



(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. cerere: **92-200639**

(61) Perfectionare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: **13.11.1990**

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate: **11.09.1990 US 90/01533;**
11.09.1990 DE 90119376.3;

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **EP 90 / 01896 13.11.1990**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 92/04368 19.03.1992**

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.12.1997 BOPI nr. **12/1997**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
DE 1963816; Publicația Proc. Roy. Soc.
76 B, J.S. Edkins, 376 (1905)

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(71) Solicitant: **PREDRAG SIKIRIC, 41000 ZAGREB, YU; MARIJAN PETEK, 41000 ZAGREB, YU; IVO ROTKVIC, 41000 ZAGREB, YU; STJEPAN MISE, 58000 SPLIT, YU; SIMUN KRIZANAC, 41000 ZAGREB, YU; IVAN UDOVICIC, 6370 STANS, CH; ERNEST SUCHANEK, 41000 ZAGREB, YU; MARKO DUVNJAK, 41000 ZAGREB, YU; JERKA JUKIC, 41000 ZAGREB, YU;**

(73) Titular: **PREDRAG SIKIRIC, 41000 ZAGREB, YU; MARIJAN PETEK, 41000 ZAGREB, YU; IVO ROTKVIC, 41000 ZAGREB, YU; STJEPAN MISE, 58000 SPLIT, YU; SIMUN KRIZANAC, 41000 ZAGREB, YU; IVAN UDOVICIC, 6370 STANS, CH; ERNEST SUCHANEK, 41000 ZAGREB, YU; MARKO DUVNJAK, 41000 ZAGREB, YU; JERKA JUKIC, 41000 ZAGREB, YU;**

(72) Inventatori: **PREDRAG SIKIRIC, 41000 ZAGREB, YU; MARIJAN PETEK, 41000 ZAGREB, YU; IVO ROTKVIC, 41000 ZAGREB, YU; STJEPAN MISE, 58000 SPLIT, YU; SIMUN KRIZANAC, 41000 ZAGREB, YU; ERNEST SUCHANEK, 41000 ZAGREB, YU; MARKO DUVNJAK, 41000 ZAGREB, YU; JERKA JUKIC, 41000 ZAGREB, YU; IVAN UDOVICIC, 6370 STANS, CH;**

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI**

(54) **COMPUS DE PROTECȚIE A CORPULUI - BPC ȘI PROCEDEU DE PREPARARE A ACESTUIA**

(57) **Rezumat:** Prezenta invenție se referă la un compus de protecție a corpului (BPC), care este o proteină pliată, cu greutatea moleculară de 40.000 plus și minus 5.000 Daltoni, determinată prin cromatografie în gel, cu spectre în infraroșu și ultraviolet, cu secvența parțială N-terminală de aminoacid: H₂ N-Glx-Glu-Pro-Pro-Gly-Lys-Pro-Ala-Asp-Asp-Ala-Gly-Leu-Val...-COOH și la procedeul de preparare a compusului de protecție a corpului (BPC), din suc gastric uman sau animal, prin colectarea și omogenizarea sucului gastric uman sau animal, separarea în părți crude și lichid supernatant prin centrifugare, utilizând 12.000 rot. timp de 30 min; lichidul supernatant se dializează față de apa demineralizată (1:125) la +4°C, până

când se atinge o conductibilitate de 100 μS și apoi se liofilizează, reziduul uscat, se purifică în coloana cromatografică umplută cu gel sau rășină de schimb anionic slab bazică, utilizând un tampon de acetat de sodiu 0,01 ml/1 cu pH între 5 și 6 ca eluant, fracțiunea activă se dializează față de apa demineralizată (1:125) la +4°C până când se atinge o conductibilitate de 100 μS și apoi se liofilizează, concentratul uscat se purifică într-o coloană cu gel prin cromatografie, utilizând un tampon de fosfat 0,2 mol/l cu pH între 7 și 8 ca eluant; substanța BPC este în final obținută din acest concentrat, utilizând dializa și liofilizarea.

Revendicări: 6

RO 112728 B1



Prezenta invenție se referă la un compus de protecție a corpului (BPC) și la procedeul de preparare a acestuia din suc gastric, utilizat ca medicament cu acțiune antistres foarte puternică și alte activități de protejare a corpului.

Este cunoscut faptul că suc gastric, considerat a fi o secreție a celulelor parietale și a altor celule, conține o serie de componente electroliti, acid clorhidric, o serie de enzime, cum ar fi pepsina, alte proteinaze, renina lipază, urează și lisozimă. Sunt prezente mai multe peptide și fragmente de peptide, de exemplu gastrinele de hormoni peptidici, stimulați de mare potență ai secreției gastrice, descoperite prima oară de J. S. Edkins, Proc. Roy. Soc. 76B, 376 (1905).

