



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(21)



HR P990407A A2

HR P990407A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: A 61 K 35/78
A 61 K 47/00

(22) Datum podnošenja prijave patenta: 23.12.1999.

(41)(43) Datum objave prijave patenta: 30.04.2000.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US99/13949

Datum podnošenja međunarodne prijave 19.06.1999.

(87) Broj međunarodne objave: WO 99/66941

Datum međunarodne objave 29.12.1999.

(30) Podaci o pravu prvenstva: US

23.06.1998.

09/102,355

(71)(72) Podnositelj prijave i izumitelj: Ahmad, Abdallah Shehadeh, 6841 Woodchase Drive, Granite Bay, CA,
US

(74) Punomoćnik: Silvije HRASTE, ZAGREB, HR

(54) Naziv izuma: KOMPOZICIJA BILJNOG EKSTRAKTA I POSTUPAK SA DJELOVANJEM NA POJAČAVANJE
IMUNITETA

(57) Sažetak: Kompozicija biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA. Kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma pokazuje in vitro stimulaciju transformacije limfocita i proizvodnje citokina, i in vitro inhibiciju vezanja gp120, i predstavlja snažan kandidat za terapije i liječenja imunih poremećaja i HIV infekcija.

HR P990407A A2

Područje izuma

Ovaj izum se odnosi općenito na biljne ekstrakte, postupke i liječenja, i određenije na pripravak izveden od biljaka ili biljni ekstrakt i postupak koji terapijski pojačava imunitet i ima antivirusno djelovanje, za pojačavanje ili stimuliranje prirodnog imunološkog odgovora kod ljudi.

Opis pozadine izuma

Povijest farmakognozije je nerazmrsivo isprepletena s modernom medicinom. Mnogi poznati moderni lijekovi su razvijeni od prastarih tradicija liječenja povezanih s određenim biljkama. Medicinska svojstva mnogih biljaka su određena specifičnim kemijskim spojevima koji su izolirani, pročišćeni i, u mnogim slučajevima, sintetički reproducirani. Mnogi poznati lijekovi su originalno izvedeni od biljaka. Salicilna kiselina, prekursor aspirina, je originalno izolirana iz kore bijele vrbe i zeleni suručice. Kinin, koji se upotrebljava za liječenje malarije, je dobiven iz kore kininovca (Cinchona). Vinkristin, koji se upotrebljava u liječenju raka, se dobiva iz zimzelena. Lijek protiv raka Taxol je originalno izoliran iz kore i iglica drveta pacifičke tise. Možda su najpoznatiji morfin i kodein, koji su dobiveni iz opijumskog maka. Morfin je još uvijek standard prema kojem se mjere novi sintetski lijekovi protiv bolova.

Upotreba biljaka za medicinske svrhe je starija od zabilježene povijesti. Korijen sljeza, zumbul i stolisnik su pronađeni pažljivo posloženi oko kostiju čovjeka iz kamenog doba u Iraku. Korijen sljeza je droga sa sluzi koja ima antiinflamatorna svojstva, i upotrebljava se za liječenje upaljenih ili iritiranih sluznica. Zumbul se upotrebljava kao diuretik, da olakša otpuštanje suvišne vode iz tkiva. Stolisnik je drevni lijek protiv prehlade i vrućice koji se nekad široko upotrebljavao, kao aspirin danas.

Moderni liječnici, naročito u SAD, obično se oslanjaju na tretmane sintetskim ili kemijski proizvedenim lijekovima. Radije nego da upotrebljavaju cijele biljke ili biljne ekstrakte za liječenje, farmakolozi identificiraju, izoliraju, ekstrahiraju i sintetiziraju aktivne spojeve iz biljaka za upotrebu u liječenju. Ovaj pristup, međutim, ima nedostatke. Kao dodatak pojedinim fiziološki aktivnim spojevima koji su prisutni u biljci, tamo se također nalaze minerali, vitamini, glikozidi, ulja, alkaloidi, bioflavonoidi, i druge tvari koje mogu biti važne za podupiranje medicinskih svojstava određene biljke. Te dodatne tvari mogu imati sinergističko djelovanje koje je odsutno kad se pročišćeni ili sintetski farmakološki aktivni spojevi upotrebljavaju sami. Zatim, toksičnost pročišćenih farmakološki aktivnih spojeva je općenito viša nego kad su farmakološki aktivni spojevi prisutni s ostalim tvarima u biljci.

Djelotvornost raznih biljnih lijekova, ekstrakata, napitaka i tretmana je dobro poznata, i terapijski biljni proizvodi su sve više priznati kao poželjne alternative sintetskim lijekovima. Na primjer, US Patent br. 4.446.130 otkriva upotrebu ekstrakta ginsenga koji ima stimulativno i diuretsko djelovanje. US Patent br. 4.886.665 poučava o upotrebi pripravaka od zobi i ekstrakata koprive. US Patent br. 4.671.959 otkriva upotrebu smjesa prirodnih ulja za smanjenje stresa. US Patent br. 5.064.675 se odnosi na kompoziciju biljnog ekstrakta koji ima smirujuće djelovanje. US Patent br. 5.407.675 otkriva biljni ekstrakt koji se upotrebljava za tretiranje vlasišta. US Patent br. 5.178.865 otkriva smjesu biljnog ekstrakta koja inhibira infekciju virusom humane imunodeficiencije ili HIV *in vitro*. US Patent br. 5.500.340 i US Patent br. 5.294.443 otkrivaju upotrebu biljnih ekstrakata za imunosupresiju i liječenje autoimunih poremećaja.

Ljudski imuni odgovor je izuzetno kompleksan i zahtijeva stalnu interakciju stanica uključenih u imuni sustav. Intracelularnu komunikaciju olakšava sekrecija kemijskih glasničkih proteina poznatih kao citokini, koji djeluju tako da pojačavaju rast stanice, potpomažu aktivaciju stanice, usmjeravaju stanični promet, stimuliraju funkciju makrofaga, uništavaju antigene, i ostale funkcije. Citokini općenito uključuju limfokine, koje izlučuju T-limfociti, i monokine koje izlučuju monociti. Interferoni, koji se upotrebljavaju za obranu od virusnih infekcija i rasta tumorskih stanica, su važna klasa citokina. Citokini također uključuju interleukine, koji su uključeni u staničnu diferencijaciju, i tumor nekrotizirajući faktori i faktori transformacije rasta koji su uključeni u posredovanje u upalnim i citotoksičnim reakcijama. Drugi važan skup proteina u ljudskom imunom odgovoru su imunoglobulini, koje izlučuju B-limfociti. Imunoglobulini služe kao antitijela koja se suprotstavljaju virusnim, bakterijskim i drugim antigenima.

Osobe koje pate od imunosupresivnih bolesti ili stanja kao što je virus humane imunodeficiencije (HIV), rak, hepatitis, zatajenje bubrega, dijabetes, astma, artritis, i slično, često imaju snižene razine limfocita i odgovarajuće snižene razine citokina. Na primjer, kad su pojedinci zaraženi HIV-om, limfociti koji imaju na staničnoj površini antigen poznat kao CD4, prisutni su u nekarakteristično niskom broju. Dok su kod zdravih pojedinaca te CD4 limfocitne stanice prisutne u koncentracijama od oko 800 stanica po mililitru seruma, HIV-zaraženi pojedinci imaju samo 200 CD4 stanica po mililitru seruma kad se razviju oportunističke infekcije. Izgleda da su specifične vrste CD4 limfocita poznate kao TH1 i TH2 stanice naročito važne u odgovoru posredovanom stanicama na HIV-infekciju. TH1 stanice proizvode interleukin -2 (IL-2) i gama interferon (IFN γ). TH2 stanice proizvode interleukine -4, -5 i -10 (IL-4, IL-5 i IL-10). Za citokine koje izlučuju TH1 i TH2 stanice se vjeruje da imaju suprotno djelovanje jedni na druge, sa citokinima koje izlučuju TH1

stanice djeluju tako da reguliraju proizvodnju citokina TH2 stanica, i obratno. Rano u tijeku HIV infekcije, dominira TH1 odgovor, i sekrecija IL-2 od strane TH1 stanice povećava aktivnost CD8 limfocita.

Prirodno prisutni interferoni, interleukini i imunoglobulini koje izlučuju limfociti su dobro konstruirani za regulaciju ljudskog imunog odgovora, i liječenje imunodeficientnih ili imuno-suprimiranih pacijenata interferonima, interleukinima i imunoglobulinima može biti djelotvorno. Industrijska proizvodnja interferona, interleukina i imunoglobulina pomoću tehnika genetičkog inženjerstva je dobro poznata, pritom se geni odgovorni za proizvodnju tih proteina uvode u bakterije, koje se zatim uzgajaju i sakupljaju. Interferoni, interleukini i imunoglobulini koje izlučuju genetski modificirane bakterije se zatim pročišćavaju i daju pacijentima pomoću injekcije ili intravenskim metodama. Metoda oralne primjene za davanje interferona, interleukina i imunoglobulina pacijentima još nije ostvarena, jer ih želučana kiselina i enzimi razgrađuju prije nego oni dođu do krvotoka.

