



MD 1473 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1473⁽¹³⁾ G2

(51) Int. Cl.⁷: A 61 K 31/705;
A 61 P 31/22;
C 07 J 71/00

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: 98-0129 (22) Data depozit: 1998.06.02 (41) Data publicării cererii: 2000.04.30, BOPI nr. 4/2000	(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului: 2000.05.31, BOPI nr. 5/2000
(71) Solicitant: Centrul Național Științifico-Practic de Medicină Preventivă al Ministerului Sănătății din Republica Moldova, MD	
(72) Inventatori: Spănu Constantin, MD; Grușco Tatiana, MD; Scoferța Petru, MD; Vorobjbit Valentina, MD Valica Vladimir, MD	
(73) Titular: Centrul Național Științifico-Practic de Medicină Preventivă al Ministerului Sănătății din Republica Moldova, MD	

(54) Remediu antiherpetic

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la virusologia medicală, și
anume la remediile antiherpetice.

Esența invenției constă în aplicarea tomatozi-
dului (5 α -furostan-3 β , 22, 26 -trio1-3-[O- β -D-
glucopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 4)- β -

2
D-galactopiranozil]-26-O- β -D-glucopiranozid) in
5 calitate de remediu antiherpetic.
Revendicări: 1

MD 1473 G2

3

Descriere:

Invenția se referă la virusologia medicală, și anume la remediile antiherpetice.

5 Sunt cunoscute unele saponine cu o structură chimică asemănătoare cu tomatozidul invocat care manifestă activitate antiherpetică. Dar rezultatele prezentate în sursele de informație sunt incomplete, deoarece testările au fost efectuate numai *in vitro*, dar nu și *in vivo* [1].

Se mai cunoaște glicozidul pavstim obținut prin extragere din frunze de degețel roșu (*Digitalis purpurea L.*) care are o acțiune antiherpetică. Însă acest remediu nu poate fi produs în cantități mari, deoarece materia primă este puțin accesibilă [2].

10 Problema pusă poate fi soluționată prin utilizarea în calitate de inhibitor al virusurilor herpetice a soluției de tomatozid (5α -furostan- $3\beta,22,26$ -triol-3-[O- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranozil]-26-O- β -D-glucopiranozil).

15 Tomatozidul prezintă o substanță în formă de praf cristalin de culoare galbenă-cafenie, rezistentă la acțiunea luminii, higroscopică, solubilă în apă, termenul de păstrare în ambalaj ermetic la temperatura camerei constituie 5 ani. Preparatul, fiind un metabolit derivat al plantelor superioare, nu posedă acțiune cito- și fitotoxică. Tomatozidul se obține prin extragerea din semințe de tomate cu etanol de 70,0%. Extractul se usucă bine și multiplu se cromatografiază în coloana cu silicagel [3].

20 Esența invenției constă în aplicarea tomatozidului (5α -furostan- $3\beta,22,26$ -triol-3-[O- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranozil]-26-O- β -D-glucopiranozil) în calitate de remediu antiherpetic.

Acțiunea antivirală a preparatului este demonstrată prin următoarele exemple:

Exemplul 1. Acțiunea antivirală a substanței *in vitro*.

Virusul. Se folosește tulpina de virus herpetic simplu, tipul I - (HSV-I) în titru de 5,5 lg ECP₅₀/ml.

25 *Inhibitorul.* Se folosește soluția de tomatozid preparată cu ser fiziologic ce nu posedă acțiune cito- și fitotoxică în concentrație de 0,2; 0,1; 0,05 și 0,025%.

Pregătirea culturii de celule continue Hep-2.

30 În prealabil se efectuează examinarea și aprecierea monostratului culturii de celule. Se selectează cultura cu monostratul celular compact, având o morfologie tipică liniei date de celule, cu granițele clar pronunțate. Celulele se desprind de pe pereții de sticlă ai flacoanelor speciale cu soluție tripsină-versen. Pentru aceasta se pregătește un amestec de volume egale de 0,25% tripsină și 0,02% versen, care se încălzește în baia de apă până la 30...35°C. Din flacoane se înlătură mediul de creștere, iar monostratul se spală de 3 ori cu soluție - tampon fosfat (pH 7,5), ce nu conține ioni de calciu și magneziu. Apoi amestecul cald de soluție tripsină-versen se aplică pe monostratul culturii celulare în așa mod încât toate sectoarele să fie acoperite cu acest amestec. În flacoane speciale cu volumul de 100,0; 250,0; 1000,0 ml se adaugă câte 10,0; 15,0 și 30,0 ml de amestec tripsină-versen. Flacoanele se agită ușor și se introduc în termostat (37°C) timp de 15...20 min până la desprinderea completă a celulelor de pe suprafața sticlei. Conglomeratele de celule mai mari se dispersează, agitând de câteva ori suspensia celulară. Suspensia de celule se centrifughează timp de 10 min la 1000 rot./min, iar amestecul tripsină-versen se înlătură.