Nu există până în prezent o astfel de farmacoterapie totală și specifică, și tratamentul complicațiilor este în afara farmacoterapiei.

În suc gastric normal sunt prezente glicoproteine (mucine), descrise de F. Hanrowitz, Chem. and Biology of Proteins, 1950, pag. 199 și Factorul Intrinsec (IF), care este o mucoproteină termolabilă cu greutate moleculară de aproximativ 60.000. Acest factor promovează absorbția vitaminei B₁₂, Castle și alții, Am. J. Med. Sci. 178, 748 (1929).

Până în prezent nu a fost găsită în suc gastric o substanță care să aibă o activitate antistres foarte puternică și alte activități de protejare a corpului. Până acum, tractul gastrointestinal, în special stomacul, a fost considerat numai ca organ supus stresului. Niciodată nu s-a discutat posibilitatea ca tractul gastrointestinal, de preferință stomacul, să fie organul care să poată iniția răspunsul ofensiv al întregului organism. Acest răspuns, de fapt îndreptat împotriva unui stres, trebuie să se realizeze prin formarea și eliberarea unui agent endogen. Autorii invenției și-au îndreptat experimentările spre izolarea acestui agent din suc din stomac. În final au izolat substanța așteptată din suc stomacal al 542 pacienți. Aceasta

substanță a fost notată cu prescurtarea BPC, care înseamnă: Body Protection Compound, adică compus de protejare a corpului.

Problema pe care o rezolvă invenția este un compus de protecție a corpului (BPC), cu acțiune antistres foarte puternică și alte activități de protejare a corpului, precum și procedeul pentru prepararea acesteia din suc gastric.

Compusul de protecție a corpului (BPC), conform invenției, înlătură dezavantajele menționate, prin aceea că compusul este o proteină pliată cu greutatea moleculară de 40.000-5.000 Daltoni, determinată prin cromatografie în gel, cu spectre în infraroșu și ultraviolet, așa cum au fost indicate în fig. 1 și 2 cu secvența parțială N-terminală de amino-acid:

H₂ N-Gly-Glu-Pro-Pro-Gly-Lys-Pro-Ala-Asp-Asp-Ala-Gly-Leu-Val-...-COOH.

Procedeul de preparare a compusului de protecție a corpului (BPC), din suc gastric uman sau animal, conform invenției, constă în următoarele etape:

a) suc gastric uman sau animal, colectat și omogenizat, este separat în părți crude și lichid supernatant prin centrifugare utilizând 12.000 rot.timp de 30 min;

b) lichidul supernatant este dializat față de apă demineralizată (1:125) la + 4°C până când se atinge o conductibilitate de 100μS și apoi este liofilizat;

c) reziduul uscat este purificat în coloană cromatografică umplută cu gel sau rășină de schimb anionic slab bazică, utilizând un tampon de acetat de sodiu 0,01ml/l cu pH între 5 și 6 ca eluant;

d) fracțiunea activă este dializată față de apă demineralizată (1:125) la + 4°C până când se atinge o conductibilitate de 100μS și apoi este liofilizată;

e) concentratul uscat este purificat într-o coloană cu gel prin cromatografie, utilizând un tampon de fosfat 0,2 mol/l cu pH între 7 și 8 ca eluant;

f) substanța BPC este în final obți-

nută din acest concentrat, utilizând dializa și liofilizarea.

Tractul digestiv și în special stomacul au fost privite până în prezent numai ca organ țintă pentru stres. Până acum nu a fost luată în considerație posibilitatea ca tractul gastrointestinal și în special chiar stomacul să fie și organ de la care să pornească răspunsul defensiv al corpului. Substanța care inițiază, mediază și controlează răspunsul de vârf al corpului, denumită ulterior de autori BPC, a fost izolată conform prezentei invenții din suc gastric al 542 de pacienți, precum și din surse animale, cu ajutorul dializei, filtrării pe schimbători de ioni și cromatografiei pe gel. De aceea, substanța BPC (cu toate că structura sa nu este complet clarificată), a fost folosită în diferite mostre de boli umane, atât *in vivo* cât și *in vitro*. Pe bază rezultatelor obținute, o aplicare cu succes într-un domeniu foarte larg este de așteptat în farmacoterapie.

Substanța, izolată și denumită BPC, este până în prezent necunoscută și terapia neaplicată anterior în farmacoterapie.