Za razne biljke se vjeruje da imaju pozitivan učinak na ljudski imuni sustav. Na primjer, za biljke *Echinacea purpurea* i *Echinacea angustifolia* se vjeruje da stimuliraju aktivnost T-stanica. Mowery, D. B.: "*The Scientific Validation of Herbal Medicine*", Keats Publishing, Inc., New Canaan Press, 1986. str. 118-119. Za *Astragalus membranaceus* se vjeruje da može stimulirati proizvodnju interferona i Imunoglobulina A i G (IgA i IgG) kod miševa. Kaiser, J. D.: "*Immune Power. A Comprehensive Treatment Program for HIV.*", St. Martin's Press, New York, 1993, str. 59-60.

Međutim, biljni ili izveden od biljaka ekstrakt koji djelotvorno pruža stimulativan ili pojačavajući učinak na ljudski imuni sustav sve do sada nije bio poznat.

Prema tome, postoji potreba za kompozicijom biljnog ekstrakta i postupkom, koji je zdravi dodatak i služi za liječenje općenito ljudi ili životinja koji imaju bolesti ili stanja koja suprimiraju imuni odgovor. Ovaj izum ispunjava te potrebe, kao i ostale, i općenito nadilazi nedostatke koji se nalaze u pozadini struke.

Bit izuma

Ovaj izum je kompozicija biljnog ekstrakta i postupak izrade i upotrebe istog, za stimuliranje ili pojačavanje imunog odgovora kod ljudi i životinja. Imena, klasifikacije, i geografska podrijetla biljaka ili trava upotrijebljenih u izumu se nalaze ispod u tablici 1.

Tablica 1

Upotrijebljeno ime biljke	Klasifikacija	Podrijetlo	Dio (dijelovi)
KOZLAC	Arum, porodica ARACEAE	Azija, Afrika, Europa i Amerike	listovi i/ili korijenje
NAR	Punica granatum, porodica Punicaceae	Sirija, Irak, Turska, Italija i drugi dijelovi svijeta	ljuska ploda
ČAJEVAC	Camelia sinensis, porodica Theaceae	Kina, Japan, istočna Indija	listovi
HIBISKUS	porodica sljeza, Malvaceae	Afrika, istočna Indija i Kina	cvjetovi

Tipično, mogu se upotrijebiti svježi ili osušeni listovi, sjemenke, kora, plod, ljuska, cvjetovi i/ili korijenje svake od gore navedenih biljaka ili trava u pripravi kompozicije biljnog ekstrakta iz izuma kako će biti detaljno opisano niže. Međutim, poželjni dijelovi KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA koji se upotrebljavaju za ekstrakciju su kako je prikazano u tablici 1. Općenito biljke se ekstrahiraju vrućom vodom, iako se alternativno mogu upotrijebiti etanolne vodene otopine i etanol za ekstrakciju.

Općenito govoreći, kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma sadržava ekstrakt KOZLACA. Drugo utjelovljenje izuma je kompozicija biljnog ekstrakta koja sadržava između približno 10 % i približno 90 % ekstrakta NARA. Kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma može dalje sadržavati između približno 10 % i približno 90 % ekstrakta HIBISKUSA, i/ili između približno 10 % i približno 90 % ekstrakta ČAJEVCA. Poželjno, kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma sadržava općenito jednake dijelove ekstrakta KOZLACA, ekstrakta NARA, ekstrakta HIBISKUSA i ekstrakta ČAJEVCA.

Kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma pruža zdrav i hranjiv dodatak ljudskoj djeci, time što sadržava vitamin C, vitamin E, vitamin D2, vitamin D3, vitamin K, otopljene minerale uključujući fosfor, natrij, kalij, cink, magnezij i

bakar, i brojne korisne proteine. Proteini uključuju razne citokine ili proteine slične citokinima, i imunoglobulin ili proteine slične imunoglobulinu, za koje se vjeruje da imaju stimulirajući ili pojačavajući učinak na imuni sustav. Kao nutritivni dodatak, kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma se uzima oralno, ili se može nanijeti lokalno.

- 5 Eksperimentalni rezultati (prodiskutirani niže) pokazuju da je kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma djelotvorna u pojačavanju ljudskog imunog odgovora. *In vitro* eksperimenti pokazuju da kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma stimulira imunost posredovanu stanicama, stimulacijom blastogeneze ili blastne transformacije limfocita i stimulacijom proizvodnje citokina u suspenzijama limfocita kod zdravih osoba, kod oboljelih od leukemije, i kod pacijenata sa zatajenjem bubrega. Početni eksperimentalni rezultati također pokazuju da je kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma
10 djelotvorna u inhibiranju HIV infekcije *in vitro*. Ti eksperimenti i dobiveni podaci pokazuju da je kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma koristan izvor ili kandidat za snažne terapije imunih poremećaja.

- Postupak izrade kompozicije biljnog ekstrakta iz izuma poželjno uključuje korake pripreme ekstrakta KOZLACA, pripreme ekstrakta NARA, pripreme ekstrakta HIBISKUSA, pripreme ekstrakta ČAJEVCA, i spajanja ekstrakata
15 KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA.

- Postupak upotrebe izuma za stimulaciju *in vitro* imunosti posredovane stanicama uključuje kontakt ili izlaganje stanica djelotvornoj količini pripravka koji se sastoji zapravo od ekstrakta KOZLACA, ekstrakta NARA, ekstrakta HIBISKUSA i ekstrakta ČAJEVCA.
20

- Postupak upotrebe izuma za stimulaciju *in vitro* blastogeneze limfocita uključuje kontakt ili izlaganje suspenzija limfocita djelotvornoj količini pripravka koji se sastoji zapravo od ekstrakta KOZLACA, ekstrakta NARA, ekstrakta HIBISKUSA i ekstrakta ČAJEVCA.

- 25 Postupak upotrebe izuma za stimulaciju *in vitro* proizvodnje citokina u perifernim mononuklearnim krvnim stanicama uključuje kontakt ili izlaganje tih stanica djelotvornoj količini pripravka koji se sastoji zapravo od ekstrakta KOZLACA, ekstrakta NARA, ekstrakta HIBISKUSA i ekstrakta ČAJEVCA.

- Predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta i postupak koji je koristan izvor ili kandidat za terapije i
30 liječenja ljudi i životinja koji boluju od imunosupresivnih i autoimunih bolesti, poremećaja, infekcija ili stanja.

- Drugi predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta i postupka koji osigurava nutritivni dijetalni dodatak za ljude i životinje.

- 35 Još jedan predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta i postupka koji stimulira ili pojačava imuni odgovor kod ljudi i životinja.

- Još jedan predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta i postupka koji stimulira *in vitro* imunost posredovanu stanicama.
40

- Još jedan predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta i postupka koji stimulira imunost posredovanu stanicama kod ljudi i životinja.

- Još jedan predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta i postupka koji stimulira *in vitro* blastnu transformaciju ili blastogenezu limfocita.
45

- Još jedan predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta i postupka koji stimulira blastnu transformaciju ili blastogenezu limfocita kod ljudi i životinja.

- 50 Još jedan predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta i postupka koji stimulira *in vitro* proizvodnju citokina u perifernim mononuklearnim krvnim stanicama.

- Još jedan predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta i postupka koji stimulira proizvodnju citokina kod ljudi i životinja.

- 55 Još jedan predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta i postupka za *in vitro* inhibiciju vezanja gp120 za MT4 stanice.

- Još jedan predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta i postupka za *in vitro* inhibiciju HIV infekcije MT4 stanica.
60

Još jedan predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta i postupka za liječenje imunosupresivnih poremećaja i stanja, koji je relativno netoksičan.

Još jedan predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta koja uključuje razne citokine i/ili proteine slične citokinima, i imunoglobulin i/ili proteine slične imunoglobulinu.

Još jedan predmet izuma je pružanje kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava vitamin C, vitamin E, vitamin D2, vitamin D3, vitamin K, otopljene minerale uključujući fosfor, natrij, kalij, cink, magnezij i bakar, i brojne korisne proteine.

Daljnji predmeti i prednosti izuma će bit izloženi u sljedećim dijelovima opisa, gdje detaljan opis služi za potpuno otkrivanje izuma bez postavljanja granica na njega.

Kratak opis slika

Ovaj izum će biti potpuno razumljiv s obzirom na sljedeće slike, koje su samo u svrhu ilustracije.

Slika 1 je grafički prikaz učinka kompozicije biljnog ekstrakta iz izuma na blastogenezu normalnih limfocita.

Slika 2 je grafički prikaz učinka biljnog ekstrakta iz izuma na blastogenezu limfocita kod oboljelih od leukemije.

Slika 3 je grafički prikaz učinka biljnog ekstrakta iz izuma na blastogenezu limfocita kod pacijenata sa zatajenjem bubrega.

Detaljan opis poželjnih izvođenja izuma

Ovaj izum se odnosi općenito na upotrebu biljnih ekstrakata KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA, i njihovih raznih kombinacija, za pojačavanje ili stimuliranje imunog odgovora kod ljudi i životinja, za liječenje ljudi i životinja koje pate od imunosupresivnih ili autoimunih bolesti ili stanja, i za inhibiciju HIV infekcija kod ljudi.

Primjer 1 prikazuje postupak priprave i spajanja biljnih ekstrakata KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA.

Primjer 2 se odnosi na upotrebu kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA za *in vitro* blastnu transformaciju suspenzija normalnih limfocita.

