



MD 1485 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății
Industriale

(11) 1485⁽¹³⁾ G2
(51) Int. Cl.⁷: A 61 K 35/78;
A 61 P 37/00

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2000-0023 (22) Data depozit: 2000.01.31	(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului: 2000.06.30, BOPI nr. 6/2000
(71) Solicitant: Petrov Andrei, MD (72) Inventator: Petrov Andrei, MD (73) Titular: Petrov Andrei, MD	

(54) Procedeu de preparare a imunomodulatorului

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicină, și anume la imunologia clinică.

5
10
Esența invenției constă în aceea că substanțele active se extrag în procesul fierberii din materie primă vegetal-terapeutică, care include în % de masă: iarbă de coada-șoricelului (*Achillea millefolium*) 5...15, flori de filimică (*Calendula officinalis*) 5...15, frunze de urzică (*Urtica dioica*) - restul, având raportul materie primă vegetal-terapeutică : apă de 1:50. Fierberea se efectuează timp de 2...3 min, apoi extractul obținut se răcește

2
până la temperatura de 35...37°C și se filtrează. Filtratul se diluează cu apă distilată 1:10 respectiv, se filtrează prin caolin, suplimentar se filtrează și se sterilizează.

Rezultatul constă în obținerea unui remediu de modulare a activității macrofagilor și proliferare a limfocitelor B și T.

Revendicări: 3

MD 1485 G2

MD 1485 G2

2

MD 1485 G2

3

Descriere:

Invenția se referă la medicină, la imunologia clinică, și anume la un procedeu de obținere din materie primă vegetală a unui remediu ce posedă activitate imunomodulatoare.

5 Este cunoscut procedeu de obținere a substanței, ce posedă activitate imunostimulatoare, în conformitate cu care pentru mărirea activității produsului finit iarba de *Gentiana Lutea L.* este extrasă cu etanol de 25-40% având raportul materie primă : extract de 1:(13...20), totodată extragerea se efectuează la temperatura de 60...65°C, în decurs de 1 oră 45 min...2 ore 30 min [1]. Utilizarea etanolului în calitate de extragent necesită purificarea ulterioară a produsului finit de el, ceea ce majorează pierderile de timp pentru prepararea lui și micșorează activitatea stimulative.

10 Este cunoscut de asemenea procedeu de obținere a unui remediu ce posedă activitate imunostimulatoare pe calea omogenizării colților de cartofi, extracției cu apă fierbândă în raport de 1:1...1,5 cu răcirea, filtrarea și centrifugarea ulterioară, aducerea la fierbere, centrifugarea repetată, dializa supernatantului față de apă, liofilizarea și gelfiltrarea pe Sephadex G-200 [2]. Extracția în apă fierbândă nu necesită înlăturarea etanolului, însă utilizarea colților de cartofi în calitate de materie primă vegetală necesită atât extracție dublă, cât și purificare triplă (centrifugare dublă și gelfiltrare) cu utilizarea unui utilaj compus și costisitor.

15 Problema pe care o rezolvă invenția este obținerea unui remediu cu activitate imunomodulatoare înaltă utilizând pentru extracție utilaj simplu.

20 Procedeu, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate mai sus prin aceea că substanțele active se extrag în procesul fierberii din materie primă vegetal-terapeutică, care include în % de masă: iarbă de coada-șoricelului (*Achillea millefolium*) 5...15, flori de filimică (*Calendula officinalis*) 5...15, frunze de urzică (*Urtica dioica*) - restul, având raportul materie primă vegetal-terapeutică : apă de 1:50. Fierberea se efectuează timp de 2...3 min, apoi extractul obținut se răcește până la temperatura de 35...37°C și se filtrează. Filtratul se diluează cu apă distilată 1:10 respectiv, se filtrează prin caolin, suplimentar se filtrează și se sterilizează.