Substanța obținută BPC s-a studiat pe multe specii experimentale diferite (de exemplu, șobolani, șoareci, cobai) *in vivo*, precum și pe celule umane *in vitro*.

Substanța s-a numit BPC conform prescurtării de la denumirea de compus ce protejează corpul, "Body Protecting Compound".

Structura acestei proteine este foarte complexă și după investigațiile făcute până acum se poate caracteriza ca o proteină pliată cu secvența parțială de la terminația N:

$H_2N\text{-Gly-Glu-Pro-Pro-Gly-Lys-Pro-Ala-Asp-Asp-Ala-Gly-Leu-Val-...-COOH}$.

Ea are o greutate moleculară de aproximativ 40.000-5.000 Daltoni determinată prin filtrarea prin gel.

În sensul prezentei invenții, compusul BPC s-a preparat din suc gastric uman sau animal. Acest suc a fost mai întâi omogenizat, centrifugat, apoi supernatantul a fost purificat prin dializă,

cromatografie cu schimbători de ioni, din nou prin dializă și liofilizare și în final s-a obținut agentul BPC, utilizând cromatografia în gel, dializă și liofilizarea.

Până în prezent acest compus nu a fost descris sau publicat nicăieri. Mai mult, nu a fost niciodată utilizat ca medicament.

Prin cercetarea acțiunilor biologice ale compusului BPC folosind multe metode *in vivo* și *in vitro* s-a dovedit că are un spectru surprinzător de larg de activități.

Dar se știe că multe boli și stări patologice pot fi provocate de stres, sau, pe de altă parte, traumele sau bolile pot induce stresul prin ele însele. Aceste rezultate sugerează că BPC este produs prin stres independent de proveniența sa.

Agentul BPC a fost studiat *in vitro* și *in vivo* (șobolan, șoarece, iepure și cobai) și s-au gasit proprietățile farmacologice care urmează:

1) Toxicologia acută

S-a determinat toxicologia acută în șoareci (greutatea de 18-25 g) (sacri-ficați după 30 zile de perioadă experimentală) de ambele sexe, BPC fiind administrat i.p., i.v. și i.g. Nu s-a putut obține doză letală nici cu doze mari, cum ar fi de 100 mg/kg greutate corporală, care este cel puțin de 10^3 - 10^5 ori mai mare decât dozele eficiente minime. În procedură prelungită, BPC s-a administrat prin injecție. Nu s-au înregistrat semne patologice (morfologice sau fiziologice). În plus, dozele medii eficiente au fost de la 0,01 la 50 $\mu\text{g/kg}$ prin administrare i.p. și TL cel puțin 1.000.

2) Ulcer provocat de imersarea în apă sau stres forțat

Șobolani masculi (180-240 g) din ramura Wistar au fost supuși analizei. Animalele au fost introduse în apa rece (26°C) timp de 3 ore sau supuse restricției timp de 48 ore. După terminarea perioadei de experiență, li s-a analizat stomacul pentru prezența de leziuni ("ulcer pe bază de stres"). S-a injectat BPC intraperitoneal și intragastric (0,1 la 10 $\mu\text{g/kg}$) cu o oră sau 24 ore înaintea pro-

vocării leziunii. S-a demonstrat o acțiune puternic protectoare a BPC asupra leziunilor gastrice.

3) *Ulcer provocat de legarea canalului bilei de artera hepatică sau de administrarea de cisteamină*

Experimentele cu legare s-au efectuat pe șobolani masculi (160-250 g) din ramura Wistar. S-a făcut legarea canalului bilei de artera hepatică. Această procedură a provocat, pe lângă leziuni necrotice ischemice severe ale țesuturilor ficatului, ulcere ale stomacului și duodenului în intervalele de la 6 la 24 ore.

De asemenea, s-a aplicat cisteamina (400 mg/kg s.c.) pentru provocarea ulcerului duodenal la șobolani femele în decurs de 24 ore.

S-a administrat BPC i.p. în doze de la 0,1 la 10 μg/kg. Ulcerele mari provocate de legarea descrisă în stomac și în duoden au fost în mare măsură preîntâmpinate la animalele tratate cu BPC. În același mod, ulcerele provocate de cisteamină au fost anulate de pretratamentul cu BPC.

4) *Efectul asupra infarctului indus pe miocard*

Șobolani masculi (180-230 g) din ramură Wistar au fost imobilizați timp de 24 ore. Animalele au fost apoi tratate cu indometacin (25 mg / kg s.c.) la timpul 0 de imobilizare și la 12 ore după aceea. S-a aplicat BPC (50 μg/kg) cu o oră înainte procedurii și la 6 ore și 18 ore de restricție.