Primjer 3 se odnosi na upotrebu kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA za *in vitro* blastogenezu perifernih krvnih limfocita kod pacijenata s akutnom leukemijom.

Primjer 4 se odnosi na upotrebu kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA za *in vitro* blastogenezu perifernih krvnih limfocita kod pacijenata sa zatajenjem bubrega.

Primjer 5 se odnosi na upotrebu kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA za *in vitro* stimulaciju proizvodnje citokina u perifernim mononuklearnim krvnim stanicama (PMBC, peripheral mononuclear blood cells) kod zdravih osoba.

Primjer 6 opisuje upotrebu kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA za *in vitro* inhibiciju vezanja gp120 za MT-4 stanice, izmjereno vezanjem OKT-4A mAb.

Primjer 7 opisuje upotrebu kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA za *in vitro* inhibiciju vezanja gp120 za MT-4 stanice, izmjereno pomoću anti gp120 mAb.

Primjer 8 opisuje analitičko ispitivanje spojenih ekstrakata KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA.

Primjer 1

Priprava ekstrakata

Ovaj primjer opisuje pripremu i spajanje ekstrakata KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA. Poziva se na tablicu 1 iznad, s obzirom na poželjne dijelove biljaka KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA, koji se upotrebljavaju u postupku ekstrakcije. Niže opisanim postupcima se može povećati mjerilo, da se proizvedu veće količine ekstrakata. Pruženi detalji za pripremu sljedećih ekstrakata pokazuju trenutno poželjan postupak za pripremu ekstrakata i ne bi se trebali smatrati kao ograničenje. Količine i vremena niže opisana se mogu mijenjati u praksi da se dobiju prikladni ekstrakti KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA, u skladu s izumom.

1. Priprava ekstrakta KOZLACA.

Približno 20 grama osušenog, fino usitnjenog KOZLACA i 1 litra destilirane vode se dodaju u posudu od nerđajućeg čelika za kuhanje pod tlakom i hermetički zatvore poklopcem od nerđajućeg čelika. Smjesa se zagrije do vrenja (približno 100 °C) i ostavi da vrije približno 45 minuta, i zatim se zagrije do približno 130 °C i kuha približno 15 minuta, zatim se ostavi da se ohladi ispod 100 °C, da se dobije tekući ekstrakt KOZLACA. Ekstrakt KOZLACA se upotrijebi dok je još topao ili vruć, na način koji je niže opisan.

2. Priprava ekstrakta NARA.

Približno 60 grama osušenog, fino usitnjenog NARA i 1 litra destilirane vode se dodaju u posudu od nerđajućeg čelika za kuhanje pod tlakom i hermetički zatvore poklopcem od nerđajućeg čelika. Smjesa se zagrije do vrenja (približno 100 °C) i ostavi da vrije približno 45 minuta, i zatim se zagrije do približno 130 °C i kuha približno 15 minuta, zatim se ostavi da se ohladi ispod 100 °C, da se dobije tekući ekstrakt NARA. Ekstrakt NARA se upotrijebi dok je još topao ili vruć na način niže opisan.

3. Priprava ekstrakta HIBISKUSA.

Približno 15 grama osušenog, fino usitnjenog HIBISKUSA i 1 litra destilirane vode se dodaju u posudu od nerđajućeg čelika za kuhanje pod tlakom i hermetički zatvore poklopcem od nerđajućeg čelika. Smjesa se zagrije do vrenja (približno 100 °C) i ostavi da vrije približno 45 minuta, i zatim se zagrije do približno 130 °C i kuha približno 15 minuta, zatim se ostavi da se ohladi ispod 100 °C, da se dobije tekući ekstrakt HIBISKUSA. Ekstrakt HIBISKUSA se upotrijebi dok je još topao ili vruć na način niže opisan.

4. Priprava ekstrakta ČAJEVCA.

Približno 40 grama osušenog, fino usitnjenog ČAJEVCA i 1 litra destilirane vode se dodaju u posudu od nerđajućeg čelika za kuhanje pod tlakom i hermetički zatvore poklopcem od nerđajućeg čelika. Smjesa se zagrije do vrenja (približno 100 °C) i ostavi da vrije približno 45 minuta, i zatim se zagrije do približno 130 °C i kuha približno 15 minuta, zatim se ostavi da se ohladi ispod 100 °C, da se dobije tekući ekstrakt ČAJEVCA. Ekstrakt ČAJEVCA se upotrijebi dok je još topao ili vruć na način niže opisan.

5. Priprava sjedinjenog ekstrakta KOZLACA i NARA

Približno 50 ml svakog od ekstrakta KOZLACA i ekstrakta NARA se prenesu dok su još topli do vrući (između približno 40 °C i 100 °C) u posudu od nerđajućeg čelika za kuhanje pod tlakom i hermetički zatvore poklopcem od nerđajućeg čelika, i zagrijevaju zajedno, uz neprestano miješanje ili potresanje, približno 90 minuta pri približno 100 °C. Tako dobivena smjesa se može ohladiti i zatim pohraniti uz hlađenje, ili upotrijebiti dok je još topla do vruća kako je niže opisano za pripremu daljnjih kombinacija ekstrakata. Sjedinjeni ekstrakti KOZLACA i HIBISKUSA, KOZLACA i ČAJEVCA, NARA i HIBISKUSA, i NARA i ČAJEVCA se također pripreme općenito identičnim postupkom.

6. Priprava sjedinjenog ekstrakta KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA.

Približno 100 ml sjedinjenog ekstrakta KOZLACA i NARA kako je pripremljen iznad, zajedno s približno 50 ml ekstrakta HIBISKUSA kako je pripremljen iznad, i približno 50 ml ekstrakta ČAJEVCA kako je pripremljen iznad, prenesu se dok su još topli do vrući (između približno 40 °C i 100 °C) u posudu od nerđajućeg čelika za kuhanje pod tlakom i hermetički zatvore poklopcem od nerđajućeg čelika, i zagrijevaju zajedno, uz neprestano miješanje ili potresanje, približno 90 minuta pri približno 100 °C. Tako dobivena smjesa općenito ima jednake dijelove svakog od ekstrakata KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA opisanih gore. Sjedinjena smjesa ekstrakata KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA se ostavi da se ohladi do sobne temperature. Za vrijeme hlađenja, sjedinjenoj smjesi se doda otopina pufera ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) dok je smjesa pri približno 30 °C do 60 °C, da smjesa dobije blago kiseli pH. Poželjno, pH sjedinjenog ekstrakta se podese na približno 4,0, i poželjnije na približno 3,8, iako je prikladno postići pH ispod 7. Nakon gornjeg postupka, sjedinjeni ekstrakt KOZLACA,

NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA se pohrani uz hlađenje na približno 4 °C. Sjedinjenom ekstraktu se može dodati trag natrij benzoata kao konzervans, i ako je poželjno mogu se dodati aroma ili boje za hranu.

Rezultati kemijske analize za sjedinjenu smjesu ekstrakata KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA su opisani niže, u primjeru 8.

Gornji postupak je upotrijebljen za pripravu sjedinjene smjese ekstrakata KOZLACA, NARA i HIBISKUSA, izostavljajući ekstrakt ČAJEVCA. Gornji postupak je također upotrijebljen za pripravu sjedinjene smjese ekstrakata KOZLACA, NARA i ČAJEVCA, izostavljajući ekstrakt HIBISKUSA. Gornji postupak je dalje upotrijebljen za pripravu sjedinjene smjese ekstrakata NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA, izostavljajući ekstrakt KOZLACA. Gornji postupak je dalje upotrijebljen za pripravu sjedinjene smjese ekstrakata NARA i HIBISKUSA, izostavljajući ekstrakt KOZLACA i ČAJEVCA.

Primjer 2

In vitro blastna transformacija limfocita kod zdravih osoba

Ovaj primjer opisuje učinak kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA koji su opisani u primjeru 1, na imunost posredovanu stanicama, koja je izmjerena *in vitro* blastnom transformacijom ili blastogeneom normalnih limfocita.

Blastogeneza je početni korak indukcije imunosti posredovane stanicama, i povezana je s otpuštanjem ili sekrecijom raznih interleukina koji su neophodni za intercelularnu interakciju imunog sustava. Imunost posredovana stanicama je uključena u obranu ljudskog tijela od malignoma, određenih virusnih infekcija uključujući HIV, intercelularnih bakterijskih infekcija, kao i regulaciju raznih staničnih i humoralnih imunoloških interakcija i sprečavanje autoimunih reakcija.

Blastna transformacija se izmjeri pomoću konvencionalnog testa stimulacije limfocita, pri čemu se ^3H (tricizirani) timidin doda u suspenzije limfocita, nakon čega slijedi inkubacija, sakupljanje stanica i mjerenje radioaktivnosti sakupljenih stanica. Visoka vrijednost radioaktivnosti ukazuje da su limfociti prošli transformaciju i preuzeli ^3H timidin.

