

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 902821 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **902821**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**A01N 37/06
A61L 2/16
A61J 1/05**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **06.06.1990**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **06.06.1990**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **13.12.1990**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority
12.06.1989 US 365291

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Research Foundation For Mental Hygiene, 44 Holland Avenue Albany, N.Y. 12229, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Isaacs, Charles E., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Kim, Kwang S., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Thormar, Halldor, Iceland, ISLANTI, (IS)

4 •Heird, William C., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

5 •Wisniewski, Henryk M., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Keijo Heinonen Oy, Fredrikinkatu 61 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Infektion leviämisen vähentäminen verenkäsittelylaitteistolla

Förminskning av infektionsspridning medelst blodbehandlingsapparatur

INFEKTION LEVIÄMISEN ESTÄMINEN VERENKÄSITTELYLAITTEELLA

Ristiviittaus asiaanliittyvään hakemukseen

Tämä hakemus on continuation-in-part samaan aikaan vireillä olevalle US-patenttihakemukselle sarjanumeroltaan 140,078, jätetty 31.12.1987.

Keksinnön alue

Tämä keksintö kohdistuu rasvahappojen ja monoglyseridien virus-tenvastaiseen ja bakteerinvastaiseen vaikutukseen. Tarkemmin tämä hakemus kohdistuu koteloituneiden virusten inaktivoimiseen ja solujen tappamiseen rasvahapoilla ja monoglyserideillä, erityisesti veressä ja verituotteissa.

Keksinnön taustaa

On olemassa monia julkaistuja raportteja, jotka koskevat äidinmaidon kykyä suojata imeväistä maha-suolialueen tulehdukselta. Katso A.S. Cunningham, Morbidity in breast-fed and artificially fed infants, J. Pediatr., 1979, Vol. 95, s. 685-689; M.G. Myers et al., Respiratory and gastrointestinal illnesses in breast- and formula-fed infants, Am. J. Dis. Child., 1984, Vol. 138, s. 629-632; S.A. Larsen, Jr., Relation of breast versus bottle feeding to hospitalization for gastroenteritis in a middle-class U.S. population, J. Pediatr., 1978, Vol. 92, s. 417-418; M.E. Fallot et al., Breast-feeding reduced incidence of hospital admissions for infection in infants, Pediatr., 1980, Vol. 65, s. 1121-1124; A.S. Cunningham, Breast-feeding and health, J. Pediatr., 1987, Vol. 110, s. 658-659. Suuri osa suojasta on las-kettu maidossa olevien immunoglobuliinien tiliin. Katso G.A. Loslonsky et al., Maternal-neonatal interactions and human breast milk, julkaisussa Reproductive Immunology, N. Gleicher (toim.), New York, Alan R. Riss, 1981, s. 171-182; A.S. Goldman et al., Host defenses: development and maternal contributions, julkaisussa Barness LA., toim., Advance in pediatrics, Vol. 32, 1985, s. 71-100. On kuitenkin osoitettu, että maidossa on epä-spesifisiä tekijöitä, jotka voivat tappaa patogeeneja tai hidastaa niiden replikoitumista. Jotkut näistä suojatekijöistä ovat

myös ravintoaineita, kuten monoglyseridit ja rasvahapot. Koska ihmislapsen maitoseos ei sisällä immunoglobuliineja, on oletettu, että se ei anna mitään suojaa maha-suolialueen infektiota vastaan. Maitoseokset kuitenkin sisältävät triglyseridejä, jotka mahassa ja suolistossa tapahtuneen lipolyysin jälkeen muodostavat vapaita rasvahappoja ja monoglyseridejä, joista joidenkin on osoitettu inaktivoivan koteloituneita viruksia ja Giardia lamblia ollessaan läsnä ihmisen ja naudan maidossa. Katso J.K. Welsh et al., Use of Semliki Forest virus to identify lipid-mediated antiviral activity and anti-alphavirus immunoglobulin A in human milk, Infect. Immun., 1978, Vol. 19, s. 395-401 (I); J.K. Welsh et al., Effect of antiviral lipids, heat, and freezing on the activity of viruses in human milk, J. Infect. Dis., 1979, Vol. 140, s. 322-328 (II); C.E. Isaacs et al., Membrane disruptive effect of human milk: Inactivation of enveloped viruses, J. Infect. Dis., 1986, Vol. 154, s. 966-971, kaikkien edellämainittujen artikkelien ollessa liitetty tähän yhteyteen viitteiksi.

Äidinmaito sisältää joukon virustenvastaisia tekijöitä, jotka eivät ole immunoglobuliineja. Katso W.A. Falkler, Jr., et al., A lipid inhibitor of dengue virus in human colostrum and milk, Arch. Virol., 1975, Vol. 47, s. 3-10; A.H. Fieldsteel, Non-specific antiviral substances in human milk active against arbovirus and murine leukemia virus, Cancer Res., 1974, Vol. 34, s. 712-715; T.H. Matthews et al., Antiviral activity in milk of possible clinical importance, Lancet, 1976, Vol. ii, s. 1387-1389; N.H. Sarkar et al., Effect of human milk on the mouse mammary tumor virus, Cancer Res., 1973, Vol. 33, s. 626-629. Jotkut näistä tekijöistä sijaitsevat maidon ei-lipidisessä fraktiossa, mutta useimmat tutkimukset ovat havainneet virustenvastaista aktiivisuutta, joka liittyy lipidifraktioon. Virustenvastaiset lipidit ovat parhaiten karakterisoineet Welsh et al. (II), jotka havaitsivat, että maidossa olevat vapaat tyydyttymättömät rasvahapot ja monoglyseridit inaktivoivat koteloituneita, mutta eivät koteloitumattomia viruksia.

Kuten C.E. Isaacs et al. ovat raportoineet julkaisussa Membrane Disruptive Effect of Human Milk: Inactivation of Enveloped Viruses, J. Infect. Dis., 1986, Vol. 154, s. 966-971, joka spesi-

fisesti on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi, on Welsh et al.:n suorittama työ (II) vahvistettu ja sitä on laajennettu. Osoitettiin, että tuoreesta rintamaidosta peräisin olevat lipiidit eivät ole virustenvastaisia, mutta aktivoituvat vastustamaan koteloituneita viruksia säilytettäessä 4°C:een lämpötilassa, sekä lapsen vatsassa, todennäköisesti rasvahappojen vapautuessa maidon triglyserideistä.

Keksinnön tarkoitukset

Keksinnön tarkoituksena on tarjota käyttöön rasvahappoja ja monoglyseridejä, joilla on virustenvastainen ja bakteereidenvastainen vaikutus.

Keksinnön tarkoituksena on myös antaa käyttöön menetelmä koteloituneiden virusten inaktivoimiseksi ja solujen tappamiseksi saattamalla ne kosketuksiin rasvahappojen ja monoglyseridien kanssa.

Keksinnön tarkoituksena on edelleen antaa käyttöön menetelmä infektion vähentämiseksi verenkäsittelylaitteissa saattamalla veri kosketuksiin rasvahappojen ja monoglyseridien kanssa.

Nämä sekä keksinnön muut tarkoitukset käyvät tarkemmin ilmi jäljessä olevasta selostuksesta.

Lyhyt kuvaus piirroksista

Kuvat 1, 2 ja 3 esittävät kukin poikkileikkauskuvaa keksinnönmukaisesta koeputkesta.

Kuva 4 esittää poikkileikkauskuvaa keksinnönmukaisesta veripusista.

Kuvat 5a-5c esittävät VSV-partikkelien negatiivista värjäystä, joka osoittaa linoleenihapon vaikutusta. VSV inkuboitiin 37°C:ssa 30 min (a) MM:ssä, (b) linoleenihapossa (0,5 mg/ml MM) ja (c) linoleenihapossa (1 mg/ml MM). Kuva 5a, normaaleja vahingoittumattomia partikkeleita piikkien peittäminä; kuva 5b, viruskotelo, joka ei enää ole vahingoittumaton, jolloin värin on

mahdollista tunkeutua partikkeleihin; kuva 5c, viruspartikkelit hajoamisen eri vaiheissa. Bar = 0,1 μ m.

Kuvat 6a-6d esittävät pyyhkäisyelektronimikroskooppikuvia kaikista viljelmistä osoittaen äidinmaidon ja linoleenihapon vaikutuksen. Vero-soluja inkuboitiin 37°C:ssa 30 min (a) äidinmaidossa, (b) maidossa, jota oli pidetty 4°C:ssa 4 päivää, (c) MM:ssä tai (d) linoleenihapossa (1 mg/ml MM). Maitonäytteet laimennettiin 1:5 MM:ään. Kuvat 6a ja 6c, vahingoittumattomat solukalvot joissa on mikrokarvoja; kuvat 6b ja 6d, solukalvoja, jotka ovat osittain tai kokonaan hajonneet. Bar = 1,0 μ m.

Keskustelua

Monilla viruksilla, jotka ovat virulentteja ihmisen patogeeneja, on kotelot (pala kalvoa niitä ympäröimässä). Näitä ovat AIDS-virus (ihmisen immuunipuutosvirus, HIV), ja herpes-virukset, kuten herpes simplex virus (HSV), Epstein-Barr-virus (EBV), sytomegalo-virus (CMV), Varicella/Zoster (VZ), Marekin sairauden virus, tammojen virus-luominen, ja pseudorabies-virus. Virusten kotelo on välttämätön infektiivisyydelle. Vaikka monet yhdisteet pystyvät tuhoamaan kotelon ja inaktivoimaan viruksen, on monilla samanaikaisesti myrkyllisiä sivuvaikutuksia elimistössä. Rasvahapot ja monoglyseridit ovat normaaleja kehon aineenvaihduntatuotteita, joita muodostuu huomattavasti maitotuotteiden hajoatessa. On havaittu, että rasvahappojen ja/tai monoglyseridien virustenvastaista ja/tai bakteerivastaista vaikutusta voidaan menestyksellisesti käyttää hyväksi.

Tuoreessa maidossa olevat lipidit eivät inaktivoi viruksia, mutta tulevat virustenvastaisiksi, kun maitoa on säilytetty muutama päivä 4°C:ssa tai 23°C:ssa. Virustenvastaisen vaikutuksen ilmeminen riippuu aktiivisista maidon lipaaseista ja korreloi maidossa olevien rasvahappojen vapautumisen kanssa. Suuresta joukosta rasvahappoja, jotka ovat maitolipidien normaaleja komponentteja, tutkittiin niiden vaikutus koteloituneita viruksia vastaan, s.o. rakkulaisen suutulehduksen aiheuttavaa virusta vastaan, herpes simplex-virusta vastaan, visna-virusta vastaan, ja koteloitumatonta virusta, poliovirusta, vastaan. Lyhytketjuisilla ja pitkäketjuisilla tyydyttyneillä rasvahapoilla ei ollut

lainkaan tai oli hyvin pieni virustenvastainen vaikutus korkeimmalla tutkitulla konsentraatiolla. Keskipitkäketjuisilla tyydyt-
tyneillä ja pitkäketjuisilla tyydyttymättömillä rasvahapoilla
oli toisaalta erittäin suuri vaikutus koteloituneisiin viruk-
siin, vaikka tarvittava rasvahappokonsentraatio maksimaaliseen
virusten inaktivoimiseen vaihteli niinkin paljon kuin 20-kertai-
sesti. Näiden rasvahappojen monoglyseridit olivat myös erittäin
virustenvastaisia, joissakin tapauksissa konsentraationa, joka
oli 10 kertaa alhaisempi kuin rasvahappojen konsentraatio. Yksi-
kään rasvahapoista ei inaktivoinut poliovirusta. Virustenvas-
taisten rasvahappojen todettiin vaikuttavan viruksen koteloon,
aiheuttaen vuodon, ja suuremmilla konsentraatioilla kotelon ja
viruspartikkelien täydellisen hajoamisen. Ne myös aiheuttivat
kudosviljelmän solujen plasmakalvojen hajoamisen, joka johti
solujen hajoamiseen ja kuolemiseen. Sama ilmiö tapahtui soluvil-
jelmässä, joita oli inkuboitu säilytetyssä virustenvastaisessa
äidinmaidossa. Äidinmaidon lipidien mikrobienvastainen vaikutus
in vitro aiheutuu siis todennäköisimmin rasvahappojen aikaansaa-
masta solu- ja viruskalvojen hajoamisesta.

1. Materiaalit ja menetelmät

Soluviljelmät. Vero-solut (Afrikan vihreän apinan munuaissolu-
linja; Flow Laboratories Inc., McLean, Va.) kasvatettiin Eagle
basal-kasvualustassa (BME) (GIBCO Laboratories, Grand Island,
N.Y.) 10% inaktivoitun naudan seerumin (GIBCO) kanssa. Lampaan
sidekudosemosoluviljelmät saatiin lampaan aivojen suonikudokses-
ta ja kasvatettiin 15% lampaan seerumissa (Colorado Serum Co.)
BME:ssä. Ylläpitokasvualusta (MM) Vero-soluille oli BME, jossa
oli 2% sikiövasikan seerumia; lampaan soluille MM oli 2% lampaan
seerumi BME:ssä. Gentamisiiniä (0,1%) lisättiin kaikkiin kasvu-
alustoihin.

Virukset. Rakkulaisen suutaudin aiheuttavan viruskanta (VSV) ja
herpes simplex-viruksen, tyyppi 1 (HSV-1) kanta MacIntyre saa-
tiin American Type Culture Collectionilta, Rockville, Md., ja
kasvatettiin Vero-soluissa. Visna-viruskanta K796 kasvatettiin
lampaan suonikudossoluissa. Polioviruksen, tyyppi 1, kanta Chat
saatiin R.I. Carpilta (New York Institute of Basic Research) ja
kasvatettiin Vero-soluissa.