Într-un al doilea grup, animalele au fost imobilizate timp de 48 de ore. După aceste proceduri, animalele au fost sacrificate și s-au determinat valorile enzimei.

S-au înregistrat acțiunile protectoare obținute ale BPC.

Efectele protectoare au fost foarte impresionante. Prin contrast, nu s-a produs deloc efect protector contra leziunilor pe inimă provocate de izoprenalina. S-a aplicat izoprenalina (30 mg/kg l. p.) la timpul zero și la 24 ore mai târziu. S-a aplicat BPC (50 μg/kg l. p.) cu o oră înainte de administrarea izoprena-

linei. Animalele au fost sacrificate la 24 ore după a doua administrare de izoprenalina și investigate.

5). *Efectul asupra tensiunii arteriale.*

S-au utilizat șobolani masculi (180-220 g) aneștizați cu uretan. Artera carotidă a fost canulată și s-a înregistrat pe un dynograf presiunea sângelui. S-a administrat BPC i.v. în vena jugulară în doze de 10 μg până la 50 mg/kg. Rezultatele nu au prezentat schimbări ale tensiunii arteriale la animalele dintr-un grup de șobolani pregătiți prin procedura menționată mai sus. O schimbare de scurtă durată a tensiunii arteriale s-a produs prin administrarea intravenoasă de noradrenalina, adrenalina, 5-HT, acetilcolina sau izoprenalina. Animalele pretratate cu BPC în doze de 10 μg până la 5 mg /kg i. v. nu au modificat schimbarea de tensiune arterială indusă de substanțele vasoactive utilizate.

6). *Efectul asupra ficatului vătămat.*

Experiențele s-au efectuat pe șobolani masculi (180-250 g) din ramura Wistar. S-a efectuat legarea unicului canal al bilei și a arterei hepatice. Această intervenție a provocat leziuni necrotice ischemice severe ale țesutului ficatului în intervalele de la 6 la 24 de ore. S-a administrat i. p. BPC în doze de la 0,1 până la 10 μg /kg. A preîntâmpinat în mare măsură (de exemplu administrat cu o oră înainte de legare) sau a îndepărtat complet rana (de exemplu injectat curând după legare). Pe lângă aceasta, acțiunea de protejare a ficatului a BPC administrat i. p. în doze de 10 μg /kg greutate corporală cu o oră înainte intoxicării șobolanilor cu tetraclorura de carbon dată în doze de 0,1-10 ml /kg i. g. sau i.p. a fost demonstrată. BPC (0,01-10 μg /kg i. p./i. g.) a preîntâmpinat, de asemenea, schimbările ficatului gras provocate de stresul cauzat de 48 ore imobilizare.

7). *Efectul asupra pancreasului vătămat.*

S-au utilizat șobolani masculi (170-240 g) din ramura Wistar. Vătă-

marea pancreasului a fost provocată de legarea canalului bilei în punctul de intrare a sa în duoden. Această procedură provoacă o necroză marcată a pancreasului după 24 ore și circa 50% din șobolani au murit în timpul acestei perioade experimentale. BPC administrat în doze de la 0,1 la 10 $\mu\text{g/kg}$ i. p. a produs o acțiune protectoare puternică și dependentă de doză. S-a demonstrat un efect benefic însemnat privind supraviețuirea (circa 82 %).

8). *Efectul asupra rinichiului vătămat.*

a). Nefrectomia unilaterală.

Experiențele s-au făcut pe șobolani albiștri Wistar (190-250 g greutate corporală) de ambele sexe. S-a efectuat nefrectomie unilaterală. Creșterea rinichiului rămas în greutate a fost analizată în grupul de control și cel cu BPC (10,0 $\mu\text{g/kg}$ greutate corporală i. p. la o oră înainte de procedură) la 24 ore după operație. S-a demonstrat că BPC reduce mult creșterea greutății organului, a rinichiului rămas.

b). Administrarea gentamicinei.

Experiențele s-au efectuat pe șobolani masculi Wistar. Vătămarea tubulilor s-a produs prin administrarea de gentamicină în doză de 40 mg/kg i.p. (o dată pe zi) în decurs de 30 zile. Toate animalele au fost sacrificate după 5 zile de la ultimul tratament. În grupul de control al animalelor tratate cu gentamicina și soluție salină s-a găsit vătămarea tubulelor. În grupul tratat cu BPC manifestările patohistologice au fost cu mult mai mici.

9). *Efectul asupra diabetes mellitus experimental.*

În șobolani masculi (175-230g) din ramura Wistar s-a provocat *diabetes mellitus* indus de streptozocina sau alo-xan. BPC în doze de 10 până la 100 $\mu\text{g/kg}$ i.p. tinde să amâne diabetul indus de streptozocină. Mai mult, BPC a prelungit semnificativ durata de supraviețuire a animalelor.