25 Problema pusă este soluționată datorită faptului că în procedeu de preparare a imunomodulatorului pe calea hidroextracției substanțelor active din materie primă vegetal-terapeutică (MPVT) în procesul fierberii cu răcire și filtrare ulterioară, substanțele active se extrag din MPVT, care include (în % de masă) iarbă de coada-șoricelului (*Achillea millefolium*) 5...15, flori de filimică (*Calendula officinalis*) 5...15, frunze de urzică (*Urtica dioica*) - restul, în raportul materie primă vegetal-terapeutică : apă de 1:50, fierberea se efectuează în decurs de 2-3 min, răcirea până la temperatura de 35...37°C, iar filtratul se diluează cu apă distilată în raport filtrat : apă de 1:10 și se filtrează prin caolin. Utilizarea în calitate de MPVT a speciilor de plante indicate permite de a efectua extracția timp de numai 2-3 min folosind utilaj simplu, o cratiță, în care extractul se și răcește. Pentru filtrare sunt utilizate de asemenea filtre simple, de exemplu tifon, etc. Toate acestea fac procedeu mai simplu, necesitând un număr mai mic de operații, iar produsul finit având puritate ecologică mai înaltă. Suplimentar utilizarea MPVT în special în raportul menționat comunică remediului finit activitate de modulare a macrofagilor, proliferare a limfocitelor B și T, contribuie la procesul de eliminare a reziduurilor.

40 Utilizarea MPVT ce include iarbă de coada-șoricelului (*Achillea millefolium*), flori de filimică (*Calendula officinalis*), frunze de urzică (*Urtica dioica*) și alte plante este cunoscută, de exemplu, din amestecul Semnele Zodiului [Cererea Federației Ruse nr. 92012754/04]. Însă în amestecurile cunoscute plantele menționate se utilizează conform menirii lor: iarba de coada-șoricelului - în calitate de vasodilatator, remediu analgetic, precum și ca remediu ce normalizează procesele motoare - de secreție; florile de filimică - în calitate de remedii bactericide și sedative, precum și ca remediu ce micșorează excitabilitatea reflexă; frunzele de urzică se folosesc în calitate de remediu hemostatic, tonifiant și stimulant, iar împreună cu alte plante - având acțiune tonică generală, însă fără activitate imunomodulatoare. Astfel, utilizarea MPVT în ansamblu și în raportul menționat mai sus comunică remediului finit alte proprietăți, nepronozate.

50 Suplimentar, după sterilizarea extractului este posibilă păstrarea lui de lungă durată, de exemplu, la temperatură scăzută, precum și înfiolarea lui, iar în consecință producerea industrială și livrarea lui la utilizatori, de exemplu în clinici.

Rezultatul constă în obținerea unui remediu de modulare a activității macrofagilor și proliferare a limfocitelor B și T.

55 Pentru prepararea MPVT este folosit amestecul de plante bine uscate în încăperi bine aerisite, care include flori de filimică (*Calendula officinalis*), iarbă de coada-șoricelului (*Achillea millefolium*) și frunze de urzică (*Urtica dioica*) la un raport al % de masă respectiv de 5...15 : 5...15 : restul.

MD 1485 G2

4

Pentru obținerea remediei solicitat cu greutatea de 100 g, de exemplu, se iau 5 g flori de filimică (*Calendula officinalis*), 10 g iarbă de coada-șoricelului (*Achillea millefolium*) și 85 g de frunze de urzică (*Urtica dioica*) și se introduc în apă distilată fierbândă turnată într-un recipient. Cantitatea de apă este de 5000 ml, ceea ce corespunde raportului MPVT: apă de 1:50. După ce se introduce materia primă vegetal-terapeutică, apa fierbândă se amestecă timp de 2...3 min, până la formarea spumei, apoi încălzirea se întrerupe, recipientul se închide cu un capac și decoctul se menține la temperatura camerei până când temperatura lui va coborî până la 35...37°C. Apoi decoctul se filtrează. După aceasta filtratul se diluează cu apă distilată în exemplul dat la un raport filtrat : apă de 1:10, adică peste 5 l de filtrat se toarnă 50 l de apă, se purifică prin adsorbant, de exemplu prin caolin. După purificare extractul se filtrează fin [Diug E., Trigubenco I. Tehnologia medicamentelor în farmacie. Chișinău, Universitas, 1992, p. 126-130]. Totodată filtrarea fină se poate realiza cu ajutorul unui filtru cu membrană "Milipor" [Barbăroșie S., Diug E., Ciobanu N. Tehnologia medicamentelor industriale. Chișinău, Știința, 1993, p. 617-623]. Apoi extractul se sterilizează, ceea ce asigură o păstrare îndelungată a acestuia și face posibilă înfiolarea lui, deci și producerea industrială și livrarea la utilizator, de exemplu în clinici.

