50%-os hatásos dózisa (ED₅₀) a szincitium-képződés gátlása vonatkozásában 0,3 µg/ml. Ez az érték összehasonlítható az URH₃ 2,2 µg/ml-es és a dextrán-szulfát (M_r~500,000) 1,5 µg/ml-es értékével (2A. ábra).

A HRH, az URH₃ és a dextrán-szulfát potenciáját oly módon is mérjük, hogy meghatározzuk a vírus-mag antigén (P24, Abbott teszt) mennyiségét a felülúszó folyadékban (2B. ábra). A HRH, URH₃ és a dextrán-szulfát kapott ED₅₀ értékei: 0,4; 3,0 és 2,0 µg/ml; ez a sorrend azonos azzal, amelyet a szincitium-képződési vizsgálattal határoztunk meg.

További kísérletek arra mutatnak, hogy az RP135 iránt affinitást mutató heparin antivirális aktivitása következetesen tízszerese a nem kötött frakciónak és minden esetben nagyobb, mint a nagy molekulatömegű dextrán-szulfáttal elérhető.

5. példa

A HIV-ellenes heparin képessége a szincitium-képződés teljes blokkolására 10 µg/ml koncentrációban, JM sejtek és GB8 vírusörzs alkalmazása mellett

A 3A és a 3B ábra fertőzött sejtek fényképfelvételeit mutatja be, amelyeket 10 µg/ml heparin távollétében, ill. jelenlétében tenyésztünk. ez a koncentráció teljes védelmet nyújt a szincitium-képződés ellen.

6. példa

A HIV-ellenes heparin képessége a P24 vírus-mag antigén kifejeződésének megakadályozására különböző vírustörzsek (GB8, RF és IIIB) és sejtek (JM és C8166) alkalmazása mellett

A HIV-ellenes heparin (HRH) védő hatását más kísérletekben is igazoltuk, amelyeket a C8166 T-sejtvonal alkalmazásával végeztünk; ezt a HIV-1 prototípus törzssel, az RF törzssel vagy HTLV-IIIB-vel fertőztük meg.

A legmagasabb HIV-ellenes hatást a HRH mutatja (4A-C. ábra). A HRH, az URH₃ és a dextrán-szulfát ezekre a sejtekre nézve 100 µg/ml koncentrációban még nem toxikus, amint ez a tetrazolium-redukciós vizsgálattal meghatározható. A HRH azonban magasabb anti-

koaguláns hatást mutat, mint az URH₃ és a dextrán-szulfát.

10 µg/ml koncentrációban a HRH, URH₃ és a nem-frakcionált heparin által kiváltott aladási idők 2,4-szeresre, 1,5-szeresre, ill. 1,9-szeresre növekedtek ahhoz a plazmához képest, amelyet a HIV-aktivitás meghatározásához kontrollként használtunk.

3. táblázat
Különböző heparin frakciók antikoaguláns tulajdonságai

Minta	Heparin tömeg ^a	Aladási idő (szek.)
kontroll	-	15,8 ± 0,3 (n=8)
HRH ^b	920	37,1 ± 2,7 (n=10)
	460	20,0 ± 0,4 (n=8)
	180	17,3 ± 0,3 (n=8)
URH ₃	920	23,5 ± 0,7 (n=10)
nyers heparin	920	29,4 ± 0,9 (n=10)

^a ng heparin (szárazanyag) / 100 µl plazma dimenzióban

^b nyers heparin RP135-AffiGel-10-en végzett frakcionálással tisztítva

0,4 µg/ml koncentrációban /azaz az ED₅₀ értéken) a HRH kismértékű kimutatható aladásgátló aktivitást mutat (nem tüntetjük fel). A HRH HIV-1 ellenes potenciáját tekintve (ED₅₀ 0,35 µg/ml-nél kisebb vagy azzal egyenlő) lehetséges lenne a heparin in vivo olyan koncentrációkban való bevitele, amelyek minimális aladásgátló hatást eredményeznek jelentős HIV-1 ellenes aktivitás mellett.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