10). *Efectul asupra febrei.*

Activitatea antipiretică a BPC a fost studiată pe șobolani masculi (180-

220g) din ramura Wistar, utilizând injecția cu drojdie de bere. Pretratamentul cu BPC aplicat în doze unice de 5-20 $\mu\text{g/kg}$ i.p. cu o oră înaintea injectiei cu drojdie a redus mult creșterea temperaturii calculată la intervale de 30 min timp de cel puțin 3 ore.

11). *Efectul asupra edemelor provocate de carageenină.*

Edeme experimentale au fost provocate în șoareci masculi (18-24 g), de ambele sexe, cu carageenină în labele din spate. BPC a fost eficient în doze de 10 $\mu\text{g/kg}$ i.p. când s-a injectat cu o oră înaintea procedurii experimentale reducând edemele induse de agentul menționat. În plus, BPC în aceleași doze a fost inactiv în testul cu placa fierbinte (53,5 °C) la șoareci, spre deosebire de agoniștii opioizi.

12). *Efectul asupra rinitei experimentale .*

Șobolani Wistar de ambele sexe au fost expuși la vapori 10% formaldehidă o oră pe zi timp de 15 zile. La grupul de testat s-a administrat BPC în doze de 10 $\mu\text{g/kg}$ i.p. în fiecare zi, cu o oră înainte de expunere. Animalele s-au sacrificate după 13-15 zile de tratament. La animalele tratate cu BPC, edemele de mucoasă nazală au fost cu mult mai mici și epiteliul s-a păstrat în comparație cu grupul de control. Secreția a fost de tipul guturaiului și nu purulentă.

13). *Efectul asupra fracturii experimentale.*

Influența BPC asupra fracturii experimentale (10 $\mu\text{g/kg}$ i.p.) a fost investigată pe fractura tibială în procesul de vindecare a ei la șobolan. În raport cu animalele martor (control) examinarea histologică a arătat o creștere însemnată a vitezei de vindecare la toți șobolanii tratați ulterior cu BPC. În plus, la aceste animale s-a înregistrat un hematoma local mult mai scăzut față de animalele martor.

14). *Efectul asupra arsurilor experimentale.*

Procedura experimentală, arsuri ale pielii sau ale mucoasei nazale, s-a efectuat pe șoareci (20-25g). În com-

parație cu grupul de control tratat cu soluție salină, la toate animalele pretratate cu BPC (10 $\mu\text{g/kg}$ i.p., cu o oră înaintea procedurii experimentale) nu s-a observat o secreție purulentă și s-a remarcat bine o viteză mărită de vindecare. În plus, la animalele cu leziuni nazale s-a produs numai o foarte mică inflamare posttraumatică a botului. După aceea, respirația nazală normală a fost numai puțin afectată, iar supravețuirea nu a fost afectată. Aceste rezultate sunt evident în contrast cu datele obținute la grupul de control.

15) Efectul asupra rănilor de pe piele.

Procedura experimentală s-a efectuat pe șobolani (170-210 g) din ramura Wistar. Rănilor de pe piele s-au produs printr-o incizie mare a pielii. BPC s-a administrat i.p. într-o singură doză de 10 $\mu\text{g/kg}$ înaintea inciziei. Spre deosebire de grupul de control, la grupele tratate cu BPC s-a constatat lipsa supurării și edemului, o slabă formare de granulație și o viteză mărită de vindecare.

16). Activitatea neurofarmacologică.

a). Cercetarea neurofarmacologică, în conformitate cu Irwing, a demonstrat că BPC, chiar aplicat în doze de mii de ori mai mari decât cele care s-au dovedit a fi terapeutice eficiente în multe metode diferite (20,0 și 40,0 $\mu\text{g/kg}$ greutate corporală, i.p. sau p.o.) nu provoacă nici o schimbare semnificativă în comportament în comparație cu șoarecii de control.

b). În inima de șobolan și iepure izolată, BPC aplicat în doză de 30 $\mu\text{g/ml}$ soluție Ringer-Locke nu a indus nici o schimbare în intensitatea și frecvența contracției (preparare conform cu Langendorf).

c). Într-o mostră de ileum izolată (șobolan, cobai sau iepure) (preparare conform cu Magnus), BPC aplicat în aceeași doză nu a demonstrat nici o influență asupra tonusului intestinal, nici asupra contracției produse de acetilcolină, histamină și serotonină.