Virusten titraus. Virukset titrattiin siirrostaamalla 10-kertaisia laimennoksia (VSV, poliovirus, ja HSV-1 siirrostettiin Verosoluviljelmiin, ja visna-virus siirrostettiin lampaan suonikalvosoluviljelmiin) 96-koloisiin mikrotiitterikudosviljelmälevyihin (Becton Dickinson Labware, Oxnard, Calif.). Viruslaimennos (0,1 ml) MM:ssä siirrostettiin kuhunkin koloon siten että samaa laimennosta tuli neljään koloon. Levyjen annettiin seistä 2-12 päivää riippuen viruksesta, ja niistä tutkittiin päivittäin solusairausvaikutus. Virustiitterit laskettiin Reedin ja Muenchin menetelmällä (L.J. Reed et al., Am. J. Hyg., 1938, Vol. 27, s. 493-497).

Maitonäytteet. Äidinmaitonäytteet 1, 2 ja 3 kerättiin steriileissä olosuhteissa 1-5 kuukautta synnytyksen jälkeen ja pidettiin pakastettuna -86°C :ssa ennen kokeisiin käyttämistä.

Reagenssit. Rasvahapot ja monoglyseridit hankittiin Sigma Chemical Co.:lta, St. Louis, Mo. (puhtain laatu). Monoglyseridieetterit oli tilauksesta syntetisoinut Deva Biotech, Inc., Paoli, Penna. Juuri ennen käyttöä ne sulatettiin ja emulgoitiin neste-mäiseen muotoon BME:hen, jossa oli 10% sikiövasikan seerumia, vorteksoimalla suurimmalla nopeudella 1 min. Emulsiot (100 mg/ml) laimennettiin haluttuihin konsentraatioihin MM:ään. Lyhytketjuisten rasvahappojen emulsiot neutraloitiin pH-arvoon 7 lisäämällä 1 M NaOH:ta. Tyydyttymättömät rasvahapot ja monoglyseridit pidettiin työssä, ja emulsiot käytettiin muutaman minuutin sisällä valmistuksesta. Eseriinisulfaatti (fysostigmiiini; Sigma) ja NaCl liuotettiin veteen ja laimennettiin MM:ään ennen kokeisiin käyttämistä.

Virustenvastaista aktiivisuutta tutkiva koe. Noin 10^5 50%:sti kudosisviljelmää infektoivaa annosta (TCID_{50}) virusta sekoitettiin viisinkertaiseen laimennokseen maitoa MM:ssä ja inkuboitiin 37°C :ssa 30 min. Pelkkään MM:ään sekoitettua virusta käytettiin kontrollina. Inkuboinnin jälkeen kunkin seoksen infektiivisyys titrattiin sarjalaimennuspäätepiestemenetelmällä. Laimennokset (10-kertaiset) tehtiin MM:ään. 10^{-2} - 10^{-5} laimennosta siirrostettiin Vero-solujen yksisolukerrokseen, ja virustiitterit määritettiin kuten edellä on kuvattu. Eroa kontrolliviruksen tiitterin (\log_{10}) ja maito-virus- ja lipidi-virusseoksien tiitterei-

den välillä, t.s. virustiitterin laskua, käytettiin virustenvastaisen aktiivisuuden mittana.

Viruksen preparointi elektronimikroskooppia varten. VSV konsentroidiin ja puhdistettiin osittain differentiaalisentrifugoinnilla Beckmannin L2-65B ultrasentrifuugissa, ja näytteitä (10^{10} TCID₅₀/ml) inkuboitiin 37°C:ssa 30 min MM:ssä emulgoitujen rasvahappojen kanssa tai ilman niitä. Virussuspensiot levitettiin hiilipäällystetyille ristikoille ja värjättiin negatiivisesti 2% fosfowolframihapolla, pH 7,0. Näytteet tutkittiin käyttäen Hitachin HS 8-2 elektronimikroskooppia jännitteellä 50 kV.

Solujen preparointi elektronimikroskooppia varten. Solujen yksisolukerroksia inkuboitiin 30 min 37°C:ssa joko pelkässä MM:ssä tai maidon tai rasvahappoemulsion kanssa. Solukerrokset huuhdottiin sitten huolellisesti Hankin tasapainotetulla suolaliuoksella ja kiinnitettiin 2% glutaraldehydillä 0,1 M kakodylaattipuskurissa. Kun solut oli huuhdottu puskurissa ja jälkikiinnitetty 2% osmiumtetroksidilla, ne dehydrattiin etanolifraktioiden avulla, kuivattiin kriittiseen pisteeseen ja ruiskupinnoitettiin 10,5 nm:llä kultaa. Ne tutkittiin ISI-ISS40 pyyhkäisyelektronimikroskoopilla jännitteellä 20 kV.

Rasvahappojen määrän arviointi. Lipidit 100 µl:sta maitonäytteitä uutettiin 0,5 ml:lla kloroformin ja metanolin seosta (2:1). Ylempi faasi poistettiin ja kloroformikerroserä erotettiin ohutkerroskromatografialla Silika Gel G:llä (Merck & Co., Inc., Rahway, N.J.) päällystetyillä levyillä käyttäen kvantitatiivisia standardeja öljyhappoa liuotinjärjestelmässä, jossa oli heksaania, dietyylieetteriä ja etikkahappoa (70:30:1,5). Kehittyneet levyt hiillettiin sen jälkeen kun niihin oli suihkutettu dikromaattirikkihappoa, ja vapaiden rasvahappojen määrä määritettiin densitometrillä.

2. TULOKSET

Suhde lipolyysin ja virustenvastaisen aktiivisuuden välillä.

Aikaisemmat tulokset (Isaacs et al.) osoittivat, että äidinmaito aktivoituu koteloituneita viruksia vastaan kun sitä on säilytetty 4°, 23° tai -20°C:ssa eri pituisia ajanjaksoja. Virustenvastainen aktiivisuus liittyy kermafraktioon, mutta kuorittua frak-

tiota tarvitaan lipidien tulemiseen virustenvastaisiksi. Sen tutkimiseksi, riippuiko virustenvastaisen aktiivisuuden olemassaolo aktiivisista maidon lipaaseista, säilytettiin maitonäytteitä 1, 2 ja 3 4°C:ssa 4 päivää siten että läsnä oli kaksi lipaasi-inhibiittoria (5 mM eseriinisulfaattia ja 1 M NaCl) tai ettei niitä ollut läsnä. Virustiitteri (VSV) laski 10^5 :stä $<10^{1.5}$:een TCID₅₀ sen jälkeen kun oli inkuboitu maidon kanssa, jota oli säilytetty ilman inhibiittoria, jolloin vähennys oli $10^{3.5}$ TCID₅₀. Sitä vastoin viruksessa, jota oli inkuboitu samalla tavalla maidon kanssa, jota oli säilytetty lipaasi-inhibiittorien kanssa, ei ilmennyt mitään infektiivisyyden vähenemistä käytetyillä konsentraatioilla. Inhibiittoreilla ei ollut vaikutusta maitoon, joka oli jo virustenvastaista.

Toinen osoitus siitä, että virustenvastaisen aktiivisuuden ilmeneminen säilytetyssä äidinmaidossa liittyy lipolyysiin, on esitetty seuraavassa taulukossa:

TAULUKKO 1. Vapaat rasvahapot (FFA) ja virustenvastainen aktiivisuus maidossa*

<u>Maito-</u> <u>näyte</u>	<u>Säilytys-</u> <u>lämpö/aika</u> <u>(°C/päivää)</u>	<u>FFA</u> <u>(mg/ml)</u>	<u>VSV-tiitterin</u> <u>lasku (log₁₀)</u>	<u>Lipoproteiini-</u> <u>lipaasi (U/ml)</u>
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	

* Samat tulokset saatiin maidolle, joka tutkittiin tuoreena tai säilytyksen jälkeen -86°C:ssa.

Taulukon 1 mukaan pakastetussa äidinmaitonäytteessä 1 ei ollut merkittäviä määriä vapaita rasvahappoja, mutta määrä kasvoi 7:ään ja 12:een mg/ml:aan kun näytettä oli säilytetty 4° ja 23 °C:ssa, tässä järjestyksessä, 4 päivää. Molemmat säilytetyt näytteet olivat erittäin suuresti virustenvastaisia. Maitonäytteen 3 vapaiden rasvahappojen määrä toisaalta kasvoi vain 2 mg/ml:aan varastoinnin aikana, ja maito ei tullut virustenvastaiseksi. Verrattuna maitonäytteeseen 3 oli maitonäytteessä 1 paljon suuremmat määrät lipoproteiinilipaasia, jonka oli aikaisemmin osoitettu korreloivan maidon virustenvastaisen aktiivisuuden ilmenemisen kanssa.

Rasvahappojen ja monoglyseridien virustenvastainen aktiivisuus.

Maidosta löytyvien lukuisten rasvahappojen virustenvastaisen aktiivisuuden vertailu on esitetty seuraavassa taulukossa:

TAULUKKO 2. Virusten inaktivointi inkuboimalla rasvahappojen kanssa 37°C:ssa 30 min

Rasvahappo	Konsentraatio mg/ml (mM)	Virustiitterin lasku (\log_{10})		
		VSV	HSV-1	VV ^b
Butyyri- (4:0) ^c	10 (113)	0	ND ^d	ND
Kaproiini- (6:0)	10 (86)	0	ND	ND
Kapryyli- (8:0)	10 (69)	1.8	ND	≥3.2
Kapriini- (10:0)	4 (22)	≥4.0 ^e	≥4.0	≥3.2
Lauriini- (12:0)	2 (10)	≥4.0	≥4.0	≥3.2
Myristiini- (14:0)	4 (16)	≥4.0	≥4.0	1.7
Palmitiini- (16:0)	20 (78)	1.0	1.0	0.7
Palmitoleeiini- (16:1)	2 (15)	≥4.0	≥4.0	≥3.2
Steariini- (18:0)	20 (70)	0	ND	ND
Öljy- (18:1 cis)	2 (7)	≥4.0	≥4.0	≥3.2
Elaidiini- (18:1 trans)	2 (7)	≥4.0	ND	ND
Linoli- (18:2)	1 (3.5)	≥4.0	≥4.0	≥3.2
Linoleeni- (18:3)	1 (3.6)	≥4.0	≥4.0	≥3.2
Arakidoni- (20:4)	0.5 (1.6)	≥4.0	ND	ND

^a Rasvahapon konsentraatio virusseoksissa, joita on inkuboitu 37°C:ssa 30 min. Kaikki rasvahapot tutkittiin kaksinkertaisten laimennosten sarjana. Esitettyinä on kumpikin alhaisin konsentraatio, joka alensi VSV-tiitteriä ≥4,0 \log_{10} -yksiköllä korkeimmasta tutkitusta konsentraatiosta (butyyri-, kaproiini-, kapryyli-, palmitiini- ja steariinihappo).

^b VV, Visna-virus

^c hiiliatomit:kaksoissidoksia

^d ND, ei tehty

^e MM:n kanssa inkuboidun kontrolliviruksen tiitteri (\log_{10}) oli 5,5, kun taas mitään virusta ei todettu rasvahappo-virusseosten

laimennoksilla 10^{-2} - 10^{-5} . Ei ollut mahdollista tutkia näitä seoksia alhaisilla laimennoksilla (10^{-1} tai laimentamatta), koska ne olivat myrkyllisiä soluviljelmille. Olettaen, että laimennos 10^{-1} sisälsi infektiiviruksen, rasvahapposeoksen korkein mahdollinen tiitteri oli $10^{1,5}$ TCID₅₀, ja virustiitterin (log₁₀) lasku olisi 4,0 (5,5 miinus 1,5). Jos seosten tiitterit olisivat pienempiä kuin $10^{1,5}$, olisi tiitterin lasku suurempi kuin 4,0.

Taulukosta 2 voidaan nähdä, että lyhytketjuisilla (butyyri-, kaproiini- ja kapryyli-) ja pitkäketjuisilla (palmitiini- ja steariini-) rasvahapoilla ei ollut lainkaan tai oli hyvin pieni virustenvastainen vaikutus suurimmilla tutkituilla konsentraatioilla. Toisaalta keskipitkäketjuiset rasvahapot olivat kaikki virustenvastaisia, mutta eri konsentraatioilla. Taulukko 2 osoittaa pienimmän konsentraation, joka aiheuttaa 10 000-kertaisen laskun VSV-tiitterissä. 2 kertaa alhaisempi konsentraatio joko ei inaktivoi virusta tai aiheutti vain 10-kertaisen laskun tiitterissä. Samanlaisia tuloksia saatiin HSV-1:llä ja visna-viruksella, retroviruksella. Sitä vastoin polioviruksen inkubointi 37°C:ssa 30 min kapriini-, lauriini-, myristiini-, palmitoleiini-, öljy-, linoleiini-, linoleeni- ja arakidonihapoilla, joiden kaikkien konsentraatio oli 8 mg/ml, ei aiheuttanut merkittävää virustiitterin laskua verrattuna ilman rasvahappoja inkuboidun polioviruksen tiitteriin ($10^{4,7}$ TCID₅₀). Öljy- ja linoleenihappojen natriumsuoloilla oli samanlainen virustenvastainen vaikutus kuin vapailla hapoilla.