40 Celulele sedimentate prin centrifugare se resuspensionează într-un volum nu prea mare de mediu de creștere (10,0-20,0 ml), iar numărul de celule se determină în camera Goreaev. Suspensia de celule se controlează la sterilitatea bacteriană și se diluează cu mediu de creștere în așa limită încât 1,0 ml să conțină aproximativ 60,0 mii de celule. În calitate de mediu de creștere a celulelor se folosește mediul Igla, mediul 199, mediul Igla-MEM cu supliment de ser bovin (7,0%) și antibiotice. Cultura de celule Hep-2 se toarnă în fiecare eprubetă în volum de 1,0 ml. În calitate de mediu de menținere se folosesc aceleași medii menționate mai sus, lipsite de serul bovin.

Determinarea cantitativă a HSV-I în testarea martor (virusul + ser fiziologic)

50 Determinarea cantitativă a HSV-I se efectuează în cultura de celule Hep-2 prin metoda diluției finite după efectul citopatic (ECP) exprimat în lgECP₅₀/ml. Pentru titrarea virusului inițial se pregătesc diluții zecimale cu concentrația de la 10⁻¹ până la 10⁻⁶. Până la inocularea cu virus, monostratul celulelor Hep-2 se spală consecutiv de 3 ori cu soluție Henks, în scopul eliminării rămășițelor de ser bovin. Pentru fiecare diluție zecimală de material virusologic se folosesc câte 4 eprubete cu cultură de celule. Materialul virusologic din fiecare diluție, în volum de 0,5 ml, se amestecă cu 0,5 ml ser fiziologic și se incubează timp de 1 oră la 37°C. Peste 1 oră câte 0,1 ml de fiecare diluție se adaugă în fiecare din cele 4 eprubete cu cultură celulară, în care anterior a fost adăugat câte 0,9 ml mediu de menținere. Eprubetele cu celulele infectate se introduc în termostat la 37°C.

MD 1473 G2

4

5 Starea monostratului culturii de celule inoculate se examinează periodic la microscopul optic timp de 7 zile. Rezultatul ECP al virusului se apreciază pozitiv numai în cazul când cel puțin jumătate din celule au fost supuse degenerării.

10 *Determinarea cantitativă a HSV-I:* testarea experimentală de lucru (virus+tomatozid). Tehnologia de realizare a acestui fragment de lucru este identică cu a celui precedent, cu excepția că un volum de 0,5 ml al virusului în diluții de la 10^{-1} până la 10^{-6} se amestecă cu 0,5 ml soluție de tomatozid în concentrații de 0,2; 0,1; 0,05 și 0,005%. Fiecare probă se incubează timp de 1 oră la 37°C , după care câte 0,1 ml de amestec se adaugă în fiecare din cele 4 eprubete cu monostrat de celule, în care anterior s-a adăugat mediu de menținere în volum de 0,9 ml. Eprubetele se montează orizontal în containere speciale și se introduc în termostat la 37°C .

15 Acțiunea antivirală a preparatului se apreciază prin diferența în activitatea infecțioasă (ECP) a virusului herpesului, paralel manifestată în cultură de celule Hep-2, în prezența și în absența substanței testate - tomatozid.

Determinarea activității antivirale a tomatozidului după cantitatea reziduală a virusului in vitro

20 Starea culturii de celule inoculate și incubate la 37°C în termostat se examinează periodic la microscopul optic timp de 7 zile, marcând eprubetele cu degenerare specifică a celulelor.

20 Gradul de degenerare specifică a monostratului de cultură celulară Hep-2 se apreciază după sistemul de 4 baluri:

- (4+) - Efect citopatic total în monostratul celular;
- (3+) - dezvoltarea efectului citopatic în monostratul celular la nivel de 75,0%;
- (2+) - efect citopatic la nivel de 50,0% al monostratului celular;
- 25 – (1+) - dezvoltarea efectului citopatic în monostratul celular la nivel de mai puțin de 50,0%;
- (-) - lipsa efectului citopatic în cultura de celule.