17). Efectele BPC asupra reacției

de hipersensibilitate de tip amânat (DTH) la DNFB.

S-a utilizat modelul de reacție DTH la DNFB pe urechi sau labe de șoareci din ramura NMRI. Animalele care au fost pretratate cu două doze de sensibilizare de DNFB au urechi/labe cu mult mai groase în comparație cu animalele de control. Șoarecii pretratați cu BPC i.p., în doză de 0,1 $\mu\text{g/10 g}$ greutate corporală, cu o oră înainte de aplicarea dozei test de DNFB au manifestat diferențe semnificativ mai mici între urechea/laba tratată și cea netratată.

18). Influența asupra mărimii pupilei.

În experiențele cu șoareci de ambele sexe (18-22 g) BPC s-a instilat în ochiul stâng. Mărimea pupilei s-a măsurat cu ajutorul unei lentile monoculare. Pe lângă aceasta, o grupă de animale s-a tratat cu BPC i.p.. Rezultatele au arătat că BPC instilat local nu a produs mioză. De asemenea, BPC injectat i.p. a provocat o contracție a pupilei de aproximativ 20 %. Acest efect a durat cel puțin 30 minute.

19). Efectul BPC asupra leziunilor colonului.

Hipersensibilitatea de contact la șoareci a fost provocată prin aplicarea de DNFB (2,4-dinitrofluorbenzen). S-au dat șoarecilor două doze de sensibilizare de 25 μl DNFB 0,5 % (în acetona:ulei de masline 4:1), pe pielea în prealabil rasă a peretelui abdominal în două zile consecutive. La 72 ore după ultima doză de sensibilizare șoarecilor, li s-a administrat o doză de provocare de 20 μl DNFB 0,2 % transrectal în anestezia cu eter. Animalele au fost sacrificate 24 ore mai târziu și s-a examinat colonul. Schimbările patologice în colon au fost caracterizate prin hemoragii și ulceratii puternice. Aceste leziuni au ocupat la unele animale toate părțile peretelui colonului, astfel că au putut să apară perforații.

Aplicarea de BPC (0,1 $\mu\text{g/10 g}$) la o oră după provocarea cu DNFB a micșorat mult incidența leziunilor în colon. Cea mai obișnuită leziune a fost hemoragia petechială.

20). *Efectele asupra celulelor de tumoare.*

a). Două linii celulare L-924 și B-16 melanom au fost cultivate *in vitro* în condiții standard. BPC s-a testat *in vitro* privind activitatea sa asupra creșterii culturilor de celule menționate. La două zile după inițierea culturilor de celule, s-a adăugat BPC în concentrație de 3% și 0,3% (0,1 ml). Trei zile mai târziu s-a determinat numărul de celule pe cultura cu numărătorul de celule. Rezultatele au arătat ca BPC are un efect de inhibare asupra ambelor linii celulare luate ca exemplu L-924 și melanom B-16.

b). Tumoarea ascitică Ehrlich (EAT) este tumoarea care poate crește la toate rasele de șoareci. Ea poate crește în formă ascitică sau în formă solidă, ceea ce depinde de calea de administrare a celulelor de tumoare. Autorii au încercat să determine dacă incubarea celulelor EAT în soluție de BPC ar schimba durata de supraviețuire a șoarecilor după injecția subcutanată sau intraperitoneală a acestor celule EAT tratate.

S-au supus observației animalele pe o perioadă de 45 zile. Controlul a 15 șoareci masculi NMRI reprezentând grupul martor a fost supus injectării cu $0,4 \times 10^6$ celule EAT. Înainte de injectare, celulele de tumoare au fost incubate timp de o oră la 4°C în soluție salină. Volumul injectiei a fost de 0,2 ml. Durata medie de supraviețuire în acest grup de animale a fost de 36 zile și numai 3/15 animale au supraviețuit 45 zile.

Grupul experimental de 15 șoareci masculi NMRI a primit aceeași doză de celule de tumoare în același volum, dar aceste celule de tumoare au fost anterior incubate în soluție de BPC (2 $\mu\text{g}/1$ ml). Numai 2/15 șoareci au murit în timpul perioadei de observare (45 zile), ceilalți au supraviețuit mai mult de 45 zile. Diferența dintre grupul martor și cel experimental a fost semnificativ de mare ($p/0,01$).

Dacă se efectuează aceeași procedură și celulele de EAT se injectează

i.p. (în loc de s.c.) nu se observă nici o diferență între grupuri.

Se poate trage concluzia că BPC prelungește supraviețuirea animalelor cu tumori și că posedă efect antitumoral.