Limfociti iz pune krvi od tri zdrave osobe se dobiju separacijom gradijentom gustoće na Ficoll Isopaque. Pripreme se mikrotitracijske ploče s mnogo otvora, koje sadrže suspenzije limfocita u Hanks otopini s dodatkom 10 % seruma goveđeg fetusa, penicilina i streptomcina. U otvore na svakoj od ploča se doda 5 μl , 10 μl i 20 μl sjedinjene smjese ekstrakata KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA. Konačni volumen suspenzije limfocita u svakom otvoru je 0,2 ml. Mikrotitracijske ploče se zatim inkubiraju 72 sata pri 37 °C u CO_2 inkubatoru. Zatim se u svaki otvor doda 0,05 ml ^3H (triciziranog) timidina, nakon čega slijede daljnja 24 sata inkubacije pri 37 °C, nakon čega se stanice iz otvora sakupce pomoću automatskog višestrukog sakupljača, i izmjeri se radioaktivnost scintilacijskim brojačem. Indeks stimulacije se izračuna iz prosječnih vrijednosti za svaku koncentraciju sjedinjenog ekstrakta. Rezultati su prikazani u tablici 2 i na slici 1.

Tablica 2

	Prosječna vrijednost (stupanj preuzimanja ^3H)	Indeks stimulacije
bez sjedinjenog ekstrakta	284 scintilacije/min (pozadina)	0
20 μl sjedinjenog ekstrakta	815 scintilacija/min	2,86
10 μl sjedinjenog ekstrakta	723 scintilacije/min	2,54
5 μl sjedinjenog ekstrakta	463 scintilacije/min	1,63

Rezultati prikazani u tablici 2 i na slici 1 pokazuju da dodatkom sve većih količina sjedinjenog ekstrakta suspenzijama limfocita dolazi do povećanih količina ili stupnjeva transformacije limfocita ili blastogeneze, što je pokazano povećanim vrijednostima radijacije zbog povećanog preuzimanja ^3H . Ovi rezultati pokazuju da kompozicija biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA pojačavaju ili stimuliraju imunost posredovanu stanicama stimuliranjem blastogeneze i rezultirajućom sekrecijom citokina kod zdravih osoba. Ovi rezultati dalje pokazuju da je kompozicija biljnog ekstrakta koristan izvor ili kandidat za snažne terapije i liječenja imunog poremećaja.

Primjer 3

In vitro blastogeneza limfocita periferne krvi kod pacijenata s akutnom leukemijom

Ovaj primjer opisuje učinak kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA koji su opisani u primjeru 1, na imunost posredovanu stanicama, koja je dalje izmjerena *in vitro* blastnom transformacijom ili blastogenezmom limfocita od pet pacijenata s leukemijom. PHA (fitohemaglutinin), poznati snažni mitogen koji stimulira transformaciju limfocita, je upotrijebljen da kalibrira ili izmjeri djelotvornost sjedinjenog ekstrakta.

Priprave se mikrotitracijske ploče s mnogo otvora, koje sadrže suspenzije limfocita od pet pacijenata s leukemijom u Hanks otopini s dodatkom 10 % seruma goveđeg fetusa, penicilina i streptomcina. U otvore na svakoj od ploča se dodaju količine od 5 μ l, 10 μ l i 20 μ l sjedinjene smjese ekstrakata KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA. Dodatno, u otvore se doda PHA (fitohemaglutinin) u koncentracijama od 1:50 i 1:100, kao kontrolne probe. Konačni volumen suspenzije limfocita u svakom otvoru je 0,2 ml. Mikrotitracijske ploče se zatim inkubiraju 72 sata pri 37 °C u CO₂ inkubatoru. Zatim se u svaki otvor doda 0,05 ml ³H (triciziranog) timidina, nakon čega slijede daljnja 24 sata inkubacije pri 37 °C. Stanice se iz otvora sakupe pomoću automatskog višestrukog sakupljača, i izmjeri se radioaktivnost scintilacijskim brojačem, i izračuna se indeks stimulacije za svaku koncentraciju sjedinjenog ekstrakta. Rezultati su prikazani u tablici 3 i na slici 2.

Tablica 3

Pacijent br.	Broj scintilacija (kontrola)	Broj scintilacija PHA 1:100	Broj scintilacija PHA 1:50	Broj scintilacija (st. indeks) ekstrakti 20 μ l	Broj scintilacija (st. indeks) ekstrakti 10 μ l	Broj scintilacija (st. indeks) ekstrakti 5 μ l
1	3236	3997	5949	9890 (3,0)	5179 (1,6)	4680 (1,14)
2	3462	4297	6288	8365 (2,4)	5340 (1,5)	4100 (1,18)
3	2384	4239	6857	7850 (3,2)	5100 (2,1)	4390 (1,8)
4	2222	4339	7600	7750 (4,48)	5060 (2,27)	4600 (2,07)
5	1890	3960	6010	7800 (4,1)	5960 (3,15)	3680 (1,94)

Rezultati prikazani u tablici 3 i na slici 2 pokazuju da dodatak sve većih količina sjedinjenog ekstrakta suspenzijama limfocita od pacijenata s leukemijom, rezultira povećanjem transformacije limfocita ili blastogeneze, kako se vidi iz povećavajućih vrijednosti radijacije zbog preuzimanja ³H. Kompozicija biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA pokazuje sposobnost stimuliranja transformacije limfocita koja je najmanje toliko velika kao kod PHA. Stimulacija blastne transformacije se povećala 306 % kod najviše (20 μ l) koncentracije. Ovi rezultati ukazuju da kompozicija biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA pojačava ili stimulira imunost posredovanu stanicama *in vitro* stimulacijom blastogeneze limfocita, i na taj način rezultirajuću sekreciju citokina u limfocitima pacijenata s leukemijom. Ovi rezultati dalje pokazuju da je kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma koristan izvor ili kandidat za snažne terapije i liječenja imunih poremećaja.

Primjer 4

In vitro blastogeneza limfocita periferne krvi kod pacijenata sa zatajenjem bubrega

Ovaj primjer opisuje učinak kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA koji su opisani u primjeru 1, na imunost posredovanu stanicama, koja je dalje izmjerena *in vitro* blastnom transformacijom ili blastogenezmom limfocita od petnaest pacijenata sa zatajenjem bubrega. PHA (fitohemaglutinin) u dvije koncentracije je upotrijebljen kao kontrola, da kalibrira ili izmjeri djelotvornost sjedinjenog ekstrakta.

Priprave se mikrotitracijske ploče s mnogo otvora, koje sadrže suspenzije limfocita od petnaest pacijenata sa zatajenjem bubrega u Hanks otopini s dodatkom 10 % seruma goveđeg fetusa, penicilina i streptomcina. U otvore na svakoj od ploča se dodaju sjedinjene smjese ekstrakata KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA u količinama od 5 μ l, 10 μ l i 20 μ l. Doda se PHA u koncentracijama od 1:50 i 1:100 u otvore, kao kontrolne probe. Konačni volumen suspenzije limfocita u svakom otvoru je 0,2 ml. Mikrotitracijske ploče se zatim inkubiraju 72 sata pri 37 °C u CO₂ inkubatoru,

nakon čega se u svaki otvor doda 0,05 ml ^3H (triciziranog) timidina, nakon čega slijede daljnja 24 sata inkubacije pri 37 °C. Stanice se iz otvora sakupe pomoću automatskog višestrukog sakupljača, i izmjeri se radioaktivnost scintilacijskim brojačem, i izračuna se indeks stimulacije za svaku koncentraciju sjedinjenog ekstrakta. Rezultati su prikazani u tablici 4 i na slici 3.

5

Tablica 4

Pacijent br.	Broj scintilacija (kontrola)	Broj scintilacija PHA 1:100	Broj scintilacija PHA 1:50	Broj scintilacija (st. indeks) ekstrakti 20 μl	Broj scintilacija (st. indeks) ekstrakti 10 μl	Broj scintilacija (st. indeks) ekstrakti 5 μl
6	2050	4150	5090	7650 (3,7)	4535 (2,2)	4290 (2,09)
7	5232	6718	8350	9460 (1,81)	6240 (1,19)	5640 (1,08)
8	4643	5950	7980	9680 (2,08)	5980 (1,29)	5100 (1,10)
9	4150	5660	7790	8940 (2,15)	5710 (1,37)	5200 (1,25)
10	6939	7600	9800	10250 (1,4)	7800 (1,12)	7100 (1,02)
11	5765	6830	8910	10630 (1,8)	6920 (1,2)	5940 (1,03)
12	4531	5100	6030	7150 (1,57)	6120 (1,35)	5090 (1,12)
13	5920	5700	7080	7980 (1,30)	7030	5850 (0,9)
14	6203	6800	7503	8250 (1,30)	7105	6930 (0,89)
15	4539	5240	6015	7030 (1,548)	6090	5440 (1,19)
16	4605	5405	6250	7654 (1,66)	6320	5660 (1,229)
17	3260	4100	5209	6800 (2,805)	5400	4300 (1,319)
18	4620	5410	6430	7930 (1,71)	6250	5430 (1,175)
19	4330	5310	6100	7800 (1,801)	6050	5450 (1,25)
20	3236	4100	5260	7260 (2,24)	5380	4330 (1,338)

Rezultati prikazani u tablici 4 i na slici 3 pokazuju da dodatak sve većih količina sjedinjenog ekstrakta suspenzijama limfocita od pacijenata sa zatajenjem bubrega, rezultira povećanjem transformacije limfocita ili blastogeneze, kako se vidi iz povećavajućih vrijednosti radijacije zbog preuzimanja ^3H . Sjedinjeni ekstrakt KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA pokazuje sposobnost stimuliranja transformacije limfocita koja je najmanje toliko velika kao kod PHA. Stimulacija blastne transformacije se povećala 306 % kod najviše (20 μl) koncentracije. Ovi rezultati ukazuju da sjedinjeni ekstrakt KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA pojačava ili stimulira imunost posredovanu stanicama *in vitro* stimulacijom blastogeneze limfocita, i rezultirajuću sekreciju citokina u limfocitima pacijenata sa zatajenjem bubrega. Ovi rezultati dalje pokazuju da je kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma koristan izvor ili kandidat za snažne terapije i liječenja imunih poremećaja.