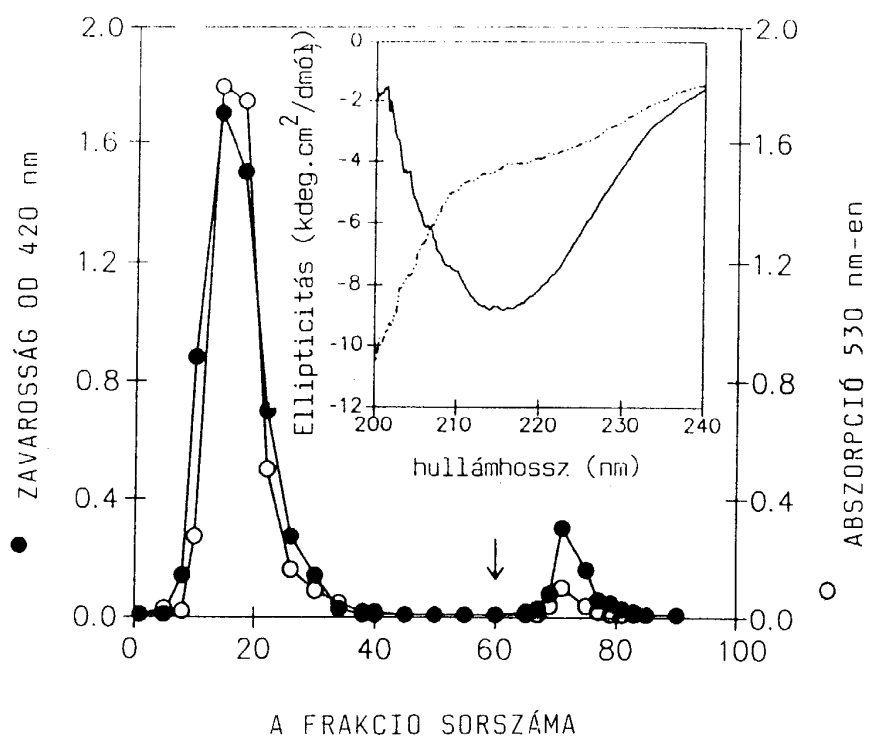
- Eljárás HIV-ellenes aktivitású heparin előállítására, *azzal jellemezve*, hogy
 - a heparint gyantán rögzített RP135 peptidhez kapcsoljuk,
 - a gyantához kötött RP135 peptidet a hozzá kapcsolódott HIV-ellenes aktivitású heparinnal együtt elválasztjuk a heparintól,

- iii) a megkötött HIV-ellenes aktivitású heparint elkülönítjük a gyantához kötött RP135 peptidről oly módon, hogy a gyantát egy sóoldattal mossuk, és
- iv) a sóoldatból kinyerjük a HIV-ellenes aktivitású heparint.

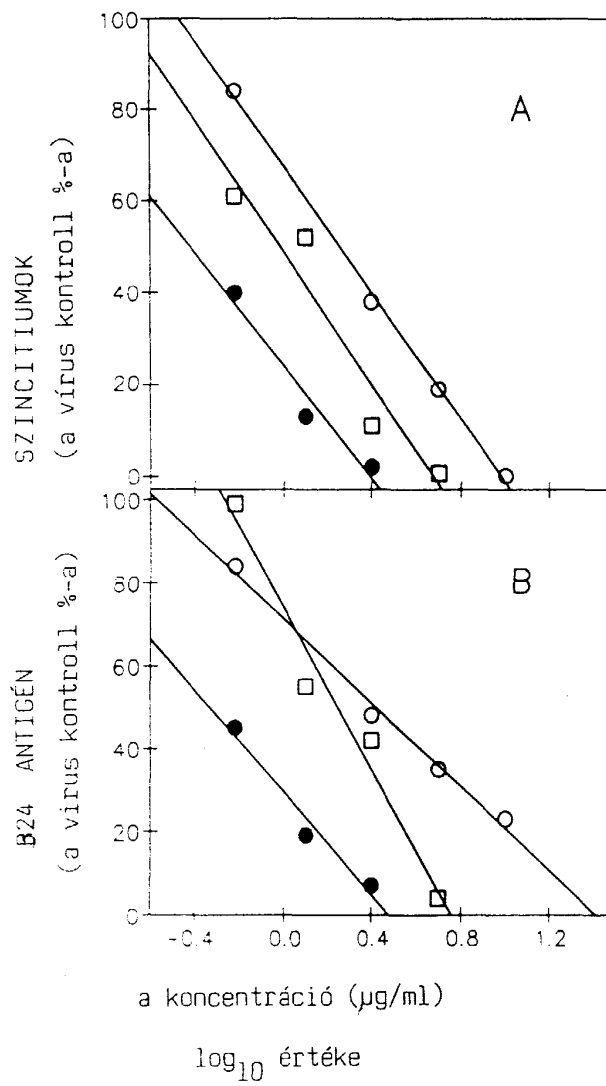
2. Eljárás gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti eljárással előállított HIV-ellenes heparint a gyógyszerkészítésben szokásos vivőanyaggal és kívánt esetben adalékanyaggal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.
- 5

NNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIG

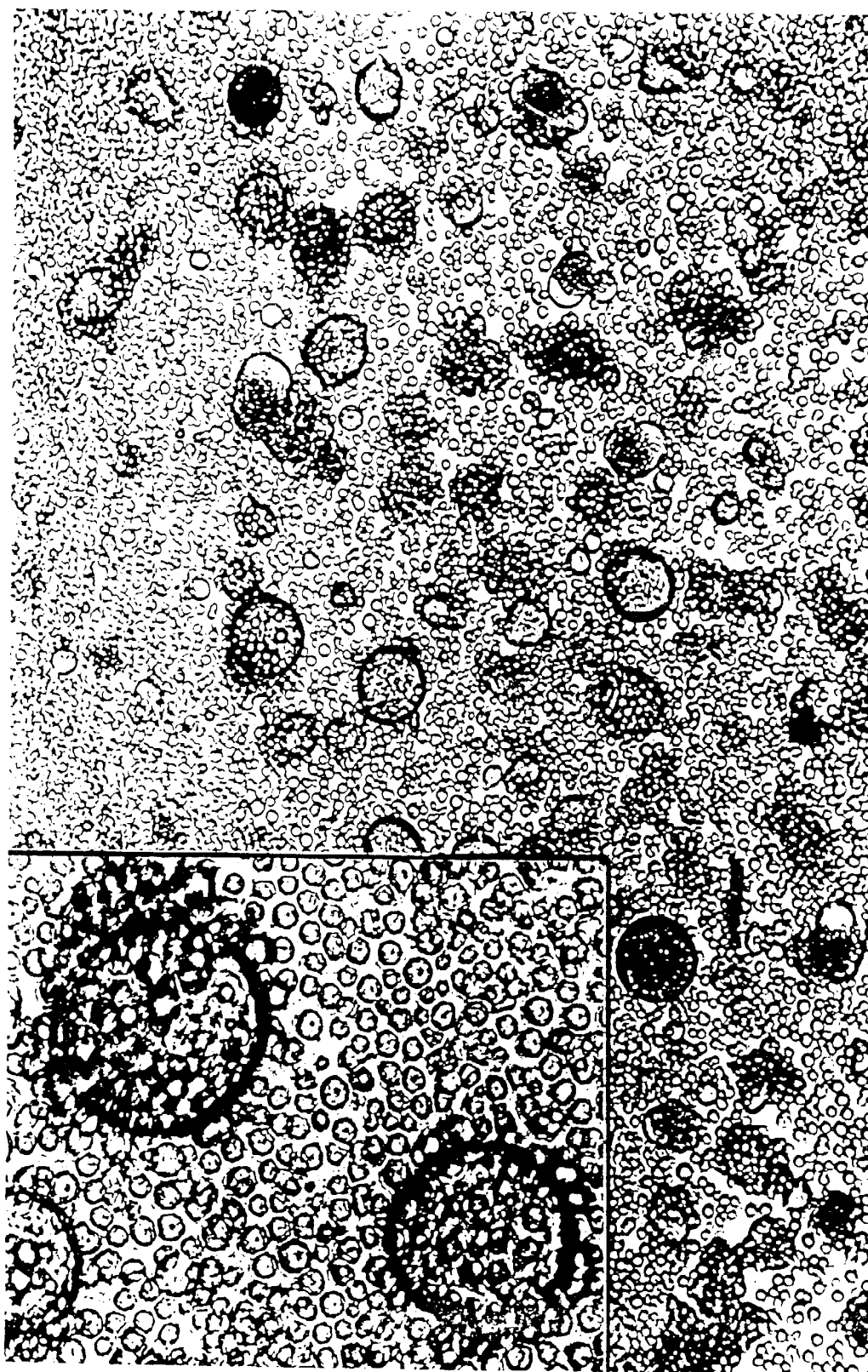
(I)