21). *Influența asupra leziunilor provocate de radiații.*

Experiențele s-au efectuat pe șoareci (64) de ambele sexe din rasa NMR-Y (22-28 g). Prima grupă de control (16 șoareci) nu a fost tratată și nici iradiată. A doua grupă de control (16 șoareci) pretrată cu soluție salină (0,2 ml) a fost iradiată cu doze supraletale de 9 Gy (Co-60).

Ambele grupe experimentale (16 +16) au fost iradiate cu aceleași doze supraletale de 9 Gy. La o oră după iradiere, la prima grupă s-a administrat BPC în doze de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ greutate corporală. A doua grupă a fost tratată cu aceeași doză de BPC cu o oră înainte de iradiere.

BPC administrat după iradiere nu are nici o influență asupra supraviețuirii șoarecilor.

BPC administrat înainte de iradiere mărește rata de supraviețuire după 12 zile cu 68,75 % în comparație cu altă grupă de control.

22). *Influența asupra sistemului hematopoietic.*

Se aplică la șoareci albi citostatice (Endoxan, Vincristin, Adriablastin, Cytozin-arabinozida), în doză DL_{50} i.p. La grupul de testat s-a aplicat BPC cu o oră înaintea citostaticelor în doză de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, iar la grupul de control s-a aplicat numai soluție salină, prin injectare. Grupe de animale au fost sacrificate în, 3-a, a 5-a, a 7-a și a 11-a zi ale experimentului. S-au investigat: sângele (E, Hb, Htc, L, Tb, numărul absolut de neutrofile), măduva osoasă, citologia și histologia ficatului și splinei. În a treia zi a experimentului nu există diferență între grupele experimentale în privința L, E, Tb și valorilor neutrofilelor, în comparație cu grupa de control. Dar în măduva oaselor animalelor tratate cu BPC celulele hematopoietice au fost încă intacte, la animalele de control aplazia este încă pre-

zentă. În a cincea zi de experiment se produce o creștere însemnată a numărului de neutrofile și L până la normalizarea în a șaptea zi de experiment. La grupa de control normalizarea se produce cu puțin înainte de a 11-a zi.

23). *BPC și fertilitatea - influența asupra oligoastenospermei.*

Cercetarea s-a efectuat pe 10 oameni, în vârstă de 30 până la 40 de ani, cu diagnosticul de oligoastenospermă. De la acești pacienți s-a luat ejaculatul după 3 până la 4 zile de abținere. După lichefiere (30 minute) la cei 0,5 ml de ejaculat se adaugă un strat de 0,5 ml mediu. Mediul de control constă din HAM-F 10 cu 10 % ser dezactivat de cord. Mediul experimental conține în plus 2 $\mu\text{g/ml}$ sau 4 $\mu\text{g/ml}$ BPC. După un timp de mișcare de 90 minute la 37°C în atmosfera care conține 5% CO_2 , în camera de fertilitate Horwell se determină numărul de spermatozoizi în mișcare progresivă, cu mișcare pe loc și nemișcați în 1 ml de ejaculat. Rezultatele preliminare nu arătau nici un efect asupra motilității spermatozoizilor în concentrația mică a BPC.

La concentrația de 4 $\mu\text{g/ml}$ a BPC s-a constatat o motilitate în % cu mult mai mare în comparație cu grupa de control.

24). *Efectul BPC asupra proceselor de reproducere.*

Efectul BPC asupra reproducerii a fost investigat pe șoareci care avuseseră anterior trei sarcini. La 20 de zile după încetarea ultimei lactații, animalele au fost supuse copulației. BPC s-a aplicat într-o doză de 10 $\mu\text{g/kg}$ intraperitoneal, o dată pe zi în fiecare zi a perioadei de sarcină (19-21 zile) și de lactație (următoarele trei săptămâni). Grupelor de control li s-a administrat simultan un echivolum de soluție salină. S-au înregistrat zilnic numărul de pui per femelă și greutatea puilor.

O analiză statistică minuțioasă a scos bine în evidență un număr cu mult mai mare de pui per femelă, precum și, în mod surprinzător, nici o diferență între greutatea lor corporale la fiecare interval

de timp studiat.

Toate animalele femele au fost lăsate să se refacă în următoarele 25 zile după încetarea lactației. Apoi ele au fost supuse din nou copulației pentru investigarea efectului asupra celei de-a cincea sarcini.

În ce privește grupul de control, s-a înregistrat o rată de fertilitate mărită, cu o capacitate mărită de lactație la toate animalele tratate cu BPC. Trebuie să se remarce faptul că nu au apărut schimbări patologice și nici schimbări ale ratei fertilității la puii celor cu BPC (fără a ține seama de numărul de sarcini materne).