Remediul obținut conform procedurii descris reprezintă o soluție transparentă, incoloră, fără miros și gust, cu o componentă biologic activă termostabilă, având densitatea de 1,17-1,22, pH 7,0-8,0, pierderea de masă la uscare nu mai mică de 0,13-0,17%. Soluția nu este toxică.

Activitatea biologică a remediei a fost cercetată în Laboratorul Central de Testare a Medicamentelor (LCTM) de pe lângă Universitatea de Medicină și Farmacie din Iași, precum și în Spitalul Clinic Republican nr. 1 al Ministerului Sănătății din Republica Moldova (secția de imunologie).

Cercetările în LCTM de pe lângă Universitatea de Medicină și Farmacie din Iași au fost efectuate pe 36 șobolani albi de ambele sexe cu masa 190-200 g, divizați în 3 grupe a câte 12 animale. Primul grup (control alb) primea soluție salină izotonă în doză zilnică de 5 ml/kg în decurs de 14 zile. Al doilea grup (control pozitiv) primea levamisol în doză de 10 mg/kg în decurs de 14 zile. Al treilea grup (control pozitiv) primea remediul conform invenției prezente în doză de 0,25 ml/kg în decurs de 14 zile. Preparatele se administrau *per oral* cu ajutorul sondei gastrice.

S-a determinat acțiunea celor trei substanțe cercetate asupra următorilor parametri ai sistemului imun: capacitatea la fagocitoză a leucocitelor polimorfonucleare (LPMN) ale sângelui periferic și activitatea complementului din ser. S-a stabilit că atât levamisolul, cât și remediul conform invenției prezente, sporesc nivelul activității fagocitare (NTB) aproximativ de două ori, însă remediul solicitat (NTB până la 0,47) este mai activ decât imunostimulatorul bine cunoscut levamisol (NTB până la 0,33).

În Spitalul Clinic Republican nr. 1 al Ministerului Sănătății din Republica Moldova au fost supuse analizei 120 mostre luate de la purtătorii de HIV. Drept material pentru cercetări au servit limfocitele izolate din sângele purtătorilor de HIV tranzitorie din secțiile de hepatologie, reumatologie, chirurgie purulentă.

Cercetările imunologice efectuate în scopul determinării limfocitelor T și B au fost efectuate prin metoda formării de rozete utilizând respectiv eritrocite de berbec [Fondal M., Holm G., Wigzell H. Surface markers on human T and B-lymphocytes forming immune rosettes with sheep red blood cells. J. Experimental Med., 1972, vol. 136, p. 207-215] și C3 ale componentei complementului [Оценка иммунологического статуса человека. Методические рекомендации (под редакцией Петрова Р.В., Чередыевой А.Н.). Москва, 1980].

Celulele mononucleare au fost izolate din sângele heparinizat prin centrifugare în gradientul densității verografinicolului ($d=1.076$).

Activitatea stimulatorie a fost apreciată într-un test de sarcină [Оценка иммунологического статуса человека. Методические рекомендации (под редакцией Петрова Р.В., Чередыевой А.Н.). Москва, 1980].

Datele referitoare la acțiunea preparatelor asupra imunității celulare T (în %) sunt date în tabelul 1, iar cele referitoare la acțiunea preparatelor asupra imunității B (în %) sunt prezentate în tabelul 2.