Muista lipolyysin tuotteista, esim. rasvahappojen 1-monoglyserideistä, tutkittiin myös virustenvastainen aktiivisuus, kuten seuraavassa taulukossa on esitetty:

Taulukko 3. Virusten inaktivointi ihmisen seerumissa inkuboidulla monoglyseridien kanssa 37°C:ssa 30 min

<u>Monoglyseridi</u>	<u>konsentraatio</u> <u>mg/ml (mM)</u>	<u>Virustiitterin</u> <u>lasku (log₁₀)</u>	
		<u>VSV</u>	<u>HSV-1</u>
Monokapryliini (8:0) ^b	2.0 (9)	≥4.0	ND ^c
Monokapriini (10:0)	0.5 (2)	≥4.0	≥3.7
Monolauriini (12:0)	0.25 (0.9)	≥4.0	≥3.7
Monomyristiini (14:0)	2.0 (13)	3.0	ND
Mono-oleiini (18:1)	1.0 (2.8 ^d)	2.3	ND
Monolinoleeni (18:2)	0.25 (0.7)	≥4.0	ND

^a Alhaisin konsentraatio, joka aiheutti ≥3,0 log₁₀ laskun virustiitterissä.

^b Hiiliatomit: kaksoissidoksia

^c ND, ei tehty

^d Korkein virustenvastainen aktiivisuus tutkituista konsentraatioista (0,5-4 mg/ml). Samat tulokset saatiin, kun monoglyseridi liuotettiin etanoliin ja laimennettiin suhteessa 1:100 MM:ään ennen lisäämistä virukseen.

Kaikki tutkitut monoglyseridit paitsi monomyristiini ja mono-oleiini olivat virustenvastaisia konsentraatioissa, jotka olivat 5-10 kertaa alhaisempia (mM) kuin vastaavien rasvahappojen konsentraatiot.

Ylläolevat kokeet äidinmaidolla, maidosta syntyneillä vatsan sisällöillä ja puhdistetuilla lipideillä osoittavat, että monoglyseridit ja rasvahapot, jotka ovat vapautuneet äidinmaidon triglyserideistä joko varastoinnin aikana tai maha-suolistoalueella, tappavat koteloituneita viruksia ja hyvin todennäköisesti toimivat in vivo suojaavassa roolissa rintaruokituilla lapsilla.

On tehty myös tutkimuksia virusinfektion inaktivoinnin vaatiman ajan määrittämiseksi. Virusta inkuboitiin monolauriinilla (12:0) ylläpitokasvualustassa:

TAULUKKO 3A

Ajan kulku virusten inaktivoinnissa

<u>Inkubointiaika (min)</u>	<u>HSV-tiitterin lasku</u>
30	≥4.0
10	≥4.0
5	≥4.0
1	≥4.0
0.5	≥4.0

Nämä tulokset osoittavat, että virusten tappaminen on nopeaa ja tapahtuu luultavasti, kun monoglyseridi tai vapaa rasvahappo tulee kosketuksiin viruksen kotelon kanssa. Linoleenihapon kanssa inkuboidusta VSV:stä negatiivisesti värjätyt elektronimikroskooppikuvat osoittivat, että pitoisuudella 0,5 mg/ml syntyi virusten koteloiden vuoto, joka mahdollisesti värin kulkeutumisen moniin partikkeleihin. Vaikutus oli paljon voimakkaampi 1 mg:lla linoleiinihappoa ml:aa kontti, jolloin aiheutui partikkeleiden hajoaminen.

Rasvahappojen vaikutus viruspartikkeleihin. Rasvahappojen vaikutuksen viruspartikkeleihin tutkimiseksi VSV konsentroidiin, puhdistettiin osittain, ja inkuboitiin sitten 37°C:ssa 30 min MM:ssä linoleenihapon kanssa tai ilman sitä. Ilman rasvahappoja inkuboidun viruksen negatiivivärjäys osoitti, että läsnä oli runsaasti tunnusomaisia luodinmuotoisia partikkeleita piikkien peittäminä ja sisältäen kierteisiä nukleokapseleita (kuva 5a). Inkubointi 0,5 mg:n kanssa linoleenihappoa ml:aa kohti aiheutti viruskoteloiden vuodon, jolloin väri pääsi sisään moniin partikkeleihin (kuva 5b). Vaikutus oli erittäin paljon suurempi käytettäessä 1 mg linoleenihappoa ml:aa kohti (kuva 5c), jolloin tapahtui partikkeleiden hajoaminen. Elektronimikroskooppia varten käytettyjen näytteiden titraus osoitti 10-kertaisen laskun virustiitterissä, kun oli käytetty 0,5 mg linoleenihappoa ml:aa

kohti, kun taas 1 mg/ml aiheutti ≥ 1000 -kertaisen laskun. Samanlaisia tuloksia saatiin negatiivisesti värjäämällä VSV, joka oli inkuboitu pienten konsentraatioiden kanssa arakidonihappoa.

Solukalvojen hajottaminen rasvahapoilla. Rasvahapoilla käsitellyn VSV:n negatiivivärjäys osoitti että virusten inaktivointi johtuu isäntäsolun plasmamembraanista peräisin olevan viruskotelon hajoamisesta. Vaikutuksen tutkimiseksi solukalvoihin inkuboitiin Vero-solujen tai lampaan sidekudosemosolujen yksisolukerroksia 37°C :ssa 30 min MM:ssä 1 mg:n kanssa linoleenihappoa ml:aa kohti tai ilman sitä, ja tutkittiin pyyhkäisylelektronimikroskoopilla. Kontrollisoluilla, joita inkuboitiin MM:ssä ilman rasvahappoja, oli ehjät solukalvot (kuva 6c), kun taas solukerroksissa, jotka oli käsitelty 1 mg:lla linoleenihappoa ml:aa kohti, olivat solukalvot osittain tai kokonaan hajonneet (kuva 6d), aiheuttaen solujen hajoamisen. Sama vaikutus oli nähtävissä inkuboimalla soluja äidinmaidon kanssa, jota oli varastoitu 4°C :ssa 4 päivää (kuva 6b). Tämä maitonäyte (nro 1) (taulukko 1) sisälsi 7 mg rasvahappoja ml:aa kohti ja se oli erittäin virustenvastainen. Toisaalta maitonäytteellä 1, jota oli säilytetty -86°C :ssa 4 päivää (taulukko 1) ei osoittautunut olevan mitään vaikutusta solukalvoihin (kuva 6a).

Kuvissa 5a-5c olevat mikrografit heijastavat VSV-partikkeleiden negatiivisen värjäytymisen osoittaen linoleenihappokäsittelyn vaikutuksen. Elektronimikroskooppiin käytettyjen näytteiden titteraus osoitti ≤ 10 -kertaisen laskun virustiitterissä 0,5 mg:lla linoleenihappoa ml:aa kohti, kun taas 1 mg/ml aiheutti ≥ 10000 -kertaisen laskun. Samanlaiset tulokset saatiin värjäämällä negatiivisesti VSV, jota oli inkuboitu pienten arakidonihappokonsentraatioiden kanssa.

Seuraavaksi tutkittiin olivatko virustenvastaisten rasvahappojen vaikutukset additiivisia, niin että muutos seoksen yhden virustenvastaisen komponentin konsentraatiossa voitiin kompensoida lisäämällä toisen rasvahapon määrää tai toista rasvahappoa. Tehtiin sellaisia rasvahapposeoksia, jossa yksittäisten rasvahappokonsentraatioiden oli todettu joko ei inaktivoivan virusta tai laskevan tiitteriä vähemmän kuin 10-kertaisesti. Seoksia inkuboitiin viruksen kanssa ylläpitokasvualustassa. Tulokset on esi-

tetty seuraavassa taulukossa:

Taulukko 4. Rasvahaposeosten virustenvastainen vaikutus

<u>Rasvahaposeos</u>	Kunkin rasvahapon —kons. (mg/ml)	Rasvahapojen kok. konsentri. (mg/ml)	VSV-tiitterin lasku (log ₁₀)
Kapriinih.	2	3	23.7
Lauriinih.	1		
<u>Lauriinih.</u>	1	2	23.7
Myristiinih.	1		
<u>Lauriinih.</u>	1	2	23.7
Öljyh.	1		
<u>Öljyh.</u>	1	1.5	23.7
Linoliuh.	0.5		
<u>Lauriinih.</u>	0.7		
Öljyh.	0.7	1.7	23.7
Linoliuh.	0.3		

Mahdollisuus valmistaa virustenvastaisia seoksia kasvualustasta ja pitkäketjuisista rasvahapoista osoittaa, että tasapaino voidaan saada keskipitkäketjuisten rasvahappojen suurten konsentraatioiden potentiaalisesti toksisten vaikutusten in vivo sekä virustenvastaisten pitkäketjuisten rasvahappojen puuttumisen välille sitomalla seerumin albumiiniin tai muihin veren proteiineihin.

Virustenvastaisten maitonäytteiden vaikutus HIV-tiittereihin.

Äidinmaito ja vatsan sisältönäytteet, joiden oli todettu tappavan HSV-1:tä ja VSV:tä, tutkittiin HIV:tä vastaan (AIDS-virus). Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa:

Taulukko 5. HIV:n inaktivointi virustenvastaisella äidinmaidolla

<u>Näyte</u>	<u>Säilytys</u>	<u>HIV-tiitterin lasku</u> <u>lasku (log₁₀)</u>
1	tuore	0
1A	4°C	5,0
2	tuore	0
2A	4°C	5,0
3	tuore	0
3A	4°C	3,5
4	tuore	0
4A	vatsan sisältö (3 h)	3,0

Mitä tulee kokeisiin muilla koteloituneilla viruksilla, HIV laimennettiin viisinkertaiseksi maidolla tai vatsan sisällöllä, joista oli poistettu sIgA. Sen vuoksi laimentamattoman näytteen anti-HIV-vaikutus on suurempi kuin 1000 - 10 000-kertainen lasku tiitterissä koeseoksessa. Tulokset osoittavat myös, että HIV on yhtä herkkä inaktivoinnille maidon lipideillä kuin muutkin tutkitut kotelovirukset. Sen vuoksi pitäisi olla mahdollista seuloa suuri joukko lipidiseoksia esimerkiksi HSV-1:tä vastaan, jota on paljon halvempaa tutkia kuin HIV:tä ja tutkia sitten vain lupaavimmat seokset HIV:tä vastaan.

Virustenvastaisen monoglyseridin vaikutus CMV-tiittereihin. Monokapriinin (10:0), jonka oli aikaisemmin todettu inaktivoivan

HSV-1:tä konsentraatiolla 2 mM, vaikutusta tutkittiin kolmea erilaista CMV-kantaa vastaan. Inkuboinnit suoritettiin ylläpito-kasvualustassa, joka sisälsi 10% seerumia. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa:

Taulukko 6. CMV:n inaktiivointi puhdistetulla lipidillä

<u>Tutkittu CMV-kanta</u>	<u>CMV-tiitterin lasku</u> <u>(log₁₀ TCID 50%)*</u>
AD 169	≥ 3,69
Espilat	≥ 3,50
Towne	≥ 2,67

* TCID 50% - Kudosviljelmälle infektiivisen annoksen 50%, ilmaistuna yksiköissä log₁₀.

Ylläolevat tulokset vahvistavat, että CMV sekä HSV-1, HIV ja muut kotelovirukset voidaan inaktivoida seerumipitoisessa kasvualustassa.

HSV-1:n monoglyseridi-inaktiivointi ihmisen seerumissa. HSV-1:ä lisättiin suoraan ihmisen seerumiin, ja virusten inaktiivointi mitattiin joko monokapriinin (10:0) tai monolauriinin (12:0) läsnäollessa. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa:

Taulukko 7. HSV-1:n inaktivoiminen ihmisen seerumissa

<u>Lisätty</u> <u>monoglyseridi*</u>	<u>Kons.</u> <u>(mg/ml)</u>	<u>HSV-1-tiitterin</u> <u>lasku (log₁₀)</u>
Kontrolli	-	0
Monokapriini	1	0,8
Monokapriini	2	1,8
Monokapriini	4	≥4,0
Monolauriini	1	0,8
Monolauriini	2	1,5
Monolauriini	4	2,0

* Inkubointiseos sisälsi ihmisen seerumia, HSV-1:ä (tiitteri 5,5) ja ilmoitettua monoglyseridiä.

Monolauriini konsentraatiolla 4 mg/ml laski seerumin HSV-1-tiitteriä vain 100-kertaisesti, kun taas monokapriini samalla konsentraatiolla laski viruksen tiitteriä ≥ 10.000 -kertaisesti. Suoritetuissa in vitro-kokeissa monolauriinilla oli enemmän virus-
tenvastaista vaikutusta konsentraatiopohjalta (mM) kuin monokapriinilla. Seerumin tulokset antavat aiheen olettaa, että epäspesifiset vuorovaikutukset seerumissa ja luultavasti plasmassa ja muissa verituotteissa ovat yhtä tärkeitä kuin oma virustenvastainen vaikutus, jotta voidaan määrittää, mitä monoglyseridejä lisätään ihmisen vereen ja verituotteisiin viruspatogeenien inaktivoimiseksi.

HSV-1:n inaktivointi monoglyserideillä lastenruokaseoksissa. Kun monoglyseridejä lisättiin toiseen monimutkaiseen nesteeseen, lastenruokaseokseen (Enfamil), erot HSV-1:n tuhoamisessa todettiin olevan samat kuin ne olivat ihmisen seerumissa. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa:

Taulukko 8. HSV-1:n tuhoaminen lastenruokaseoksessa

<u>Lisätty</u> <u>monoglyseridi</u>	<u>Kons.</u> <u>(mg/ml)</u>	<u>Lasku HSV-tiitterissä</u> <u>(log. o)</u>
Monokapriini	0,5	0
Monokapriini	1	0,3
Monokapriini	2	2,3
Monolauriini	0,5	0,3
Monolauriini	1	0,3
Monolauriini	2	1,0
Mono-oleiini	0,5	0
Mono-oleiini	1	0
Mono-oleiini	2	0
Monolinoleiini	0,5	0
Monolinoleiini	1	0,3
Monolinoleiini	2	0,5

* Inkubointiseos sisälsi ruokaseosta, HSV-1:ä (tiitteri 5,5), ja ilmoitettua monoglyseridiä.