In calitate de martor se folosesc:

- 1. Cultura de celule Hep-2, lipsită de tomatozid în mediu de menținere;
- 2. Cultura de celule Hep-2 cu prezența tomatozidului în mediul de menținere;
- 30 3. Indicele activității infecțioase HSV-I nediluat și în diluții de la 10^{-1} până la 10^{-6} în cultura de celule Hep-2.

35 Efectul citopatic cauzat de virus este apreciat ca pozitiv numai în cazul când nu mai puțin de jumătate de monostrat celular este supus degenerării specifice. Evidența ECP al virusului se efectuează prin aprecierea probelor-martor menționate mai sus, și anume: lipsa oricăror schimbări citomorfologice sau degenerative în monostratul de cultură Hep-2 în prezența și absența tomatozidului în mediul de menținere; prezența virusului infecțios în cultura de celule infectate cu material viral nediluat și în diluții de la 10^{-1} până la 10^{-6} .

Cantitatea de virus în doze cu efect citopatic (ECP_{50}) se determină prin metoda probitelor, folosind în acest scop tabele standard speciale. După diferența în titrul virusurilor ce s-au reprodus în lipsa și prezența tomatozidului în mediul de menținere se apreciază gradul de activitate antivirală a substanței testate *in vitro*.

40 Rezultatele investigațiilor experimentale sunt ilustrate în tab. 1 și 2.

Exemplul 2. Acțiunea antivirală a preparatului in vivo

45 *Virusul.* Se folosește suspensia ce conține virus, pregătită din creierul șoarecilor albi pieriți în urma inoculării lor cu HSV-I. Din creierii șoarecilor, cu greutatea de 20,0 g, pieriți după infectare cu virus herpetic, se pregătește o suspensie de 10,0% în ser fiziologic. Suspensia se centrifughează 20 min la 2000 rot./min, supernatantul obținut, decontaminat de flora bacteriană, se folosește la pregătirea diluțiilor virusului (1:1,6; 1:2,5; 1:4,0; 1:6,5; 1:10,0; 1:100,0; 1:1000,0; 1:10 000,0; 1:100 000,0) în ser fiziologic.

Inhibitorul. La testare *in vivo* se utilizează soluție de tomatozid, pregătită în ser fiziologic, în concentrație de 0,1%, lipsită de efect cito- și fitotoxic.

50 Determinarea cantitativă HSV-I (virus+ser fiziologic și virus+tomatozid). Se amestecă volume egale de ser fiziologic (martor), 0,1% soluție de tomatozid (testare de lucru) cu diluții în creștere ale virusului. Amestecurile se agită 2...3 min și se introduc în termostat la 37°C timp de o oră.

Ulterior amestecurile martor și de lucru se introduc (câte 0,03 ml) intracerebral șoarecilor albi cu greutatea de 20,0 g. Animalele infectate se supraveghează timp de 21 zile. În tab. 3, 4 sunt expuse rezultatele determinării cantitative a activității infecțioase a HSV-I.

55 *Analiza rezultatelor.* Determinarea cantității reziduale de HSV-I *in vitro* (virus+ser fiziologic) demonstrează că această cantitate alcătuiește $5,14 \pm 0,23 \lg \text{ECP}_{50}/\text{ml}$ (tab.1). Cantitatea de virus rezidual în amestec (virus herpetic+tomatozid) a alcătuit 2,0; 2,0; 2,0 și 4,4 $\lg \text{ECP}_{50}/\text{ml}$, unde diluția finită a tomatozidului în mediul de menținere a constituit 0,02; 0,01; 0,005 și 0,0025% respectiv. Calculele efectuate demonstrează că cantitatea de virus inactivat variază de la 99,9 până la 75,0%, în funcție de gradul de diluare a tomatozidului. Indicele de neutralizare al activității infecțioase a HSV-I în cultura de

60

MD 1473 G2

celule Hep-2, de asemenea, a variat de la 6,0 până la 1450,0 unități în funcție de concentrația finită a tomatozidului în amestec după expoziție. Așadar, investigațiile consacrate studiului activității antivirale a

5

5

tomatozidului față de HSV-I *in vitro* demonstrează că concentrația minimă de tomatozid, capabilă să manifeste acțiune antivirală, constituie 0,005%. De menționat că indicele de neutralizare a activității infecțioase a virusului herptic a alcătuit 1450 unități.