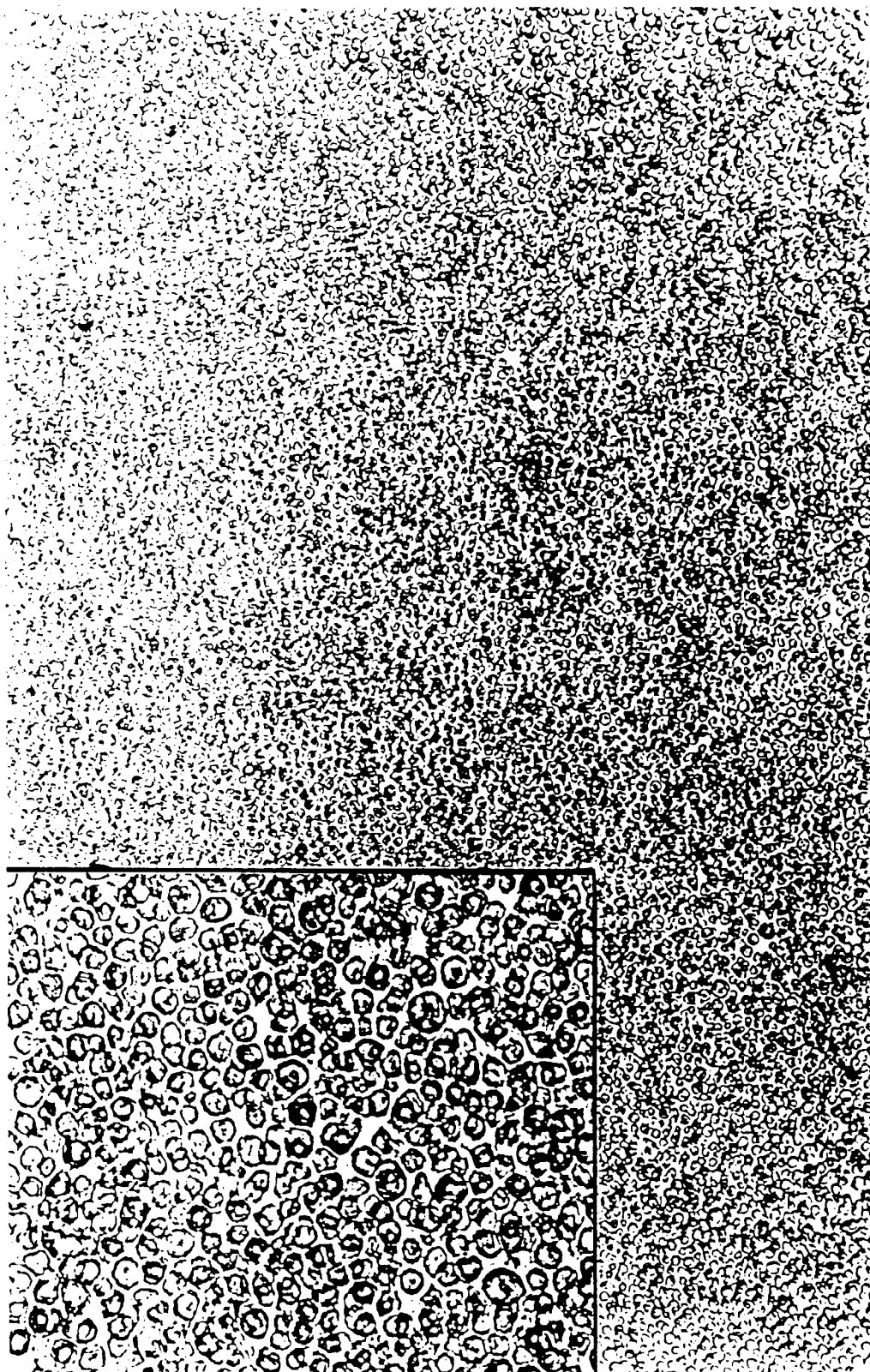
1. ábra



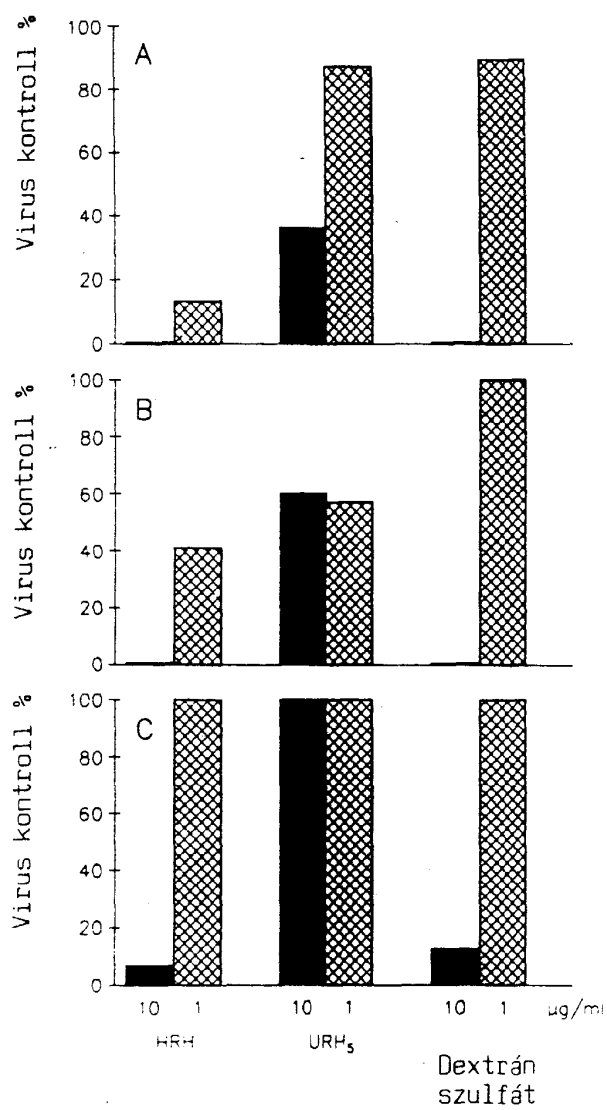
2. ábra



3. ábra



3/B ábra



4 ábra