Kuten edellä taulukossa 8 esitetyistä tuloksista voidaan nähdä, äidinmaitovastikkeessa, kuten ihmisen seerumissa, monokapriini näyttää olevan kaikkein tehokkain monoglyseridi koteloviruksia vastaan. Ylläpitokasvualustassa monolinoleiini tuotti saman laskun viruksen tiitteriin kuin monokapriini, mutta kolmasosakon-
sentraatiolla (mM). Monokapriini oli käytetyllä konsentraatiolla yli 60 kertaa tehokkaampi äidinmaitovastikkeessa kuin monolinoleiini.

Lisätyn monoglyseridin vaikutus RBC:hin ihmisen veressä. 3 mg/ml monokapriinia, jonka konsentraation oli aikaisemmin osoitettu olevan virustenvastainen, lisättiin ihmisen kokoverinäytteisiin, ja punaisten verisolujen lukumäärää verrattiin niiden määrään samassa näytteessä ennen lipidin lisäämistä. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa:

Taulukko 9. Punasolujen stabiilisuus lisätylle monoglyseridille

<u>Näyte</u>	<u>Punasolut*</u>	
	<u>Ei käsit.</u>	<u>Käsitelty</u>
1	4.59	4.46
2	5.10	4.78
3	5.30	5.19
4	4.94	4.74
5	5.08	4.36

* Yksikköä - $10^3 / \text{mm}^3$

Tulokset osoittavat, että monokapriinin konsentraatio, joka tappaa $\geq 4,0 \log_{10}$ koteloviruksesta lisättynä ihmisen seerumiin, ei hajota RBC:tä kokoveressä.

Äidinmaidon ja puhdistettujen monoglyseridien antibakteerinen vaikutus. Rasvahapot ja monoglyseridit ovat antibakteerisia sekä virustenvastaisia. Mahaintuboinnilla saadusta lapselle syötettyä äidinmaidosta peräisin olevasta vatsansisällöstä (toimittanut Dr. William C. Heird, Columbia Presbyterian Medical Center) tutkittiin antibakteerinen vaikutus Staphylococcus epidermitistä (gram+), Escherichia colia (gram-) ja Salmonella enteritistä (gram-) vastaan. Katso seuraava taulukko:

Taulukko 10. Äidinmaidon syöttämisen jälkeen syntyneen vatsan
sisällön virusten vastainen ja antibakteerinen vaikutus

Näyte	1 h:n ikäisen vatsansis.			
	aih. lasku (log ₁₀) HSV-1-tiitterissä	<u>S. epidermidis</u>	<u>E. coli</u>	<u>S. enteritidis</u>
1	≥4.0	-	≥5.0	-
2	≥4.0	≥5.0	≥4.0	≥4.0
3	≥4.0	≥4.0	-	-
4	≥4.0	-	-	-

1 tunnin ikäisen vatsansis.
 aiheuttama log₁₀-lasku bakt.tiitt.**

* Maidoista itsestään tutkittiin kaikista virustenvastainen ja bakteereiden vastainen vaikutus, ja mitään ei todettu.

** Jokaisesta näytteestä ei tutkittu vaikutusta kaikkia bakteerikantoja vastaan, koska vatsansisältöä ei ollut riittävästi.

Vatsansisällöt, jotka olivat virustenvastaisia, olivat myös antibakteerisia, tappaen sekä gram+ että gram- -bakteereita. Koska äidinmaito sisältää sekä keskipitkaketjuisia että pitkäketjuisia rasvahappoja, määritettiin seuraavaksi, olivatko gram+ ja gram- bakteerit yhtä herkkiä erilaisille ketjunpituuksille. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa.

Taulukko 11. Gram+ ja gram- -bakteereiden inaktivointi monoglyserideilläBakteerikonsentraation lasku (\log_{10})Monoglyseridi¹

Monokapryloyyli (8:0)	≥5.0	-	≥8.0	≥4.0	-
Monokapriini (10:0)	≥5.0	-	≥8.0	≥4.0	4.5
Monolauriini (12:0)	0	0	≥8.0	≥4.0	4.5
Mono-oleiini (18:1)	0	0	-	≥4.0	-
Monolinoleiini (18:2)	-	-	-	-	4.5
Monoeikosenoini (20:1)	0	0	-	≥4.0	-

1 Kutakin monoglyseridiä käytettiin 2 mg/ml.

2 Gram-

3 Hemophilus influenzae

4 Gram+

Gram-positiiviset bakteerit inaktivoituivat vertailukelpoisesti keskipitkaketjuisilla tyydyttyneillä ja pitkaketjuisilla tyydyttymättömillä monoglyserideillä. Pitkaketjuiset tyydyttymättömät rasvahapot ja monolauriini eivät kuitenkaan vaikuttaneet gram-negatiivisiin bakteereihin E. coli ja S. enteritidis. H. influenzae inaktivoitui monolauriinilla, joten eri gram-negatiivisten bakteereiden välillä on erilainen herkkyys monoglyserideille. Erot bakteerien inaktivoinnissa voivat johtua bakteerin seinämästä, kalvosta, tai molemmista. Pyyhkäisyelektronimikrografi (ei esitetty) S. epidermitiksestä monolauriinilla käsiteltynä osoittivat, että bakteerit olivat täysin hajonneet. On sen vuoksi mahdollista manipuloida monoglyseridejä ja niiden konsentraatioita hajottamaan joitakin membraaneja ja jättämään toisia ehjäksi.

Äidinmaito tulee virustenvastaiseksi ei vain säilytyksessä, vaan myös lapsen vatsassa muutaman tunnin kuluessa syömisestä. Virustenvastaisen vaikutuksen ilmeneminen varastoidussa maidossa liittyy maidossa olevan lipoproteiinilipaasin määrään, joka osoittaa, että se aiheutuu rasvahappojen tai muiden lipidien hydrolyysituotteiden vapautumisesta. Samanlaisia tuloksia ovat aikaisemmin raportoineet Welsh et al. (I), (II). Tässä olevat tiedot osoittavat, että säilytetyn äidinmaidon virustenvastainen vaikutus aiheutuu lipolyysistä, ja yhdeksästä äidinmaidossa tavallisimmin löydettävissä olevasta rasvahaposta seitsemän on erittäin aktiivisia tappamaan koteloituneita viruksia. Monityydyttymättömät pitkäketjuiset rasvahapot olivat aktiivisimpia, mutta keskipitkäketjuiset tyydyttyneet rasvahapot, erityisesti lauriini- ja myristiinihapot, olivat myös aktiivisia. Monokapriini ja monolauriini olivat aktiivisia kymmenen kertaa pienempinä konsentraatioina kuin vastaavat vapaat hapot, mutta monomyristiini oli sen mukaisesti vähemmän aktiivinen. Pitkäketjuiset tyydyttyneet rasvahapot, jotka muodostavat noin 30% äidinmaidon rasvahapoista, sekä lyhytketjuiset rasvahapot, jotka ovat tavallisimpia lehmänmaidossa, eivät olleet virustenvastaisia tai olivat sitä vain hyvin vähän. Rasvahappojen konsentraatiot, joiden todettiin laskevan virustiittereitä $\geq 10\ 000$ -kertaisesti in vitro (taulukko 2) ovat samaa luokkaa kuin äidinmaidossa löydetyt rasvahappokonsentraatiot. Tulokset osoittavat, että kun maidon triglyseridien lipolyysi etenee, joko säilytyksen aikana tai mahasuolistoalueella, syntyy kahdentyyppisiä virustenvastaisia lipideitä, monoglyseridejä ja vapaita rasvahappoja. On mahdollista, että näiden kahden lipidiluokan tehokkuus suoliston patogeeneja vastaan on erilainen. Tämä voi myös pitää paikkansa muiden lipidiluokkien jäsenillä.

Tulokset ovat samanlaisia kuin aikaisemmissa tutkimuksissa erilaisilla viruksilla ja vahvistavat edelleen useimpien maidossa olevien rasvahappojen merkittävän virustenvastaisen vaikutuksen. Elektronimikroskooppitutkimus osoittaa, että virustenvastainen vaikutus aiheutuu ensisijaisesti rasvahappojen avulla tapahtuvasta viruskotelon hajoamisesta. Samanlaisista löydöksistä ovat raportoineet Sarkar et al., jotka käsittelivät hiiren nisäsyöpävirusta äidinmaidon kermafraktiolla ja havaitsivat viruskotelon

hajoamista. Tämän keksinnön puitteissa tehdyt tutkimukset osoittavat myös viljeltyjen solujen plasmamembraanin hajoamisen rasvahappojen ja varastoidun äidinmaidon avulla, jotka inaktivoivat koteloituneita viruksia. Rasvahappojen ja monoglyseridien, joiden on todettu olevan voimakkaasti virustenvastaisia, osoitettiin aiheuttavan solukalvojen fuusioitumista. Vaikka tarkka mekanismi ei ole selvillä, on esitetty, että rasvahapot ja niiden monoesterit liittyvät lipidimembraaniin aiheuttaen kaksoiskeroksen destabiloitumisen. Samanlainen mekanismi saattaisi johtaa solukalvojen ja viruskoteloiden täydelliseen hajoamiseen, joka tässä hakemuksen tutkinnossa todettiin. Viljeltyjen solujen ja koteloituneiden virusten herkkyttä ei verrattu erilaisilla rasvahappojen konsentraatioilla.

Useat tutkimukset ovat osoittaneet infektioiden, erityisesti maha-suolistoalueen infektioiden, vähäisyyden rintaruokituissa lapsissa verrattuna pulloruokittuihin lapsiin. Kuitenkaan maidon rasvahappojen ja niiden johdannaisten osuutta vauvojen suojaamisessa sairauksia vastaan ei ole vahvistettu, huolimatta hyvin tunnetusta mikrobinvastaisesta vaikutuksesta in vitro. Vaikka useimmat tunnetut maha-suolistoalueen virukset ovat ei-koteloituneita, kuolioita aiheuttavan suolitulehduksen aiheuttaa koteloitunut virus, s.o. ihmisen suolikoronavirus. Giardia lamblia, lapsia infektoiva suoliston prototsoan parasiitti, kuolee maidon rasvahappojen vaikutuksesta in vitro, antaen aiheen olettaa, että rasvahapoilla on suolistossa mahdollisesti giardiasidinen vaikutus. Koska rasvahapot hajottavat soluja rikkomalla niiden plasmamembraaneja, on todennäköistä, että ne eivät tapa ainoastaan giardiaa, vaan myös muuta parasiittiprototsoaa. Vaikka muutamaiset tutkimukset ovat osoittaneet ihmisen ja eläimen maidonjuomisen jälkeisen vatsansisällön antimikrobisen vaikutuksen, tarvitaan paljon lisää työtä aktiivisten tekijöiden karakterisoinniseksi ja niiden roolin vahvistamiseksi maha-suolistoalueen infektioiden ehkäisyssä ja parantamisessa.

Keksinnön alueeseen kuuluu se, että rasvahappoja ja/tai niiden monoglyseridejä käytetään virustenvastaiseen ja/tai bakteereidenvastaiseen vaikuttamiseen. Käytetyt yhdisteet voidaan valita ryhmästä, johon kuuluvat tyydyttyneet tai tyydyttymättömät rasvahapot, joissa on 4-22 hiiliatomia, sekä mainittujen happojen

kanssa muodostuneet glyseroliesterit. Edullisia yhdisteitä ovat tyydyttyneet rasvahapot, joissa on 4-14 hiiliatomia, erityisesti 6-14 hiiliatomia, ja niiden monoglyseridit. Erityisen edullisia ovat C_7 - C_{12} -rasvahappomonoglyseridit, joko yksinään tai seoksina. Keksinnön mukaan käyttökelpoisia ovat mono- tai monityydyttymättömät rasvahapot, joissa on 14 tai 16-22 hiiliatomia, erityisesti 14-18, 16-18 tai 16-20 hiiliatomia, tai niiden monoglyseridit. Yllämainitut hiiliatomien rajat sisältävät rasvahapot, joissa on pariton hiiliatomien lukumäärä.

Keksintöön kuuluu myös rasvahappojen eetteri- ja/tai lysofosfatidyylikoliinijohdannaisten käyttäminen, joilla on virustenvastainen ja/tai bakteereidenvastainen vaikutus. Käyttökelpoisilla rasvahappojohdannaisilla olisi esimerkiksi eetterisidos rasvahapon ja glyserolin välillä. Esimerkkejä tällaisista yhdisteistä ovat 1-O-dekyyli-SN-glyseroli, 1-O-lauryyli-SN-glyseroli, 1-O-oktyyli-SN-glyseroli ja 1-O-oleyyli-SN-glyseroli. Käyttökelpoisia lysofosfatidyylikoliinijohdannaisia ovat esimerkiksi L- α -lysofosfatidyylikoliinikaproyyli, L- α -lysofosfatidyylikoliinidekanoyyli ja L- α -lysofosfatidyylikoliinilaurooyyli. Keksinnön mukaan käyttökelpoisia rasvahappoja voidaan myös käyttää farmakologisesti sopivien suolojensa, kuten alkalimetallisuolojen muodossa. Käyttökelpoisia esimerkkejä näistä suoloista ovat natrium- ja litiumsuolat.

Keksinnönmukaisia yhdisteitä voidaan käyttää yksinään tai seoksina. On esimerkiksi edullista, että 1-6, erityisesti 1-4 yhdistettä, voidaan antaa samanaikaisesti.