55

Tabelul 1

MD 1485 G2

5

Distribuția mostrelor în raport cu numărul de rozete	Control	Remediul conform invenției	Levamisol	Nucleinat de sodiu
58-56		11	66	16
52-50	32	34	20	33
49-42		35	6	33
40-38		16	6	9
<32		4	-	9

Tabelul 2

Distribuția mostrelor în raport cu numărul de rozete	Control	Remediul conform invenției	Levamisol	Nucleinat de sodiu
30-25		58	11.7	23.3
24-20	12	23	16.6	23.3
19-15		17	20	25
<12		2	51.6	28.4

- 5 După cum reiese din aceste tabele, remediul conform invenției prezente posedă activitate imunomodulatoare atât asupra sectorului imunității celulare B, cât și asupra sectorului imunității celulare T, adică este unicul imunomodulator cunoscut care manifestă efect concomitent asupra componentelor B și T ale imunității.
- 10 Acțiunea remediei solicitat a fost cercetată în diferite organizații terapeutice ale Republicii Moldova și Federației Ruse.
- În Institutul de Cercetări Științifice de Medicină Profilactică și Clinică al Ministerului Sănătății din Republica Moldova observațiile au fost efectuate pe 13 bolnavi de tuberculoză cu forme răspândite și 21 bolnavi cu pneumonii acute și astm bronșic. Toleranța preparatului a fost bună la toți bolnavii. Efecte secundare nu s-au observat.
- 15 Datele investigațiilor pe bolnavii de pneumonie acută au arătat că remediul solicitat în combinație cu antibiotice, preparate antibacteriene, remedii simptomatice a favorizat normalizarea datelor subiective în medie în decurs de 2 săptămâni. La momentul externării tusea și ralurile au dispărut complet la 52 bolnavi, la restul ele erau rare, cu o cantitate mică de spută ușor expectorată.
- 20 La toți bolnavii cu simptome de endobronșită nespecifică la momentul externării tabloul endoscopic era normal. La toți bolnavii s-a mai observat reducerea numărului de leucocite nucleare segmentate și mărirea de 1.5-2.0 ori a numărului de limfocite.
- 25 La 21 bolnavi cu patologie pulmonară nespecifică s-au efectuat cercetări imunologice în dinamică, precum și probe de sarcină cu remediul, obținut conform invenției. S-a stabilit că remediul solicitat *in vitro* crește numărul celulelor B la 11 bolnavi din 21 și al celulelor T la 5 bolnavi din 21. S-a constatat de asemenea că la bolnavii care reacționează la remediul se normalizează numărul celulelor B și starea funcțională a celulelor T.
- În toate cazurile de tratament remediul era administrat câte 2.0 ml intramuscular lent, la intervale de 48 ore, 7 injecții la o cură.
- 30 După cum reiese din aceste tabele, remediul conform invenției prezente posedă activitate imunomodulatoare atât asupra sectorului imunității celulare B, cât și asupra sectorului imunității celulare T, adică este unicul imunomodulator cunoscut care manifestă efect concomitent asupra componentelor B și T ale imunității.
- 35 Acțiunea remediei solicitat a fost cercetată în diferite organizații terapeutice ale Republicii Moldova și Federației Ruse.
- În Institutul de Cercetări Științifice de Medicină Profilactică și Clinică al Ministerului Sănătății din Republica Moldova observațiile au fost efectuate pe 13 bolnavi de tuberculoză cu forme răspândite și 21 bolnavi cu pneumonii acute și astm bronșic. Toleranța preparatului a fost bună la toți bolnavii. Efecte secundare nu s-au observat.
- 40 Datele investigațiilor pe bolnavii de pneumonie acută au arătat că remediul solicitat în combinație cu antibiotice, preparate antibacteriene, remedii simptomatice a favorizat normalizarea datelor subiective în medie în decurs de 2 săptămâni. La momentul externării tusea și ralurile au dispărut complet la 52 bolnavi, la restul ele erau rare, cu o cantitate mică de spută ușor expectorată.