Primjer 5

Stimulacija proizvodnje citokina kod zdravih osoba

Učinak kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA na proizvodnju citokina u ljudskim perifernim mononuklearnim stanicama krvi (PMBC) je izmjeren postupkom koji su opisali D. Schols i E. De Clencq u "*Human Immunodeficiency Virus Type gp120 Induces*

Anergy In Human Peripheral Blood Lymphocytes By Inducing Interleukin Production", J. Virol. Vol. 70, str. 4953-4960, (1996), čiji su dijelovi ovdje uključeni po referenci. Prosječni rezultati dvije zdrave osobe su prikazani u tablici 5.

Tablica 5

	% sjedinjenog ekstrakta	IL-2 pg/ml	IL-4 pg/ml	IL-10 pg/ml	IFN- γ pg/ml
Sredina	0 %	<	ND	35	31
	10 %	48	ND	502	197
	1 %	<	ND	653	<
	0,1 %	<	ND	232	<
PHA 2 μ g/ml	0 %	541	ND	178	969
	10 %	1221	ND	471	926
	1 %	585	ND	224	969
	0,1 %	524	ND	203	740
α -CD3 1/1000	0 %	370	ND	158	784
	10 %	659	ND	475	605
	1 %	272	ND	154	674
	0,1 %	352	ND	139	590
PMA 10 ng/ml + Calo 1 μ g/ml	0 %	1661	ND	<	1301
	10 %	949	ND	<	1444
	1 %	1323	ND	<	1275
	0,1 %	1153	ND	<	1408

Kako se može vidjeti iz tablice 5, prisutnost kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA uzrokuje proizvodnju znatnih količina interleukina 10 (IL-10) i γ -interferona (IFN- γ), iznad razina koje se izlučuju u otvorima bez biljnih ekstrakata. Interleukin 2 (IL-2) se može detektirati u otvorima u kojima je sjedinjeni ekstrakt prisutan u koncentraciji od 10 %. U staničnim kulturama pri koncentraciji od 10 % nije primijećena toksičnost, kako je izmjereno tripan plavilom. Ovi rezultati pokazuju da sjedinjeni ekstrakt KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA pojačava ili stimulira proizvodnju citokina *in vitro* u PMBC zdravih osoba. Ovi rezultati dalje pokazuju da je kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma koristan izvor ili kandidat za snažne terapije ili liječenja imunih poremećaja.

Primjer 6

In vitro inhibicija vezanja gp120 za MT-4 stanice

Izmjereno pomoću OKT-4A monoklonskih antitijela

Učinak kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA ("sjedinjeni ekstrakt") na vezanje rpg120 za MT-4, što se označi pomoću OKT-4A monoklonskih antitijela (mAb, monoclonal antibodies), je određeno postupkom koji su opisali J. Neyts, D. Reymen, D. Letourneur, J. Jozefonvicz, D. Schols, J. Este. G. Andrei, P. McKenna, M. Witvrouw, S. Ikeda, J. Clements i E. De Clercq u "Differential Antiviral Activity of Derivatized Dextrans", Biochem. Pharmacol., Vol. 50, str. 743-751, (1995), čiji su dijelovi ovdje uključeni po referenci. Protein omotača HIV-a gp120, koji se veže za OKT-4A, kompetitivno blokira vezanje OKT-4A mAb. Sjedinjeni ekstrakt KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA blokira vezanje gp120, kako je prikazano u tablici 6.

Tablica 6

Ispitni otvori	OKT-4A mAb vezanje (relativan broj stanica)
negativne kontrole	4
pozitivne kontrole	600
gp120	7
50 % sjedinjenog ekstrakta	150
25 % sjedinjenog ekstrakta	100
12,5 % sjedinjenog ekstrakta	90

6,25 % sjedinjenog ekstrakta	80
3,13 % sjedinjenog ekstrakta	30
1,57 % sjedinjenog ekstrakta	10
0,79 % sjedinjenog ekstrakta	8

Kako se može vidjeti iz tablice 6, gdje sve veće količine kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA rezultiraju povećanjem inhibicije vezanja gp120 za MT-4 stanice. Ovi rezultati pokazuju da je kompozicija biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA koristan izvor ili kandidat za snažne *in vivo* anti-HIV terapije i liječenja kod inficiranih domaćina.

Primjer 7

In vitro inhibicija vezanja gp120 za MT-4 stanice

Izmjereno pomoću anti-gp120 monoklonskih antitijela

Učinak kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA ("sjedinjeni ekstrakt") na vezanje rpg120 za MT-4, što se označi pomoću anti-gp120 monoklonskih antitijela (mAb), je određeno postupkom koji su opisali D. Schols, M. Baba, R. Pauwels i E. De Clercq u "*Flow Cytometric Method To Demonstrate Whether Anti-HIV-1 Agents Inhibit Virion Binding To T4⁺ Cells*", čiji su dijelovi ovdje uključeni po referenci. Sjedinjeni ekstrakt KOZLACA, NARA, HIBISKUSA i ČAJEVCA blokira vezanje gp120, kako je prikazano u tablici 7.

Tablica 7

Ispitni otvori	Anti-gp120 mAb vezanje (relativan broj stanica)
negativne kontrole	4
pozitivne kontrole	90
50 % sjedinjenog ekstrakta	60
10 % sjedinjenog ekstrakta	70
2 % sjedinjenog ekstrakta	40
0,4 % sjedinjenog ekstrakta	80
dekstran sulfat, 25 µg/ml (pozitivna kontrola)	50

Kako se može vidjeti iz tablice, kompozicija biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA inhibira vezanje gp120 za MT-4 stanice. Ovi rezultati pokazuju da je kompozicija biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA koristan izvor ili kandidat za snažne *in vivo* anti-HIV terapije i liječenja kod inficiranih domaćina.

Primjer 8Kemijska analiza sjedinjenog ekstrakta

- 5 Upotrijebljene su konvencionalne analitičke tehnike za ispitivanje kemijskog sastava kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA, na razne vitamine, masnoće, boje, proteine, minerale i ostale spojeve.

Ti su analitički rezultati rezimirani u tablici 8.

10

Tablica 8

Predmet analize	Metoda	Rezultat
sadržaj masnoća, ukupno	liofilizacija	3,698 g/100 ml
sadržaj masnoća, ostatak	liofilizacija	3,50 g/100 ml
sadržaj masnoća, ostatak	rotacijska evaporacija	4,83 g/100 ml
netopljive tvari	gravimetrija	0,198 g/100 ml
sadržaj pepela, vlažno 105°C	gravimetrija	1,4 g/100 ml
pH vrijednost, nerazrijeđeno	elektrometrija	5,20
pH vrijednost, 1:10/voda	elektrometrija	5,47
ugljikohidrati, ukupno	fotometrija	20 % suhe tvari
makromolekule	gel-filtracija, grav.	15 % suhe tvari
proteini, ukupno	fotometrija	2,8 mg/100 ml
polisaharidi, ukupno	fotometrija	7,8 % suhe tvari
polisaharidi, netopljivi	fotometrija	0,1 % suhe tvari
polisaharidi, topljivi	fotometrija	7,5 % suhe tvari
nukleinske kiseline, ukupno	fotometrija	53,7 mg/100 ml
RNA	fotometrija	28,4 mg/100 ml
DNA	fotometrija	25,2 mg/100 ml
polifenoli	fotometrija	<2 mg/100 ml
lipidi, ukupno	TLC	<0,1 %
Na	bojenje plamena	+++
K	bojenje plamena, KClO ₄	+
Mg	titan žutilo	++
Ca	oksalat	++
Zn	ditizon	+
Cu	metokuproin	+
fosfat	amonij molibdat	+++
imunoglobulin A (IgA)	BIA s odlomkom proteina G, AC s "jacaline sepharose"	ne može se dokazati
imunoglobulin G (IgG)	BIA s imobiliziranim proteinom A	+
imunoglobulin M (IgM)	BIA s imobiliziranim proteinom B	ne može se dokazati
imunoglobulin E (IgE)	anti-Ig na test ploči	ne može se dokazati
adenozin	TLC	++
gvanozin	TLC	+
timidin	TLC	++
N,N-dimetil gvanozin	TLC	ne može se dokazati
adenin	TLC	+
gvanin	TLC	+
citozin	TLC	+
timin	TLC	+
stearinska kiselina	TLC	<1 mg/ml
interleukin 4 (IL-4)	ELISA	34 pg/ml (NWG 50 pg/ml)
interleukin 5 (IL-5)	ELISA	332 pg/ml (NWG 50 pg/ml)
interleukin 6 (IL-6)	ELISA	69 pg/ml (NWG 30 pg/ml)
interleukin 10 (IL-10)	ELISA	44 pg/ml (NWG 50 pg/ml)
interleukin 12 (IL-12)	ELISA	1095 pg/ml (NWG 1000 pg/ml)

γ -interferon (IFN- γ)	ELISA	29 pg/ml (NWG 50 pg/ml)
tumor nekrotizirajući faktor α (TNF α)	ELISA	5,7 pg/ml (NWG 3 pg/ml)
crvena boja	UV/Vis	0,7 % suhe tvari
zelena boja	UV/Vis	15,7 % suhe tvari
žuta boja	UV/Vis	<0,2 % suhe tvari
plava boja	UV/Vis	<0,1 % suhe tvari
vitamin C	TLC, fotometrija	3 mg/100 ml
vitamin E	TLC	+
vitamin K	TLC	+
vitamin D2	TLC	+
vitamin D3	TLC	+
endotoksini	LAL test	14 IU

Kako se može vidjeti iz rezultata u tablici 8, kompozicija biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA sadržava brojne esencijalne vitamine, uključujući vitamin C, vitamin E, vitamin K, vitamin D2, vitamin D3, kao i razne esencijalne minerale i druge korisne tvari, i prema tome predstavlja koristan i nutritivni dijetalni dodatak kad se uzme oralno.