Tulokset tutkimuksista, jotka kertovat monoglyseridieetterien ja lysofosfatidyylikoliinijohdannaisten käyttökelpoisuudesta, on esitetty seuraavissa taulukoissa:

Taulukko 12. Rakkulaisen suutulehdusviruksen inaktivointi monoglyseridieettereillä ihmisen plasmassa¹

<u>Monoglyseridi- eetteri</u>	<u>Konsentr. (mM)</u>	<u>Natriumtauro- kolaatti(10 mM)</u>	<u>VSV-tiitt. lasku(log₁₀)</u>
1-O-dekyyli-SN- glyseroli ³	5	+	0
1-O-oktyyli-SN- glyseroli ²	10	-	≥4,0
	10	-	2,0
1-O-oktyyli-SN- glyseroli	15	-	≥4,0
1-O-oktyyli-SN- glyseroli	5	+	≥4,0
	10	-	1,3
	15	-	≥4,0
1-O-oleyyli-SN- glyseroli ⁴	5	-	0
	10	-	0
	15	-	0

¹ Inkubointi suoritettiin 37°C:ssa 30 minuuttia

² 8 hiilen eetteri

³ 10 hiilen eetteri

⁴ 18 hiilen eetteri

Taulukko 13. Mönoglyseridiestereiden ja eettereiden virustenvastainen vaikutus on additiivinen¹

Eetteri (hiiltä)	Kons. (mM)	Esteri (hiiltä)	Kons. (mM)	Natrium- taurokoko- laatti	Kons. (mM)	YSV-tiitti- asku (log ₁₀)
8	5	8	5	-	5	0
8	7.5	8	7.5	-	7.5	3.7
8	5	8	5	+	5	≥4.0
8	2.5	8	2.5	+	2.5	≥4.0
10	5	10	5	-	5	2.0
10	7.5	10	7.5	-	7.5	1.8
10	5	10	5	+	5	≥4.0
10	2.5	10	2.5	+	2.5	≥4.0
8	2.5	8	2.5)	-	2.5)	1.3
10	2.5	10	2.5)	-	2.5)	
8	2.5	8	2.5)	+	2.5)	≥4.0
10	2.5	10	2.5)	+	2.5)	≥4.0

¹ Inkuboitiin 37°C:ssa 30 min ihmisen plasmassa.

Taulukko 14. Ajan kulku inaktivoitaessa VSV:tä 37°:ssa ihmisen plasmassa 15 mM:lla 1-O-oktyyli-SN-glyserolia

<u>Inkubointiaika (min)</u>	<u>Lasku VSV-tiitterissä (log₁₀)</u>
2,5	0
5	≥4,0
10	≥4,0
15	≥4,0
30	≥4,0

8 hiilen ja 10 hiilen monoglyseridieetterit ovat juuri yhtä tehokkaita kuin luonnossa esiintyvät esterit, ja itse asiassa 8 hiilen johdannainen näyttää olevan jonkin verran enemmän virustenvastainen kuin 8 hiilen esteri. 18 hiilen esterissä (taulukko 12) näytti olevan sama virustenvastaisen vaikutuksen puuttuminen kuin ihmisen plasmassa olevassa esterissä.

Taulukko 15. Lysofosfatidyylikoliinijohdannaisten virustenvastainen vaikutus

<u>Lipidi</u>	<u>Kons. (mM)</u>	<u>Natriumtaurokolaatti (mM)</u>	<u>Log₁₀-lasku VSV-tiitterissä</u>
L- α -lysofosfatidyylikoliinikaproyyli (8C)	5	+	0
	5	-	0
	10	+	0
	10	-	0
	15	+	1.0
	15	-	0
L- α -lysofosfatidyylikoliinidekanoyyli (10C)	5	+	1.7
	5	-	1.7
	10	+	1.7
	10	-	1.0
L- α -lysofosfatidyylikoliinilaurooyyli (12C)	5	+	1.7
	5	-	1.2
	10	+	2.0
	10	-	2.0

Edellämainittujen rasvahappojen ja/tai monoglyseridien (estereiden) aktiivisuutta voidaan lisätä siten, että mukana on veren entsyymilipaasin (LPL) inhibiittoreita. LPL hajottaa edulliset rasvahappomonoglyseridit niissä oleviksi vapaiksi rasvahapoiksi ja glyseroliksi, mikä on merkittävää, koska samalla kun vapaat rasvahapot ovat myös virustenvastaisia, niitä tarvitaan paljon suurempi konsentraatio kuin vastaavia monoglyseridejä, jotta ne olisivat tehokkaita ihmisen veressä. LPL-inhibiittorit vähentävät tai poistavat tätä hajoamista. Käyttökelpoisia LPL-inhibiittoreita ovat esimerkiksi seuraavat:

- 1) Sappisuolat ja -hapot ja konjugoidut sappisuolat ja -hapot, konsentraatioina noin 1 nM - 1 M. Esimerkki konjugoiduista sappihapoista on taurokoolihappo, jonka natrium- ja litiumsuolat ovat helposti saatavissa. Sappisuolat ovat myös detergenttejä, ja siksi niillä on enemmän virustenvastaista vaikutusta;
- 2) Natriumkloridi, konsentraatioina noin 1 μ M - 10 M; ja
- 3) Protamiinikloridi tai -sulfaatti, konsentraatioina noin 1 nM - 1 M.

Kun LPL-inhibiittoreita käytetään esimerkiksi keksinnönmukaisten monoglyseridien kanssa, niitä voidaan käyttää mM:mM-suhteessa noin 1:1 - 1:6, perustuen käytettyyn monoglyseridiin tai monoglyserideihin. Edullisesti tämä suhde on noin 1:1,5 - 1:4.

Esimerkiksi konjugoidun sappihapon taurokoolihapon (natrium-suola) tehokkuuden esittämiseksi valmistettiin inkubointiseos, joka sisälsi herpes simplex virus-1:ä (tiitteri) 5,5, ja monoglyseridiä. Joihinkin näytteisiin lisättiin 12 mM (lopullinen konsentraatio) natriumtaurokolaattia. Tulokset olivat seuraavat:

Taulukko 16

<u>Lisätty</u> <u>monoglyseridi</u>	<u>Natrium-</u> <u>taurokolaatti</u>	Lasku herpes simplex- virus-1:n tiitterissä <u>(log₁₀)</u>
1-monokapryloyyli- rac-glyseroli (8:0)	+	≥4,0
7,5 mM	-	0
1-monodekanoyyli- rac-glyseroli (10:0)	+	≥4,0
7,5 mM	-	0
1-monodekanoyyli- rac-glyseroli (10:0)	+	≥4,0
15 mM	-	3,0

Suoritettiin analogisia menetelmiä natriumtaurokolaatin tehokkuuden tutkimiseksi ihmisen seerumissa. Tulokset on esitetty seuraavissa taulukoissa:

Taulukko 17

<u>1-monokapryloyyli- rac-glyseroli</u> (mM)	<u>1-monodekanoyyli- rac-glyseroli</u> (mM)	<u>Natrium- taurokolaatti</u> (mM)	<u>VSV-tiitterin lasku (log₁₀)</u>
7.5	-	12	≥5.0
-	7.5	12	≥5.0
7.5	-	10	≥5.0
-	7.5	10	≥5.0
7.5	-	8	≥5.0
-	7.5	8	≥5.0
7.5	-	6	≥5.0
-	7.5	6	≥5.0
7.5	-	4	4.0
-	7.5	4	≥5.0
7.5	-	2	≥3.0
-	7.5	2	≥5.0
7.5	-	0	≥1.0
-	7.5	0	1.0

Taulukko 18

<u>1-monolaurooyyli-rac glyseroli</u> (mM)	<u>Natrium- taurokolaatti</u> (mM)	<u>VSV-tiitterin lasku</u> (log ₁₀)
15	10	≥5.0
15	-	0
7.5	10	≥5.0
7.5	-	0
5	10	≥5.0
5	-	0
4	10	≥5.0
4	-	0
3	10	≥5.0
3	-	0

Taulukko 17 osoittaa, että kun 1-monokapryloyyli-rac-glyserolia ja 1-monodekanoyyli-rac-glyserolimonoglyseridejä käytetään vaihtelevien konsentraatioiden kanssa natriumtaurokolaattia, 1-monodekanoyyli-rac-glyseroli on tehokas käytettynä niinkin alhaisilla konsentraatioilla kuin 2 mM natriumtaurokolaattia, kun taas 1-monokapryloyyli-rac-glyseroli tarvitsee ainakin 6 mM natriumtaurokolaattia ollakseen tehokas. 1-monokapryloyyli-rac-glyserolimonoglyseridi on silti todennäköisemmin sellainen, jota käytetään tuotteessa, koska se on liukoisempi.

Taulukko 18 esittää, että 1-monolaurooyli-rac-glyserolimonoglyseridi tappaa myös rakkulaista suutulehdusta aiheuttavan viruksen niinkin alhaisilla konsentraatioilla kuin 3 mM, kun läsnä on 10 mM natriumtaurokolaattia. Myös taulukko 18 osoittaa, että virusten tappaminen 1-monolaurooyli-rac-glyserolimonoglyseridillä tapahtuu vain kun läsnä on natriumtaurokolaattia.

Suoritettiin lisätutkimuksia natriumtaurokolaatin tehokkuuden osoittamiseksi ihmisen plasmassa. Tulokset olivat seuraavat:

Taulukko 19

<u>1-Monokapryloyyli-rac glyseroli (mM)</u>	<u>1-Monodekanoyyli- rac-glyseroli (mM)</u>	<u>Natrium- taurokolaatti (1 mM)</u>	<u>VSV-tiitt. lasku (log₁₀)</u>
4	-	10	2.0
4	-	-	0
7.5	-	10	≥4.0
7.5	-	-	1.0
15	-	10	≥4.0
15	-	-	2.0
-	4	10	1.0
-	4	-	0
-	7.5	10	≥4.0
-	7.5	-	1.0
-	15	10	≥4.0
-	15	-	≥4.0

Lisääntynyt virustenvastainen aktiivisuus natriu- tai litiumtaurokolaatin läsnäollessa ei johdu vain LPL-inhibiitiosta, vaan myös näiden yhdisteiden detergenttiaktiivisuudesta. Itse asiassa jäljessä esitetyt tulokset osoittavat, että fosfaattipuskurissa niinkin vähäinen määrä kuin 5 mM natriumtaurokolaattia voi inaktivoida VSV:tä. Ihmisen plasmassa tarvitaan kuitenkin natriumtaurokolaatin konsentraatio, joka on ainakin 20 mM, tappamaan $\geq 4,0 \log_{10}$ VSV:stä, ja siksi taurokolaattia itseään ei välttämättä haluta käyttää verensiirtoon käytettävissä ihmisen veressä ja verituotteissa.

Taulukko 20. VSV:n inaktivoiminen natriumtaurokolaatilla fosfaattipuskurissa ja ihmisen plasmassa

Natriumtaurokolaatti (mM)	VSV-tiitterin lasku (\log_{10})	
	fosfaatti- puskuri	plasma
0	0	0
2.5	1.0	0
5	≥ 4.0	0
10	≥ 4.0	0
15	≥ 4.0	1.0
20	≥ 4.0	3.7

LPL-inhibiittorien tärkeys monoglyseridien virustenvastaisessa aktiivisuudessa riippuu endogeenisestä LPL-aktiivisuudesta kussakin verinäytteessä. Koska LPL-aktiivisuus on muuttuva ja jokaisesta verinäytteestä ei tutkita LPL-aktiivisuutta, saattaisi olla edullista lisätä LPL-inhibiittoreita ja monoglyseridejä jokaiseen kliniseen verinäytteeseen maksimaalisen virustenvastaisen vaikutuksen varmistamiseksi. Myös koska litiumtaurokolaatin lisäys ei häiritse mitään tutkittuja klinisiä kokeita, se antaa virustenvastaisen aktiivisuuden ilman haittoja.

Rasvahapot ja niiden monoglyseridit ovat helposti saatavia. Jos on tarpeen, haluttuja monoglyseridejä voidaan valmistaa vastavasta rasvahaposta tai hapoista esteröimällä glyserolin kanssa tunnettujen menetelmien mukaan.

Yllä kuvatuilla yhdisteillä on osoitettu virustenvastainen ja/tai bakteereidenvastainen aktiivisuus. Tähän keksintöön kuuluu se, että virus- tai bakteeripitoista kasvualustaa, kuten verta, voidaan käsitellä tehokkaalla määrällä yhtä tai useampaa rasvahappoa ja/tai niiden monoglyseridiä. Keksintöön kuuluu myös se, että ihmistä tai lämminveristä eläintä, jolla on viruksen tai bakteerin aiheuttama tila, voidaan hoitaa mainitun tilansa vuoksi antamalla keksinnön mukaista koostumusta.

Hoito- tai ennaltaehkäisy tarkoituksessa voidaan yhtä tai useampaa tässä kuvattua yhdistettä antaa ihmiselle tai lämminveriselle eläimelle oraalisesti, parenteraalisesti, suonensisäisesti, paikallisesti tai peräsuolen kautta vaikuttavana aineosana tavanomaisissa farmaseuttisissa koostumuksissa, t.s. koostumuksissa, jotka sisältävät olennaisesti inertin farmaseuttisen kantajan ja tehokkaan määrän vaikuttavaa aineosaa, kuten tabletit, päällystetyt pillerit, kapselit, vohvelit, jauheet, liuokset, suspensiot, emulsiot, peräpuikot, voiteet ja vastaavat. Tehokas määrä tällaiseen käyttöön tämän keksinnön yhdisteitä olisi yleensä noin 0,001 - 4 mg/painokilo, edullisesti noin 0,01 - 3 mg/painokilo, 1-4 kertaa päivässä.

Luonnossa esiintyvät esterijohdannaiset ovat virustenvastaisia eivätkä häiritse tutkittuja kliinisiä kokeita lukuunottamatta triglyseridien määrityksiä. Koska triglyseridikonsentraatio määritetään rasvahappojen entsyymaattisella vapautumisella glyserolirungosta, monoglyseridit vievät nämä mittaukset yli asteikon liian korkealle. Käyttämällä eetterisidoksia mieluummin kuin esterisidoksia, pysyvät rasvahapot sitoutuneina glyserolirunkoon, koska lipaasit eivät vaikuta eetterisidoksiin, eikä triglyseridimäärityksiin näin vaikuteta.