MD 1485 G2

6

La toți bolnavii cu simptome de endobronșită nespecifică la momentul externării tabloul endoscopic era normal. La toți bolnavii s-a mai observat reducerea numărului de leucocite nucleare segmentate și mărirea de 1.5-2.0 ori a numărului de limfocite.

5 La 21 bolnavi cu patologie pulmonară nespecifică s-au efectuat cercetări imunologice în dinamică, precum și probe de sarcină cu remediu, obținut conform invenției. S-a stabilit că remediu solicitat *in vitro* crește numărul celulelor B la 11 bolnavi din 21 și al celulelor T la 5 bolnavi din 21. S-a constatat de asemenea că la bolnavii care reacționează la remediu se normalizează numărul celulelor B și starea funcțională a celulelor T.

10 În toate cazurile de tratament remediu era administrat câte 2.0 ml intramuscular lent, la intervale de 48 ore, 7 injecții la o cură.

În Clinica Institutului Central de Cercetări Științifice din Sankt Petersburg remediu solicitat a fost administrat la 12 bolnavi oncologici. Stimularea a fost realizată prin introducerea intramusculară a 2 ml de preparat o dată la 4 zile, 3-4 injecții în total. Ca rezultat al tratamentului a fost stabilită acțiunea imunomodulatoare a preparatului referitor la următorii parametri:

15 - majorarea numărului total de leucocite;
- majorarea numărului total de leucocite nucleare segmentate, ameliorarea proprietăților lor funcționale;
- creșterea numărului total de limfocite,
- tendința de micșorare a nivelului maselor moleculare medii,
20 - tendința de micșorare a conținutului complexelor imune circulante.

La Centrul Regional de Profilaxie și Combatere SIDA din Rostov-pe-Don acțiunea remediu a fost cercetată pe 3 grupe de bolnavi:

25 prima - copii cu diagnosticul SIDA - 5 persoane;
a doua - adulți cu diagnosticul SIDA - 2 persoane;
a treia - bolnavi somatici adulți - 7 persoane.

S-a stabilit că asupra celulelor T ale sistemului imun al copiilor acțiunea era pozitivă în 100% din cazuri; la adulții cu diagnosticul SIDA - la 50% cazuri și la bolnavii somatici (bolnavi cardiologici, bolnavi cu stare bronhologică și stare imunodeficientă) în 83% cazuri.

30 Lipsa efectului stimulator asupra celulelor T ale sistemului imun la 50% din adulți cu diagnosticul SIDA se explică prin numărul mic de bolnavi, precum și prin deteriorarea profundă a imunității lor, în timp ce copiii cu diagnosticul SIDA și bolnavii somatici adulți posedă o rezervă de posibilități compensatorii ale sistemului imun.

MD 1485 G2

7

(57) Revendicări:

- 5 1. Procedeu de preparare a imunomodulatorului prin hidroextractiona substanțelor active din materie primă vegetal-terapeutică în procesul fierberii cu răcirea și filtrarea ulterioară, **caracterizat prin aceea că** în calitate de materie primă vegetal-terapeutică se iau în % de masă: iarbă de coadașoricelului (*Achillea millefolium*) 5...15, flori de filimică (*Calendula officinalis*) 5...15, frunze de urzică (*Urtica dioica*) - restul, în raportul materie primă vegetal-terapeutică: apă de 1:50, fierberea se realizează timp de 2...3 min, răcirea se efectuează până la temperatura de 35...37°C, iar filtratul se diluează cu apă distilată 1:10 respectiv, se filtrează prin caolin, suplimentar se filtrează și se sterilizează.
- 10 2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** filtrarea suplimentară se realizează prin filtrare fină.
- 15 2. 3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** filtrarea suplimentară se realizează prin ultrafiltrare.

(56) Referințe bibliografice:

1. SU 1367196 A
2. SU 1264736 A

Șef secție:

CRECETOV Veaceslav

Examinator:

TIMONIN Alexandr

Redactor:

CANȚER Svetlana