Analitički rezultati prikazani u tablici 7 također ukazuju da su u kompoziciji biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA prisutni razni citokini ili proteini slični citokinima. Specifično, u kompoziciji biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA su prisutne određive količine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , i TNF α . Dodatno, izgleda da su tragovi IgG ili proteina sličnog imunoglobulinu prisutni u kompoziciji biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA. Prisutnost ljudskog IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , i TNF α i IgG je donekle nespojiva s biljnim porijeklom kompozicije biljnog ekstrakta. Međutim, poznati su biljni antivirusni faktori (AVF), koji imaju blisku homologiju sekvence kao ljudski β -interferon (IFN β), i za koje se vjeruje da iskazuju antiviralnu aktivnost na način sličan onom ljudskih interferona. Dakle, pozitivni rezultati za IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , i TNF α i IgG opisani iznad mogu biti zbog proteina sličnih interleukinima, proteina sličnih interferonima, proteina sličnih TNF, i proteina sličnih imunoglobulinima koji su prisutni u kompoziciji biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA. Dakle, termin "kompozicija biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA" kako je ovdje upotrijebljen bi se trebao shvatiti kao da također uključuje ili sadržava IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , i TNF α i IgG, kao i proteine slične interleukinima, proteine slične interferonima, proteine slične TNF, i proteine slične imunoglobulinima.

Diskusija

Gornji *in vitro* eksperimenti i dobiveni podaci pokazuju da je kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma koristan snažan izvor ili kandidat za terapije i liječenja za pojačavanje imuniteta za ljude i životinje koji pate od poremećaja, bolesti, infekcija ili stanja, uključujući imunosupresijska stanja zbog leukemije, zatajenja bubrega, raznih oblika raka i tumora, virusnih infekcija, bakterijskih infekcija i parazitskih infekcija. Točni kemijski spoj(evi) i farmakološki mehanizam(mehanizmi) čiji je rezultat *in vitro* stimulacija blastne transformacije i proizvodnja citokina još nisu razjašnjeni. Kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma može sadržavati samo jedan farmakološki aktivan sastojak, komponentu ili tvar koja djeluje sama, ili kombinaciju takvih sastojaka, komponenata ili tvari, i/ili njihove biološke metabolite ili derivate koji djeluju odvojeno ili sinergistički. *In vivo* terapije i liječenja koja upotrebljavaju kompoziciju biljnog ekstrakta iz izuma će se vjerojatno bazirati na oralno unesenim dozama kompozicije biljnog ekstrakta u tekućem ili krutom obliku. Rektalni, parenteralni, intravenski, lokalni, inhalacija aerosola i subkutani putevi za *in vivo* primjenu kompozicije biljnog ekstrakta iz izuma su također mogući. Kompozicija biljnog ekstrakta se može također primijeniti *in vivo* u smjesi ili kombinaciji s prikladnim ekscipijentima, nosačima, antivirusnim tvarima, imunim modulatorima, kemoterapijskim tvarima, antitijelima, ili njihovim kombinacijama. Farmakološki pripravci iz izuma mogu biti dozirani oblici kao npr. tablete, kapsule, supozitoriji, ampule ili izmjerene tekuće ili aerosol doze.

Trenutno, vjeruje se da se farmakološki aktivni spoj ili spojevi iz izuma nalaze u KOZLACU i/ili NARU. Početni eksperimenti ukazuju da ekstrakt KOZLACA sam, ekstrakt NARA sam, i sjedinjeni ekstrakt KOZLACA i NARA pokazuju neke imuno-pojačavajuće učinke. Međutim, poželjno utjelovljenje izuma sadržava sjedinjeni ekstrakt KOZLACA i NARA, kao i HIBISKUSA i ČAJEVCA. Vjeruje se da HIBISKUS i ČAJEVAC pružaju ostale dodatne komponente ili tvari koji djeluju kao ekscipijenti ili nosači ili koji inače imaju sinergistički učinak zajedno s komponentama koje daju KOZLAC i NAR. Dodatno, za poželjan postupak izrade kompozicije biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA, gdje se sjedinjeni ekstrakti

zajedno zagrijavaju u stadijima, kako je opisano u primjeru 1, se vjeruje da je bolji od samog miješanja ili spajanja ekstrakta KOZLACA, ekstrakta NARA, ekstrakta HIBISKUSA i ekstrakta ČAJEVCA bez dodatnog zagrijavanja.

Gore navedeni *in vitro* eksperimenti i dobiveni podaci također pokazuju da je kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma koristan snažan izvor ili kandidat za anti-HIV i druge antivirusne terapije i liječenja za ljude i životinje koji imaju HIV, druge virusne infekcije, ili komplikacije ili poremećaje povezane s takvim virusnim infekcijama. Biljni ekstrakt iz izuma može snažno inhibirati ili spriječiti infekciju stanica raznim virusima, uključujući, ali ne ograničeno na, herpes simplex viruse, ljudske papilloma viruse (HPV), vaccinia viruse, viruse vezikularnog stomatitisa, coxsackie viruse, sincicijske viruse, citomegalovirus, i varicella zoster viruse.

Anti-HIV aktivnost kompozicije biljnog ekstrakta iz izuma može potjecati od jednog samog farmakološki aktivnog sastojka, komponente ili tvari, ili kombinacije takvih sastojaka, komponenata ili tvari, i/ili njihovih bioloških metabolita ili derivata. *In vivo* terapije i liječenja koja koriste kompoziciju biljnog ekstrakta iz izuma će se vjerojatno bazirati na oralno unesenim ili lokalno nanesenim dozama kompozicije biljnog ekstrakta u tekućem ili krutom obliku. Rektalni, parenteralni, intravenski, inhalacija aerosola ili subkutani putevi za *in vivo* primjenu kompozicije biljnog ekstrakta iz izuma su također mogući. Kao za liječenje imunosupresivnih poremećaja, kompozicija biljnog ekstrakta se također primjeniti *in vivo* za antivirusna liječenja u smjesi ili kombinaciji s prikladnim ekscipijentima, nosačima, antivirusnim sredstvima, imunim modulatorima, kemoterapijskim sredstvima, antitijelima, antivirusnim sredstvima ili njihovim kombinacijama. Farmakološki pripravci iz izuma mogu biti oblici s jediničnom dozom, kao npr. tablete, kapsule, supozitoriji, losioni, ampule ili izmjerene tekuće ili doze aerosola.

Prema tome, bit će jasno da ovaj izum pruža kompoziciju biljnog ekstrakta koja predstavlja nutritivni dodatak koji stimulira *in vitro* imunost posredovanu stanicama, koji stimulira *in vitro* blastogenezu limfocita, koji stimulira *in vitro* proizvodnju citokina u limfocitima, koji inhibira *in vitro* infekciju HIV, i koji je snažan kandidat za liječenja i terapije za pojačavanje ili stimulaciju imunog odgovora kod ljudi i životinja. Iako opis iznad sadržava mnoge specifičnosti, one se ne bi trebale shvatiti kao da ograničavaju opseg izuma nego samo kao pružanje ilustracije trenutno poželjnog utjelovljenja izuma. Dakle opseg ovog izuma bi trebao biti određen dodanim zahtjevima i njihovim pravnim ekvivalentima.