Koska, kuten edellä on osoitettu, natriumtaurokolaatti on tehokas LPL-inhibiittorina ja sillä on virustenvastainen vaikutus, ovat muut fysiologisesti sopivat suolat, kuten litiumsuolat, huomionarvoisia. Käyttämällä litiumtaurokolaattia natriumsuolan sijasta eliminoidaan kaikki häiriöt veren natriummäärityksissä. Joissakin tutkimuksissa monoglyseridieetterin ja litiumtaurokolaatin yhdistelmä on liikaa siihen, mitä tarvitaan inaktivoimaan

$\geq 4 \log_{10}$ mitä tahansa kotelovirusta kaikissa tutkituissa verissä ja verituotteissa.

Lisätutkimus on osoittanut monoglyseridiesterien ja eetterin tehokkuuden valkoisten verisolujen kokonaiskonsentraatioon ihmisen kokoveressä. Mainitun tutkimuksen tulokset ovat seuraavat:

Taulukko 21. Ihmisen kokoveressä olevien valkoisten verisolujen stabiilisuus lisätylle lipidille

<u>Näyte</u>	<u>Konsentraatio (mM)</u>	<u>Valkosolujen kokon.määrä</u>
Kontrolli	--	6,4
1-monokapryloyyli-rac-glyseroli	15	2,4
1-O-oktyyli-SN-glyseroli	15	0,6
1-monodekanoyyli-rac-glyseroli	15	0,7
1-O-dekyyli-SN-glyseroli	15	1,31

Keksinnön selvittämiseksi edelleen tulisi huomata, että ihmisen vereen ja ihmisen seerumiin lisätyillä monoglyserideillä, joiden on havaittu inaktivoivan läsnäolevia viruksia, ei ole kuitenkaan mitään haitallisia vaikutuksia seerumiin tai punasoluihin. Tämä on erityisen mielenkiintoista verenkäsittelymenetelmissä ja laitteissa.

8-10 hiiltä sisältävä monoglyseridi (MG) ei konsentraatiolla 4 mg/ml häirinnyt 17 kaupallisesti saatavaa Abbottin diagnoosikoepakkausta ja MA:n Bioproduct-koepakkausta. Tutkitut Abbottin pakkaukset olivat HBsAg (hepatiitti B:n pinta-antigeeni); Anti-HBc (anti-hepatiitti B:n ydinantigeeni); Anti-HBs (anti-hepatiitti B:n pinta-antigeeni); Anti-HBcIgM (anti-hepatiitti B:n ydin-IgM); Anti-HAVIgM (hepatiitin Be-antigeeni); Anti-HBe (anti-hepatiitti Be-antigeeni); Anti-delta hepatiitti. Tutkitut MA:n Bioproduct-ELISA-pakkaukset olivat: sikotaudin vasta-aine; Herpes simplex tyyppin I vasta-aine; Herpes simplex tyyppin II vasta-aine; toksoplasmoosin vasta-aine; CMV-vasta-aine; vihuri-rokon vasta-aine, tuhkarokon vasta-aine; ja klamydian vasta-aine. Positiiviset ja negatiiviset koetulokset pysyivät vakioina kontrollin ja MG-käsiteltyjen näytteiden joukossa. Koetulokset olivat seuraavat:

(1) HBsAg (hepatiitti B:n pinta-antigeeni)-koe

	HBsAg		
	<u>Käsitlemätön</u> ¹	<u>EtOH</u> ²	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u> ³
Potilas #1 (positiivinen)	129	139	145
Potilas #2 (positiivinen)	39.4	38	30
Potilas #3 (negatiivinen)	0.89	0.60	0.82
Kontr. A (-) ⁴	79		
Kontr. B (+) ⁴	5,600		

¹ Käsitlemätön: käytetään seerumia tai kontrolleja lisäämättä mitään

² EtOH: lisätään 1 μ l EtOH 100 μ l:aan seerumia ja sekoitetaan tämä seos vorteksoimalla ennen kokeen suorittamista.

³ Käsitelty: lisätään 1 μ l EtOH-pitoista MG:ä 100 μ l:aan seerumia ja sekoitetaan tämä seos vorteksoimalla ennen kokeen suorittamista

⁴ sekä positiiviset että negatiiviset kontrollinäytteet eivät tarvinneet käsittelyä. Sen vuoksi käytettiin samoja kontrolleja kuin säännöllisissä suorituksissa.

(2) Anti-HBC (anti-hepatiitti B:n ydinantigeeni)Anti-HB ydin

	<u>Käsittelemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #4 (positiivinen)	33	28	22
Potilas #5 (positiivinen)	42	41	33
Potilas #6 (negatiivinen)	0.73	0.60	0.54
Kontr. A (-)	1.9		
Kontr. B (+)	0.06		

(3) Anti-HBsAg (anti-hepatiitti B:n pinta-antigeeni)HBsAg

	<u>Käsittelemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #7 (positiivinen)	227	247	313
Potilas #8 (positiivinen)	48.3	51	61
Kontr. A (-)	79		
Kontr. B (+)	5,926		

(4) Anti-HBcIgM (anti-hepatiitti B:n ydin-IgM)

	<u>Anti-HB-ydin-IgM</u>		
	<u>Käsittelemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #9 (positiivinen)	1.045	1.014	1.176
Potilas #10 (positiivinen)	1.024	1.243	1.044
Potilas #11 (negatiivinen)	0.146	0.124	0.038
Kontr. A (-)	0.581		
Kontr. B (+)	1.058		

(5) Anti-HAV IgM (anti-hepatiitti A:n IgM)

	<u>HAVAB IgM</u>		
	<u>Käsittelemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #12 (positiivinen)	0.548	0.593	0.586
Potilas #13 (positiivinen)	0.359	0.322	0.334
Potilas #14 (negatiivinen)	0.047	0.054	0.051
Kontr. A (-) #0.037	0.083		
Kontr. B(+) #1.025	1.187		

(6) Anti-HAV (anti-hepatiitti A-virus)HAVAB

	<u>Käsittelemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #15 (positiivinen)	0.028	0.039	0.027
Potilas #16 (positiivinen)	0.020	0.019	0.023
Potilas #17 (negatiivinen)	1.303	1.173	1.110
Kontr. A (-)	1.170		
Kontr. B (+)	0.18		

(7) HBeAg (hepatiitti Be-antigeeni)HBeAg

	<u>Käsittelemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #18 (positiivinen)	0.849	0.853	0.752
Potilas #19 (positiivinen)	0.778	0.945	0.955
Potilas #20 (negatiivinen)	0.020	0.015	0.095
Kontr. A (-)	0.078		
Kontr. B (+)	0.987		

(8) Anti-HBe (anti-hepatiitti Be-antigeeni)

	<u>Anti-HBe</u>		
	<u>Käsittelemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #21 (positiivinen)	0.060	0.053	0.058
Potilas #22 (positiivinen)	0.064	0.070	0.061
Potilas #23 (negatiivinen)	0.364	0.524	0.417
Kontr. A (-)	0.619		
Kontr. B (+)	0.088		

(9) Anti-delta hepatiitti

	<u>Anti-Delta</u>		
	<u>Käsittelemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #24 (positiivinen)	0.018	0.022	0.029
Potilas #25 (positiivinen)	0.030	0.030	0.033
Potilas #26 (negatiivinen)	0.716	0.768	0.942
Kontr. A (-)	1.166		
Kontr. B (+) ‡	0.028		

(10) MA Bioproduct ELISA-koe sikotaudin vasta-aineelle

	<u>Käsitlemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #27 (+)	3.44	5.30	4.15
Potilas #28 (+)	6.04	6.43	6.06
Potilas #29 (+)	0.545	0.446	0.537
Kontr. A (+)	5.39		
Kontr. B (-)	0.136		

(11) MA Bioproduct ELISA-koe herpes simplex-tyypille I

	<u>Käsitlemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #30 (+)	1.22	0.970	1.15
Potilas #31 (+)	0.920	0.820	0.810
Potilas #32 (+)	0.060	0.060	0.070
Kontr. A (+)	0.530		
Kontr. B (-)	0.070		

(12) MA Bioproducts ELISA-koe herpes simplex-tyypille II

	<u>Käsitlemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #33 (+)	1.600	1.600	1.550
Potilas #34 (+)	0.350	0.320	0.270
Potilas #35 (+)	0.040	0.045	0.050
Kontr. A (+)	0.530		
Kontr. B (-)	0.040		

(13) MA Bioproduct ELISA-koe toksoplasmoosivasta-aineelle

	<u>Käsitlemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #36 (+)	1.300	1.110	1.240
Potilas #37 (+)	1.310	1.290	1.350
Potilas #38 (+)	0.070	0.000	0.000
Kontr. A (+)	0.580		
Kontr. B (-)	0.000		

(14) MA Bioproduct ELISA-koe CMV-vasta-aineelle

	<u>Käsittelemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #39	1.874	1.802	1.785
Potilas #40 (+)	0.900	0.971	0.889
Potilas #41 (+)	0.023	0.005	0.010
Kontr. A (+)	0.580		
Kontr. B (-)	0.000		

(15) MA Bioproduct ELISA-koe vihurirokon vasta-aineelle

	<u>Käsittelemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #42 (+)	0.95	0.49	0.63
Potilas #43 (+)	0.50	0.44	0.50
Potilas #44 (+)	0.12	0.12	0.08
Kontr. A (+)	0.60		
Kontr. B (-)	0.00		

(16) MA Bioproduct ELISA-koe tuhkarokkovasta-aineelle

	<u>Käsittelemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #45 (+)	0.22	0.17	0.20
Potilas #46 (+)	0.27	0.25	0.25
Potilas #47 (+)	0.065	0.065	0.065
Kontr. A (+)	0.43		
Kontr. B (-)	0.00		

(17) MA Bioproduct ELISA-koe klamydiavasta-aineelle

	<u>Käsittelemätön</u>	<u>ETOH</u>	<u>Käsitelty (EtOH+MG)</u>
Potilas #48 (+)	0.325	0.270	0.280
Potilas #49 (+)	0.385	0.460	0.440
Potilas #50 (+)	0.090	0.090	0.080
Kontr. A (+)	0.450		
Kontr. B (-)	0.000		

Rasvahappojen lisäys ei häirinnyt rutiiniverikokeita. Monoglyseridiestereiden lisäys kuitenkin häiritsee triglyseridimitauksia. Monoglyseridieettereiden käyttö eliminoi tämän ongelman.

Lisäkokeet ovat myös osoittaneet, että esimerkiksi edellä kuvattun kaltaisten LPL-inhibiittoreiden läsnäolo ei häiritse ylläku-
vattujen koesarjojen tuloksia ja/tai tehokkuutta.

Keksinnön tiettyjä näkökohtia voidaan helpommin ymmärtää viit-
taamalla kuviin 1-4. Kuvissa 1-3 koeputki 1, edustava esimerkki
verenkäsittelylaitteesta, voi sisältää suljetussa päässään 2
tehokkaan määrän nestemäistä tai jauhemaista vaikuttavaa aine-
osaa 3. Kun tietty määrä verituotetta, kuten veriseerumia (ei
esitetty) viedään koeputkeen 1, avoin pää 4 suljetaan korkilla
5. Edullisesti koeputkea ja korkkia ravistellaan sitten riittä-
vän pitkä aika, jotta vaikuttava aine 3 liukenee veriseerumiin.
Vaihtoehtoisesti veriseerumia voitaisiin hämmentää tai sekoittaa
sopivalla sekoituslaitteella (ei esitetty) vaikuttavan aineen 3
liukenemisen aikaansaamiseksi. Keksinnön edullinen toteutusmuoto
on, että vaikuttava aineosa silmänräpäyksessä deaktivoi ei-toi-
votut virukset tai bakteerit.

Neste tai jauhe 3 voi koostua pelkästä vaikuttavasta aineosasta
tai vaikuttavasta aineosasta yhdessä sopivan fysiologisesti tai
farmakologisesti soveltuvan kantajan tai laimennusaineen kanssa.
Keksinnön piiriin kuuluu, että neste tai jauhe 3 voi olla, kan-
tajan tai laimennusaineen kanssa tai ilman niitä, kapselin tai
pillerin (ei esitetty) muodossa, joka on muodostettu tavallisis-
ta aineosista. Pilleri voi olla päällystetty tai päällystämätön;
jos pilleri kuitenkin on päällystetty, päällyys voisi edullisesti
olla helposti liukeneva tai liuotettava päällyys, samalla tavalla
ulkopuolisen kapselimateriaalin tulisi välttämättä olla helposti
liukenevaa tai liuotettavaa.

Neste tai jauhe 3, oli se sitten pillerin tai kapselin muodossa
tai ei, voidaan lisätä joko ennen verituotteen lisäämistä tai
sen jälkeen. Esimerkiksi ennalta mitattu määrä jauhetta tai pil-
leri voitaisiin lisätä verituotetta sisältävään koeputkeen.

Kuvassa 2 koeputken 1 sisäpinta 10 on päällystetty päällysteellä
11, joka sisältää tehokkaan määrän vaikuttavaa aineosaa ja sopi-
van kantajan. Sisäpinta 10 voi olla joko osittain tai kokonaan
päällystetty, riippuen kulloinkin käytetystä kantajasta ja vai-
kuttavasta aineosasta. Osittainen päällyste 11 voi olla jatkuva

tai epäjatkuva. On edullista, että ainakin suljetun pään 2 sisäpinta on päällystetty, koska tämä pinta todennäköisimmin on kosketuksissa lisätyn veriseerumin kanssa. Päällystettyä koeputkea ja verta voidaan sekoittaa tai ravistaa edellä kuvatulla tavalla.