10 Rezultate analogice s-au obținut și în urma realizării studiului de evidențiere a activității antivirale a tomatozidului *in vivo*. Este semnificativ faptul că cantitatea de HSV-I rezidual infecțios în experiențele (virus + ser fiziologic)- testare martor a constituit 3,6 lg DL_{50,0,03 ml}, iar în probele de lucru (virus + tomatozid)- 0,6 lg DL_{50,0,03 ml} la concentrația finită a tomatozidului de 0,05%. Indicele de neutralizare a activității infecțioase a HSV-I *in vivo* a alcătuit 3,0 lg DL_{50,0,03 ml}, în unități antilogaritmice - 1:1000, adică evident pozitiv.

15 Astfel, rezultatele obținute demonstrează că tomatozidul-glucozid steroidic de origine vegetală manifestă acțiune antiherptică semnificativă *in vivo* și *in vitro*.

Tabelul 1

Rezultatele aprecierii cantitative a activității infecțioase a HSV-I în prezența și absența tomatozidului în mediu de menținere a culturii de celule Hep-2

20

Cantitatea de HSV-I exprimată în lgECP _{50/ml}	Concentrația finală a tomatozidului exprimată în (%) în mediul de menținere a celulelor	Diluția suspensiei de virus herptic+tomatozid						Titrul virusului în lgECP _{50/ml}	Indicele de neutralizare a activității infecțioase a virusului în lg
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶		
5,5	0,02	++++	+++	----	----	----	----	2,0±0,2	3,14
5,5	0,01	++++	----	----	----	----	----	2,0±0,2	3,14
5,5	0,005	++++	----	----	----	----	----	2,0±0,2	3,14
5,5	0,0025	++++	++++	+++	+++	----	----	4,4±0,2	0,74
5,5	virus+ser fiziologic	++++	++++	++++	+++	----	----	5,14±0,2	0

Tabelul 2

Evaluarea comparativă a activității antivirale a diferitelor doze de tomatozid asupra virusului herptic

Concentrația finală a tomatozidului exprimată în % în mediul de menținere	Cantitatea de virus infecțios în suspensia de virus prelucrată cu tomatozid, exprimată în lgECP _{50/ml} *	
	Indicele de neutralizare a activității infecțioase a virusului introdus în amestecul tomatozid+virus	
	*	§
0,02	3/99,9**	1450
0,01	3/99,9	1450
0,005	3/99,9	1450
0,0025	5,4/75,0	6

25

(*) La numărător este indicată cantitatea de virus după o oră de expoziție la 37°C cu tomatozid, exprimată în lgECP_{50/ml}

(**) La numitor procentul inactivării virusului HSV-I

§ - Indicele de neutralizare a activității infecțioase a virusului în unități antilogaritmice

MD 1473 G2

6

Tabelul 3

Determinarea și aprecierea cantitativă a HSV-I în amestecul virus + ser fiziologic

Diluția finală a virusului	Numărul animalelor				Letalitatea în %
	în fiecare diluție		Date cumulative		
	au supraviețuit	au pierit	au supraviețuit	au pierit	
1:1,6	0	4	0	28	100
1:2,5	0	4	0	24	100
1:4,0	0	4	0	20	100
1:6,5	1	3	1	17	94,4
1:10,0	0	4	1	13	92,8
1:100,0	0	4	1	9	90,0
1:1000,0	2	2	3	5	62,5
1:10000,0	1	3	4	3	42,8

5 Titrul virusului în $Ig=3,6$ $DL_{50/0,03}$ ml

Tabelul 4

Determinarea și aprecierea cantitativă a HSV-I în amestecul virus + tomatozid

Diluția finală a virusului	Numărul animalelor				Letalitatea în %
	în fiecare diluție		Date cumulative		
	au supraviețuit	au pierit	au supraviețuit	au pierit	
1:1,6	1	3	1	11	91,6
1:2,5	1	3	2	8	80,0
1:4,0	3	1	5	5	50,0
1:6,5	3	1	8	4	33,3
1:10,0	3	1	11	3	21,4
1:100,0	4	0	15	2	11,7
1:1000,0	3	1	18	2	10,0
1:10000,0	3	1	21	1	4,7

10

Titrul virusului în $Ig=0,6$ $DL_{50/0,03}$ ml

(57) Revendicare:

Aplicarea tomatozidului (5α -furostan- $3\beta,22,26$ -trio- 3 -[O- β -D-glucopiranozil (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranozil]-26-O- β -D-glucopiranozid) în calitate de remediu antiherpetic.

15

(56) Referințe bibliografice:

1. Криворученко Ю. П. Вопросы вирусологии, “Иммуноадьювантные и противовирусные свойства сапонинов”, т. 43, № 1, с. 7-9
2. MD 1051 F1

Șef secție: CRASNOVA Nadejda

Examinator: BAZARENCO Tatiana

Redactor: CANȚER Svetlana