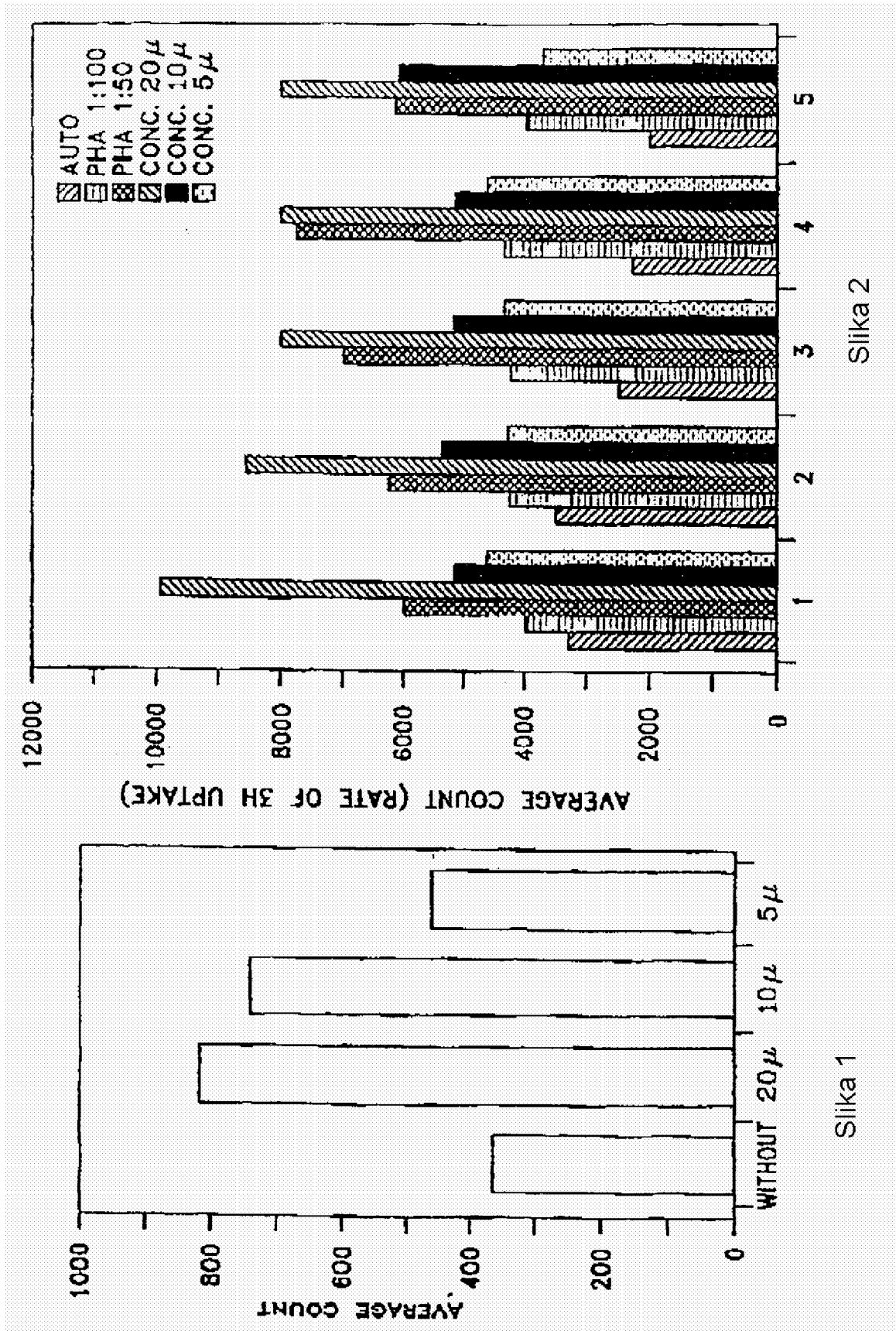
PATENTNI ZAHTEJEVI

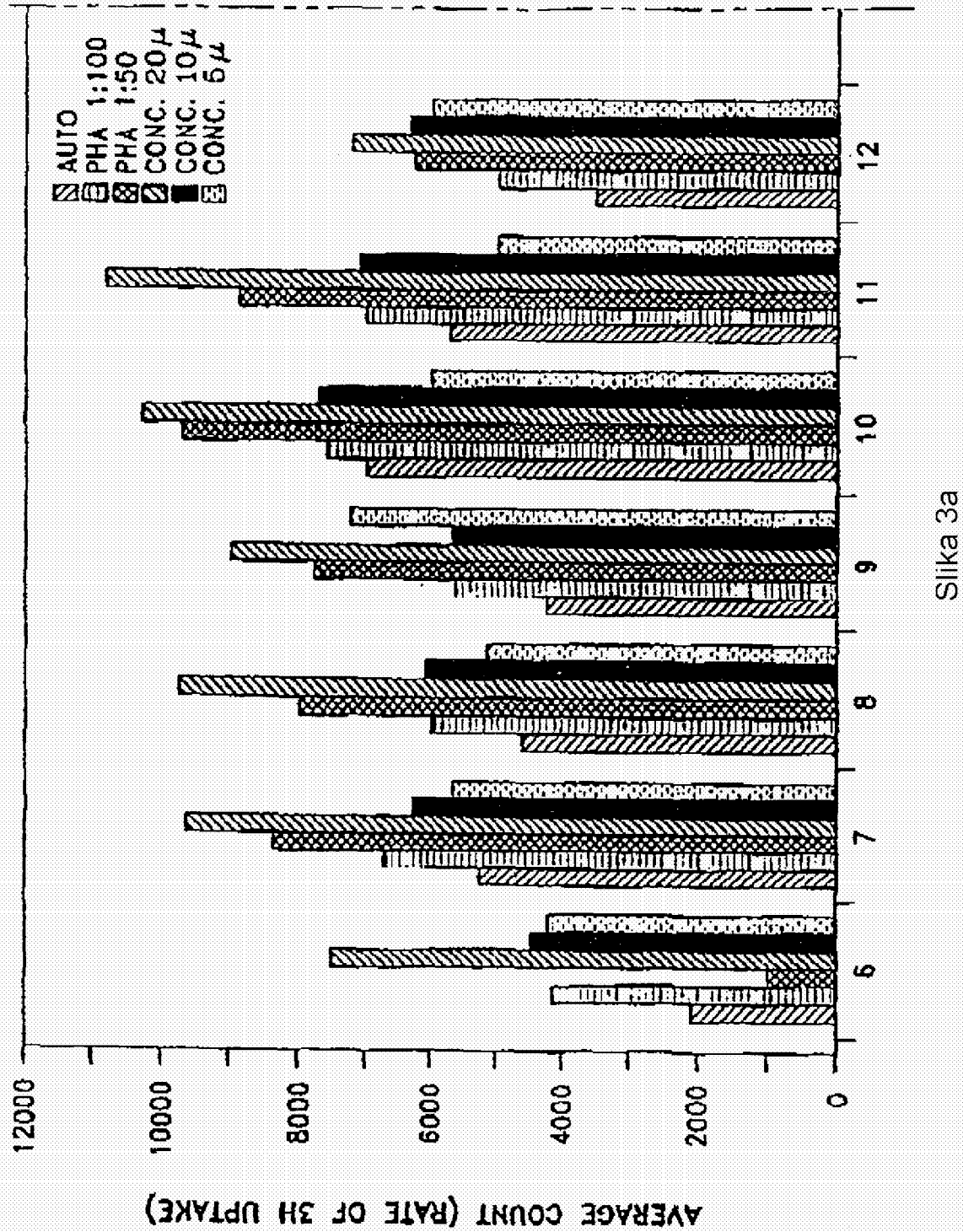
1. Kompozicija biljnog ekstrakta za stimuliranje imunosti posredovane stanicama, **naznačena time**, što sadržava ekstrakt KOZLACA.
2. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 1, **naznačena time**, što dalje sadržava ekstrakt NARA.
3. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 1, **naznačena time**, što dalje sadržava ekstrakt HIBISKUSA.
4. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 1, **naznačena time**, što dalje sadržava ekstrakt ČAJEVCA.
5. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 2, **naznačena time**, što dalje sadržava ekstrakt HIBISKUSA.
6. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 2, **naznačena time**, što dalje sadržava ekstrakt ČAJEVCA.
7. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 5, **naznačena time**, što dalje sadržava ekstrakt ČAJEVCA.
8. Kompozicija biljnog ekstrakta za stimuliranje imunosti posredovane stanicama, **naznačena time**, što sadržava ekstrakt NARA.
9. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 8, **naznačena time**, što dalje sadržava ekstrakt HIBISKUSA.
10. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 8, **naznačena time**, što dalje sadržava ekstrakt ČAJEVCA.
11. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 9, **naznačena time**, što dalje sadržava ekstrakt ČAJEVCA.
12. Postupak za pripremu kompozicije biljnog ekstrakta za stimuliranje imunosti posredovane stanicama, **naznačen time**, što sadržava korake:
 - (a) pripreve ekstrakta KOZLACA kuhanjem osušenog, fino usitnjenog KOZLACA u vodi; i
 - (b) pripreve ekstrakta NARA kuhanjem osušenog, fino usitnjenog NARA u vodi; i
 - (c) spajanja spomenutog ekstrakta KOZLACA i spomenutog ekstrakta NARA i kuhanja spomenutog sjedinjenog ekstrakta KOZLACA i NARA.
13. Postupak za pripremu biljnog ekstrakta prema zahtjevu 12, **naznačen time**, što dalje sadržava korake:
 - (d) pripreve ekstrakta HIBISKUSA kuhanjem osušenog, fino usitnjenog HIBISKUSA u vodi; i
 - (e) pripreve ekstrakta ČAJEVCA kuhanjem osušenog, fino usitnjenog ČAJEVCA u vodi; i
 - (f) spajanja spomenutog ekstrakta HIBISKUSA i spomenutog ekstrakta ČAJEVCA sa spomenutim sjedinjenim ekstraktom KOZLACA i NARA i kuhanja spomenutog sjedinjenog ekstrakta KOZLACA, NARA, HIBISKUSA, ČAJEVCA.
14. Postupak za stimulaciju *in vitro* imunosti posredovane stanicama, **naznačen time**, što sadržava kontakt stanica s djelotvornom količinom pripravka koji se sastoji zapravo od ekstrakta KOZLACA, ekstrakta NARA, ekstrakta HIBISKUSA i ekstrakta ČAJEVCA.