Jos koeputken tai muun verenkäsittelylaiteastian on tarkoitus käsittää päällys, päällys voisi koostua vaikuttavasta aineosasta ja kantajasta, joka puolestaan koostuu mistä tahansa alalla tähän tarkoitukseen käytettäväksi tunnetusta aineesta. Esimerkiksi voisi päällys koostua helposti liukenevasta polymeeriaineesta, joka on tähän tarkoitukseen käyttökelpoinen, kuten selluloosapohjainen polymeeriaine tai hydrofiilinan akrylaatti- tai metakrylaattipolymeeri tai kopolymeeri. Katso esim. US-patentit nro 3,566,874, 3,695,921, 4,156,066, 4,156,067 ja 4,417,892, jotka kaikki on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi.

Kuvassa 3 esitetty koeputkijärjestelmä käsittää päällystetyn panoksen tai substraatin 15. Panoksen 15 päällys sisältää vaikuttavan aineosan ja sopivan kantajan. Kun verituote, kuten veriseerumi (ei esitetty) viedään koeputkeen 16, päällys liukenee vereen. Koeputkessa 16 on korkki 17, niin että veriseerumia ja panosta voidaan ravistaa. Valinnaisesti voi koeputkessa 16 olla myös edellä esitetyn kaltainen päällys (ei esitetty).

Panos tai substraatti 15 voi koostua mistä tahansa sopivasta materiaalista. Substraatti 15 voi esimerkiksi olla liukoinen tai ei-liukoinen, steriloitava tai sisäisesti steriloitu, hydrofiilinen tai päällystetty tai kyllästetty. On tärkeätä, että mainittu materiaali ei häiritse, ei fysikaalisesti eikä analyytisesti, verituotteen seuraavaa käsittelyä. Varsinaiset materiaalit sekä käytettävät määrät, onko kyllästetty vai päällystetty, voidaan helposti määrittää.

Kuva 4 käsittää veripussin 20, jossa vaikuttava aineosa voi olla joko jauheena (ei esitetty) tai päällyksenä 21 veripussin 20 sisäpinnalla 22. Mainittu päällys voi olla jatkuva tai epäjatkuva, kokonainen tai osittainen. Päällyksen ja vaikuttavan aineosan liukenemista voidaan lisätä ravistamalla tai muuten sekoittamalla veripussia, jossa on verta sisällä.

tai pinnalla.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen pitolaite, tunnettu siitä, että se sisältää myös vaikuttavan määrän LPL-inhibiittoria.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen pitolaite, tunnettu siitä, että LPL-inhibiittori on natrium- tai litiumtaurokolaatti.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen pitolaite, tunnettu siitä, että virustenvastainen komponentti käsittää yhden tai useamman yhdisteen valittuna ryhmästä, johon kuuluvat C₇-C₁₂-rasvahapot ja niiden monoglyseridit.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen pitolaite, tunnettu siitä, että virustenvastainen komponentti sisältää monokapryliiniä tai monokapriinia.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen pitolaite, tunnettu siitä, että virustenvastainen komponentti koostuu 1-4 yhdisteestä.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen pitolaite, tunnettu siitä, että rasvahapot virustenvastaisessa komponentissa ovat tyydyttyneitä rasvahappoja.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen pitolaite, tunnettu siitä, että rasvahapot virustenvastaisessa komponentissa ovat mono- tai monityydyttymättömiä rasvahappoja.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen pitolaite, tunnettu siitä, että se käsittää virustenvastaista komponenttia sisältävät kumikäsineet.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen pitolaite, tunnettu siitä, että kumikäsineiden pinnalla on virustenvastaista komponenttia sisältävää jauhetta.

15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen pitolaite, tunnettu

siitä, että verituote on verta, plasmaa tai veriseerumia.

16. Menetelmä tutkittavan tai käsiteltävän verituotenäytteen käsittelemiseksi näytteen virustenvastaisen vaikutuksen estämiseksi, t u n n e t t u siitä, että näyte saatetaan kosketuksiin virustenvastaisen komponentin kanssa, joka käsittää virustenvastaisesti vaikuttavan määrän yhtä tai useampaa yhdistettä, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat C_4 - C_{14} -rasvahapot ja niiden monoglyseridit, sekä C_{14} - C_{18} -mono- tai monityydyttymättömät rasvahapot ja niiden monoglyseridit.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että virustenvastainen komponentti sisältää myös tehokkaan määrän LPL-inhibiittoria.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että LPL-inhibiittori on natrium- tai litiumtaurokolaatti.

19. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että virustenvastainen komponentti koostuu yhdestä tai useammasta yhdisteestä, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat C_7 - C_{12} -rasvahapot ja niiden monoglyseridit.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että virustenvastainen komponentti sisältää monokapryliiniä tai monokapriinia.

21. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että virustenvastainen komponentti käsittää 1-4 yhdistettä.

22. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että virustenvastaisen komponentin rasvahapot ovat tyydyttyneitä rasvahappoja.

23. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että virustenvastaisen komponentin rasvahapot ovat mono- tai monityydyttymättömiä rasvahappoja.

24. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että näyte saatetaan kosketuksiin virustenvastaisen komponentin kanssa verenkäsittelylaitteessa.

25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että verenkäsittelylaite on koeputki, veripussi tai vaakuimilaitteisto.

26. Parannus verituotenäytteen tutkimiseen tarkoitettuun koepakkaukseen, t u n n e t t u siitä, että parannus muodostuu virustenvastaisesta komponentista, joka sisältää tehokkaan virustenvastaisen määrän yhtä tai useampaa yhdistettä, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat C_4 - C_{14} -rasvahapot ja niiden monoglyseridit, sekä C_{14} - C_{18} -mono- tai monityydyttymättömät rasvahapot ja niiden monoglyseridit.

27. Parannus verituotteen, verituotenäytteen, tai muiden kehon nesteiden tai niiden johdannaisten näytteiden käsittelyyn tarkoitettuun yhdistelmään, joka käsittää yhden tai useamman näyteastian ja käsittelylaitteiston, joka parannus on t u n n e t t u siitä, että se käsittää ainakin yhden näyteastian, joka sisältää virustenvastaisen komponentin, joka sisältää virustenvastaisesti tehokkaan määrän yhtä tai useampaa yhdistettä, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat C_4 - C_{14} -rasvahapot ja niiden monoglyseridit, sekä C_{14} - C_{18} -mono- tai monityydyttymättömät rasvahapot ja niiden monoglyseridit.

28. Parannus lääketieteellisessä tai sairaalan puitteissa käytettyyn materiaaliin, t u n n e t t u siitä, että se käsittää tämän materiaalin ainakin yhden pinnan, joka sisältää virustenvastaisesti vaikuttavan määrän yhtä tai useampaa yhdistettä, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat C_4 - C_{14} -rasvahapot ja niiden monoglyseridit, sekä C_{14} - C_{18} -mono- tai monityydyttymättömät rasvahapot ja niiden monoglyseridit.

FIG. 1

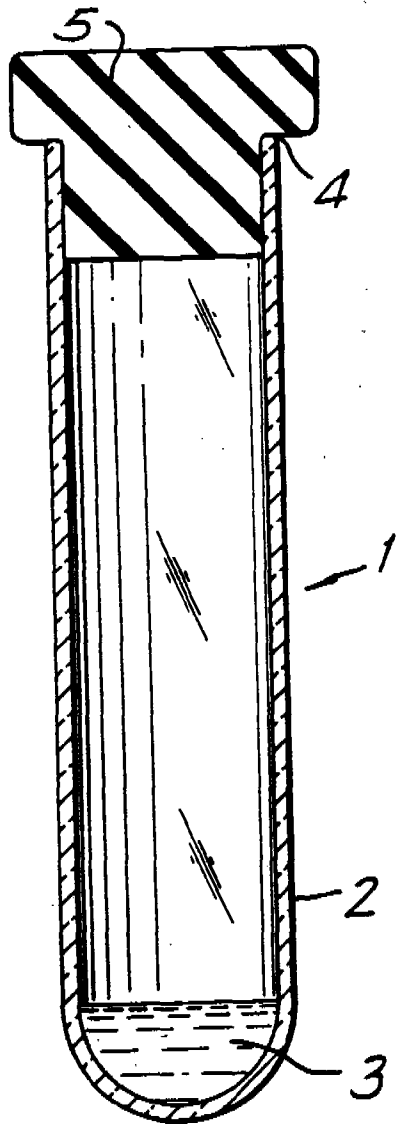


FIG. 2

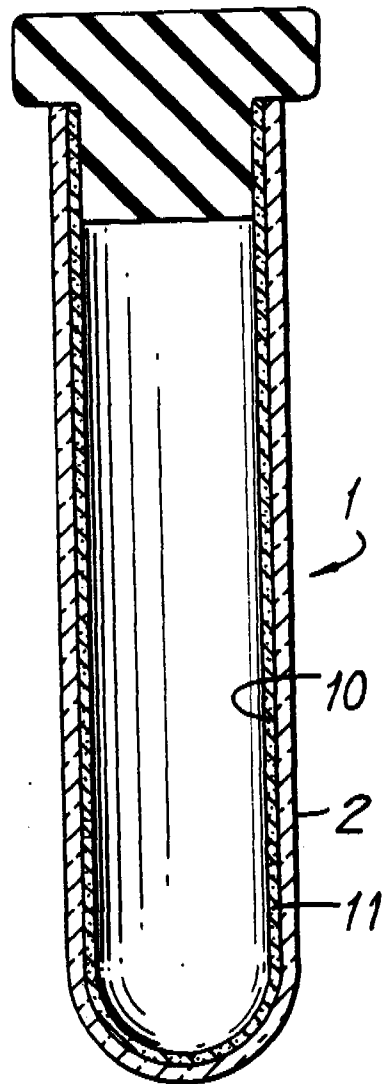


FIG. 3

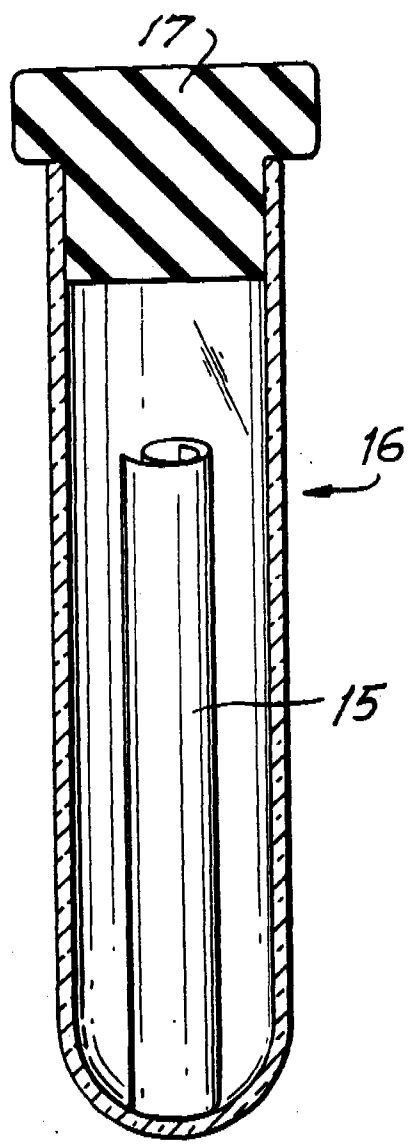


FIG. 4

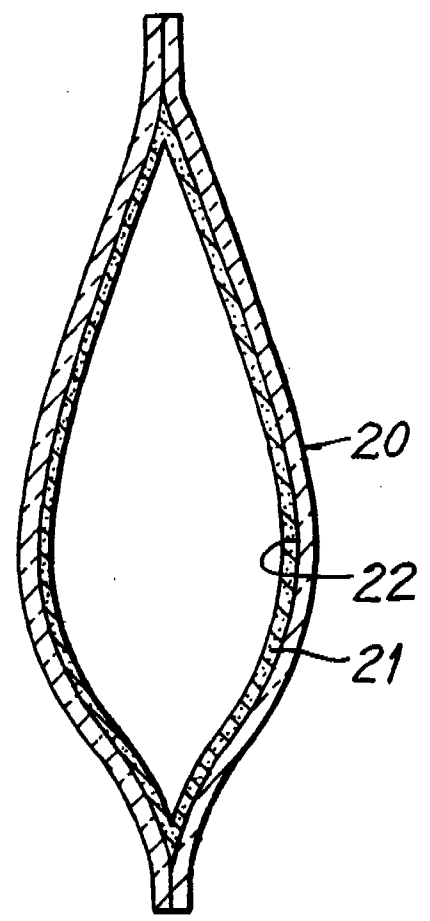


FIG. 5a

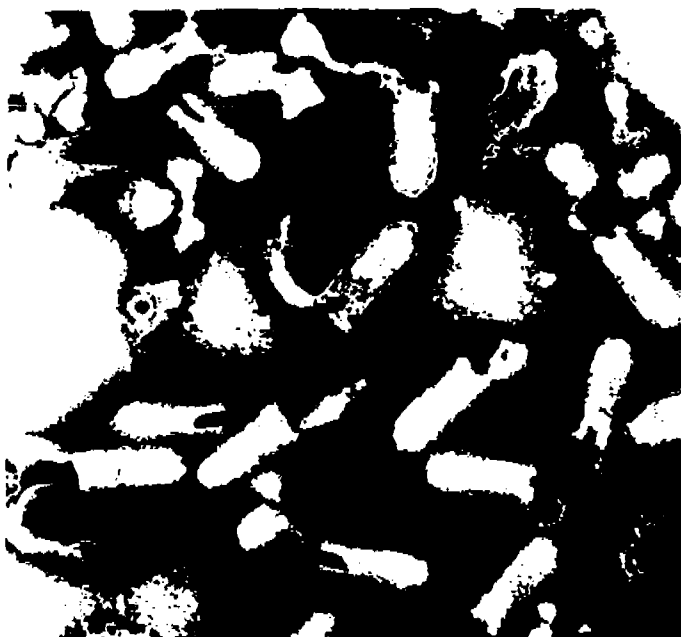


FIG. 5b



FIG. 5c

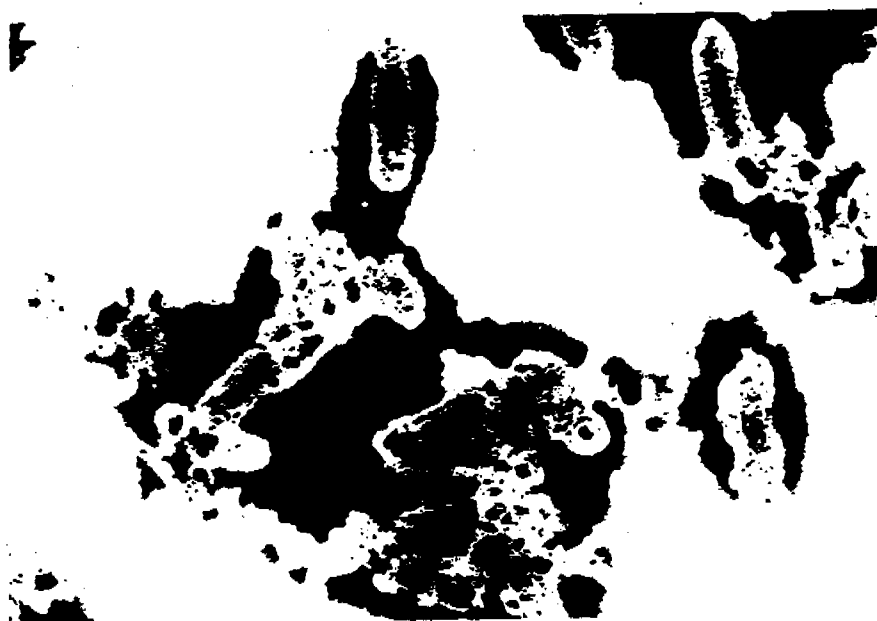


FIG. 6b

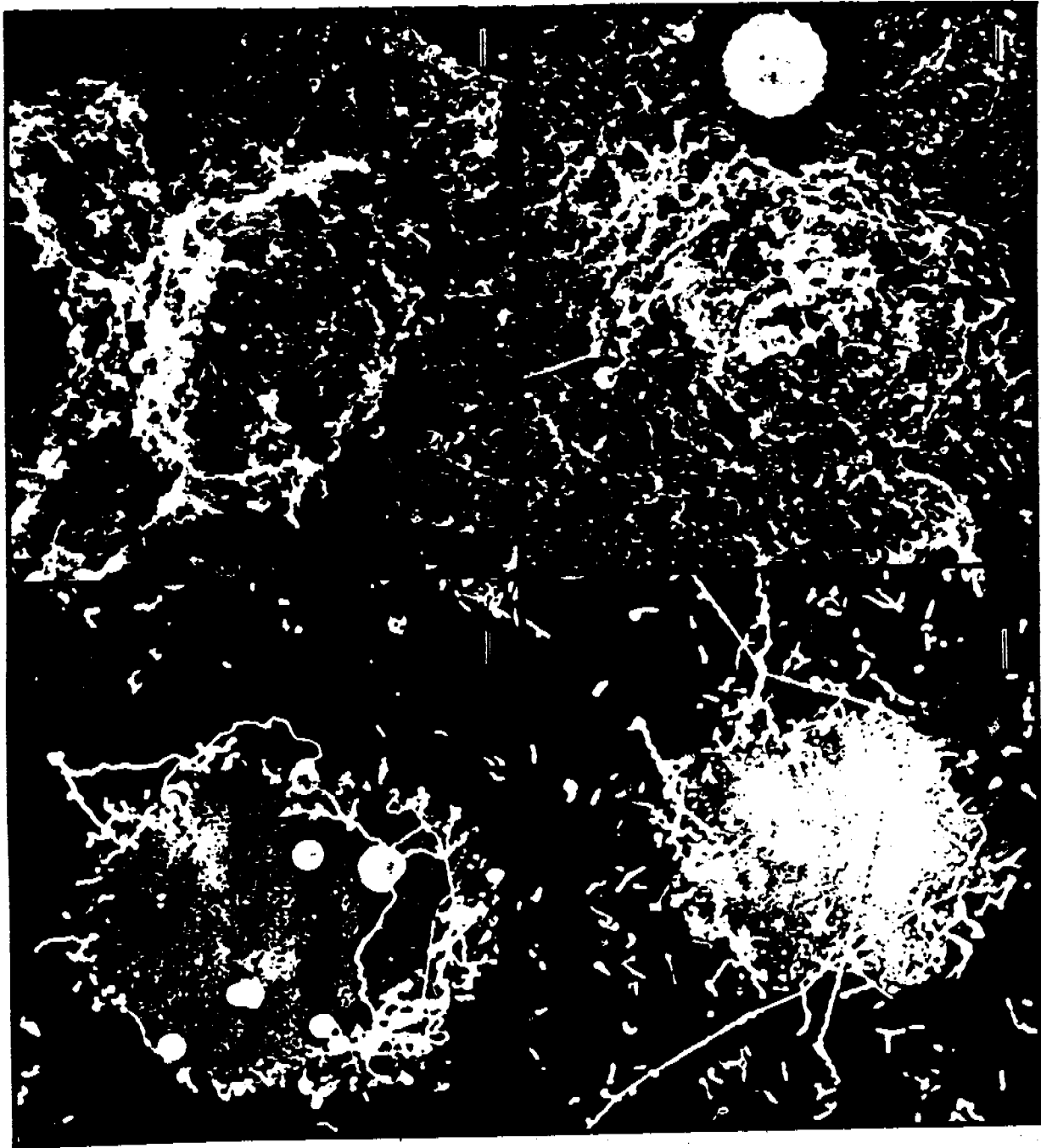


FIG. 6d

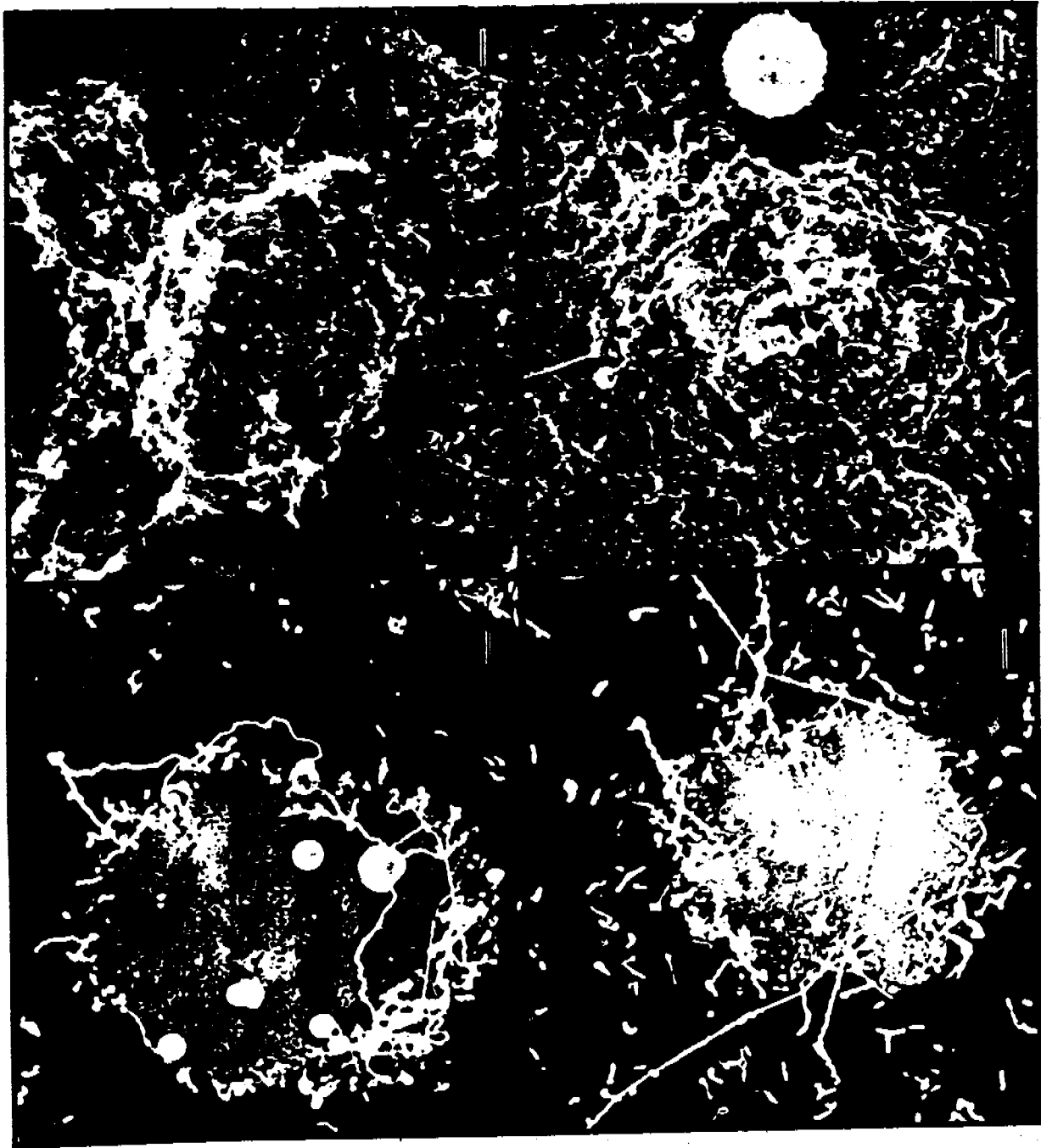


FIG. 6a

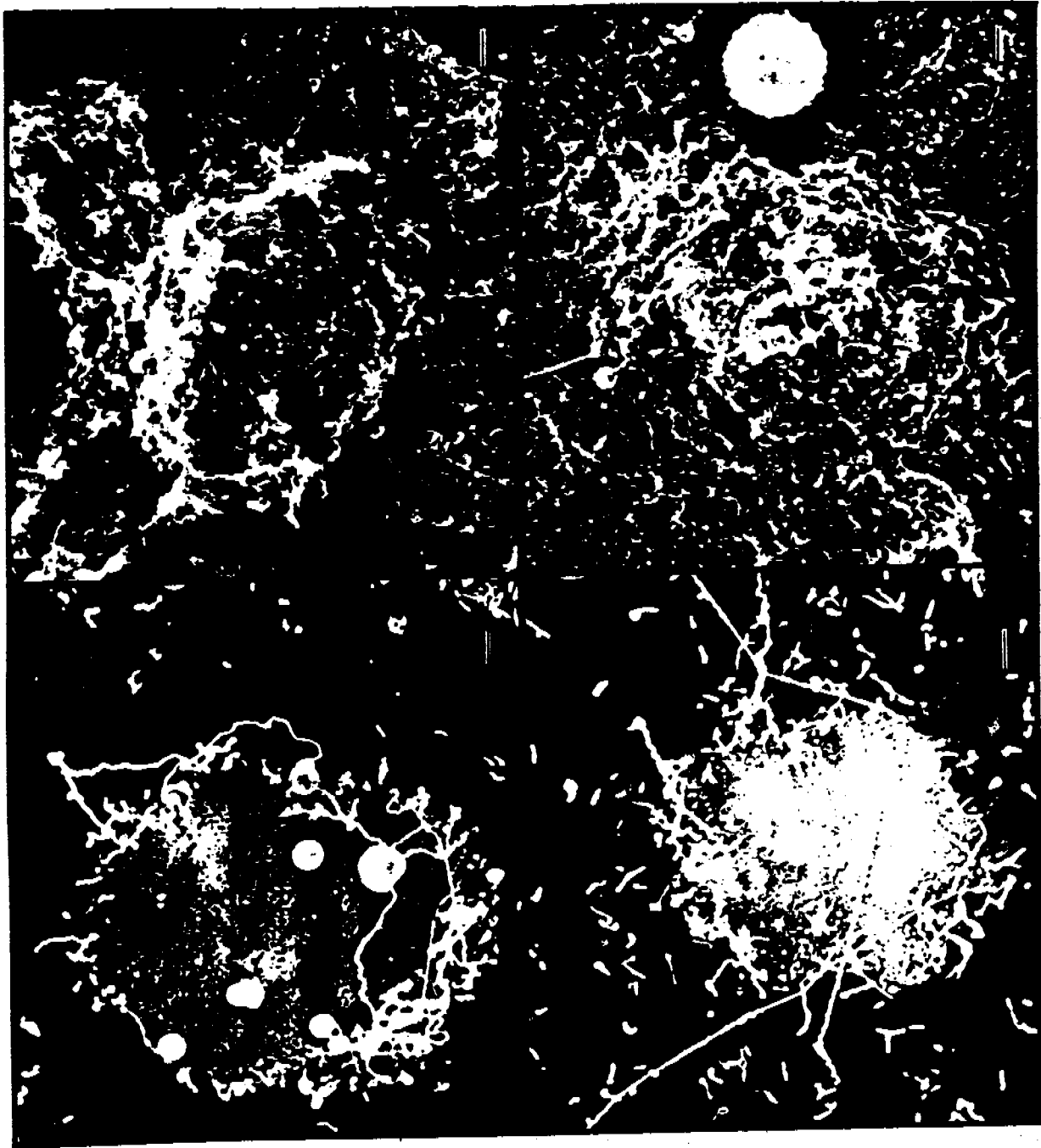


FIG. 6c