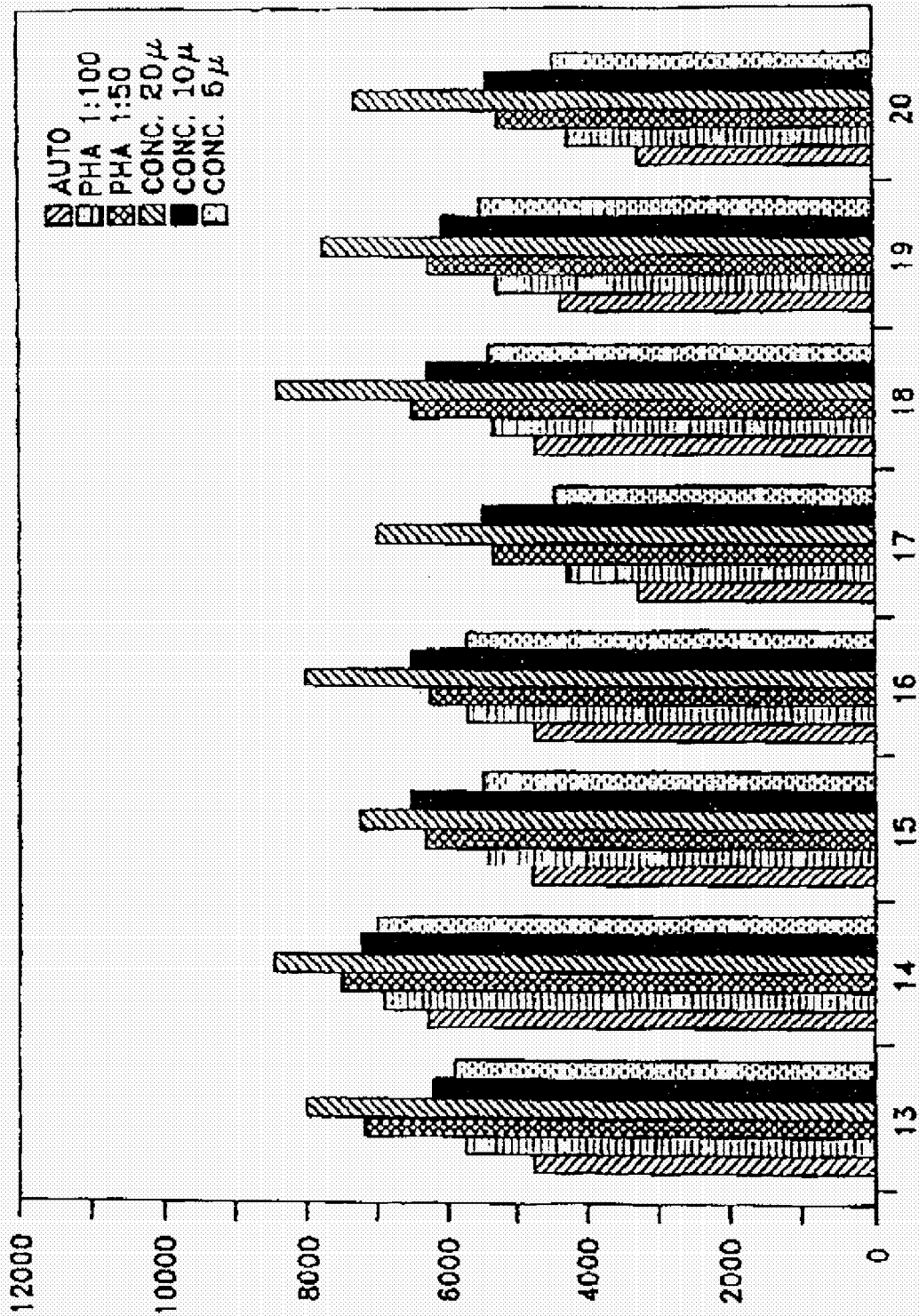
15. Postupak za stimulaciju *in vitro* imunosti posredovane stanicama prema zahtjevu 14, **naznačen time**, što spomenute stanice uključuju stanice od zdravih osoba.
16. Postupak za stimulaciju *in vitro* imunosti posredovane stanicama prema zahtjevu 14, **naznačen time**, što spomenute stanice uključuju stanice od pacijenata s leukemijom.
- 5 17. Postupak za stimulaciju *in vitro* imunosti posredovane stanicama prema zahtjevu 14, **naznačen time**, što spomenute stanice uključuju stanice od pacijenata sa zatajenjem bubrega.
18. Postupak za stimulaciju *in vitro* blastogeneze limfocita, **naznačen time**, što sadržava kontakt suspenzije limfocita s djelotvornom količinom pripravka koji se sastoji zapravo od ekstrakta KOZLACA, ekstrakta NARA, ekstrakta HIBISKUSA i ekstrakta ČAJEVCA.
- 10 19. Postupak za stimulaciju *in vitro* imunosti posredovane stanicama prema zahtjevu 18, **naznačen time**, što spomenute suspenzije limfocita uključuju limfocite od zdravih osoba.
20. Postupak za stimulaciju *in vitro* imunosti posredovane stanicama prema zahtjevu 18, **naznačen time**, što spomenute suspenzije limfocita uključuju limfocite od pacijenata s leukemijom.
21. Postupak za stimulaciju *in vitro* imunosti posredovane stanicama prema zahtjevu 18, **naznačen time**, što spomenute suspenzije limfocita uključuju limfocite od pacijenata sa zatajenjem bubrega.
- 15 22. Postupak za stimulaciju *in vitro* proizvodnje citokina, **naznačen time**, što sadržava kontakt perifernih mononuklearnih stanica krvi s djelotvornom količinom pripravka koji se sastoji zapravo od ekstrakta KOZLACA, ekstrakta NARA, ekstrakta HIBISKUSA i ekstrakta ČAJEVCA.
23. Postupak za stimulaciju *in vitro* imunosti posredovane stanicama prema zahtjevu 22, **naznačen time**, što su spomenute periferne mononuklearne stanice krvi dobivene od zdravih osoba.
- 20 24. Postupak za stimulaciju *in vitro* imunosti posredovane stanicama prema zahtjevu 22, **naznačen time**, što su spomenute periferne mononuklearne stanice krvi dobivene od pacijenata s leukemijom.
25. Postupak za stimulaciju *in vitro* imunosti posredovane stanicama prema zahtjevu 22, **naznačen time**, što su spomenute periferne mononuklearne stanice krvi dobivene od pacijenata sa zatajenjem bubrega.
- 25 26. Postupak za inhibiciju *in vitro* infekcije HIV, **naznačen time**, što sadržava kontakt stanica s djelotvornom količinom pripravka koji se sastoji zapravo od ekstrakta KOZLACA, ekstrakta NARA, ekstrakta HIBISKUSA i ekstrakta ČAJEVCA.
27. Postupak za inhibiciju *in vitro* vezanja gp120 za MT4 stanice, **naznačen time**, što sadržava kontakt MT4 stanica s djelotvornom količinom pripravka koji se sastoji zapravo od ekstrakta KOZLACA, ekstrakta NARA, ekstrakta HIBISKUSA i ekstrakta ČAJEVCA.
- 30 28. Kompozicija biljnog ekstrakta za stimuliranje imunosti posredovane stanicama, **naznačena time**, što sadržava smjesu vodenog ekstrakta KOZLACA, vodenog ekstrakta NARA, vodenog ekstrakta HIBISKUSA, i vodenog ekstrakta ČAJEVCA.
29. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 28, **naznačena time**, što spomenuta kompozicija dalje sadržava najmanje jedan citokin.
- 35 30. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 29, **naznačena time**, što spomenuti citokin je interleukin.
31. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 29, **naznačena time**, što spomenuti citokin je interferon.
32. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 28, **naznačena time**, što spomenuta kompozicija dalje sadržava najmanje jedan tumor nekrotizirajući faktor.
- 40 33. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 28, **naznačena time**, što spomenuta kompozicija dalje sadržava najmanje jedan imunoglobulin.
34. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 28, **naznačena time**, što spomenuta kompozicija dalje sadržava polisaharid.
35. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 28, **naznačena time**, što spomenuta kompozicija dalje sadržava proteine.
- 45 36. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 28, **naznačena time**, što spomenuta kompozicija dalje sadržava RNA.
37. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 28, **naznačena time**, što spomenuta kompozicija dalje sadržava DNA.
- 50 38. Kompozicija biljnog ekstrakta prema zahtjevu 28, **naznačena time**, što spomenuta kompozicija sadržava približno jednake dijelove spomenutih vodenih ekstrakata.

SAŽETAK

- 55 Kompozicija biljnog ekstrakta koja sadržava ekstrakt KOZLACA, ekstrakt NARA, ekstrakt HIBISKUSA i ekstrakt ČAJEVCA. Kompozicija biljnog ekstrakta iz izuma pokazuje *in vitro* stimulaciju transformacije limfocita i proizvodnje citokina, i *in vitro* inhibiciju vezanja gp120, i predstavlja snažan kandidat za terapije i liječenja imunih poremećaja i HIV infekcija.







Slika 3b