De aceea, pare probabil că BPC poate îmbunătăți rata fertilității chiar și la șoarecii batrâni. În concluzie, este evident că rezultatele obținute sunt în concordanță cu efectul protector, în general al BPC, precum și cu datele *in vitro* obținute utilizând sperma umană.

25). *Acțiunea protectoare a BPC asupra leziunilor țesutului periodontal.*

Scopul acestei cercetări este să se investigheze efectul BPC asupra resorbției rădăcinii țesutului moale periodontal provocată de leziunea mecanică a primului molar la șobolani albișori.

30 de șobolani în vârstă de 4 săptămâni sunt împărțiți într-o grupă de control tratată cu soluție salină și o grupă experimentală tratată cu BPC. Toate animalele sunt supuse următoarelor tratamente: pentru a efectua leziunea mecanică se folosește un instrument ca un ac (0,6 mm lățime și 1,9 mm lungime), care se înfige la 1 mm adâncime timp de o secundă în marginea gingivală mesială într-o direcție aproape paralelă cu suprafața mesială a primei coroane maxilare molare din dreapta.

Grupul experimental se tratează după efectuarea leziunii mecanice cu soluție de BPC (0,02 ml / 200 g). Șobolanii divizați în 12 grupe se sacrifică la intervale de 1,3,5,6,14 sau 21 zile după tratamentul final.

Se scoate maxilarul drept al tuturor șobolanilor de control și experimen

tali, se introduce în formalină 10 % neutră tamponată, se demineralizează cu acid formic, se înglobează în parafină și se secționează în serie la 6 μm într-un plan mesiodistal. Secțiunile se colorează cu hematoxilina și eosină și se examinează la microscop.

Constatările histologice la primul molar al șobolanilor din grupele de control sunt : prezența unui mare număr de celule inflamate care se înregistrează. S-a observat o întrerupere mică a resorbției între zilele 1-3 la o parte a suprafeței rădăcinii la nivelul vârfului alveolar. În ziua a 5-a, întreruperea resorbției s-a extins într-o direcție coronală. Întreruperea conținea multe odontoclaste. În a 7-a zi, întreruperea resorbției cu multe odontoclaste s-a extins în continuare coronal. În zilele a 14-a și a 21-a, întreruperea resorbției încă se extindea coronal, apropiindu-se de partea de întrerupere de lângă legătura smalțului ciment.

Șobolanii experimentali au avut toate schimbările similare în zilele 1-5 ca și animalele de control, dar nu s-a mai produs progresarea resorbției rădăcinii între zilele 14-21. În concluzie, se poate spune că BPC a exercitat o acțiune protectoare contra leziunii mecanice a țesutului periodontal al molarului șobolanilor.

26). *Influența BPC asupra leziunii nucleului bazal și a tractului spinal.*

Demența tip Alzheimer (DAT) este caracterizată printr-o deteriorare globală dobândită a funcțiilor corticale superioare, care afectează memoria și cunoașterea. Studiile după moartea pacienților cu DAT au demonstrat că neuronii nucleului bazal (nucleus basalis NB) suferă o degenerare profundă și selectivă. Acești neuroni sunt sursa principală a inervației colinergice extrinseci spre scoarța cerebrală. Scopul prezentului studiu a fost să investigheze influența BPC asupra comportamentului de evitare pasivă la șobolani cu leziuni electrolitice bilaterale ale NB. Astfel, șobolanii cu leziuni ale NB pot reprezenta o mostră experimentală de DAT.

Studiul s-a efectuat pe șobolani albi. Toate grupele de șobolani (cu

sau fără leziuni pe NB) au fost supuse testului de evitare pasivă după procedeul lui Ashford și Jones. Animalelor cu leziuni pe NB li s-a dat soluție salină (grupa de control) sau soluție de BPC 10 μg/kg i.p. (grupa de testat).

Substanțele testate au fost injectate : a) numai o dată, imediat după ce s-au făcut leziunile pe NB; sau b) o dată pe zi în decursul a patru zile consecutive după ce s-au făcut leziunile pe NB. BPC s-a mai administrat de asemenea o dată pe zi în decursul a patru zile de pregătire cu o oră înainte de a începe experimentul de evitare pasivă. Fiecare animal a fost supus testului de comportament descris după 20 zile ca perioadă postoperatorie de recuperare. S-a calculat semnificația statistică conform cu analiza varianței combinată cu testul Duncan pentru comparații multiple (p/O,05). Rezultatele investigației au arătat că:

- leziunile electrolitice bilaterale degradează evitarea pasivă la șobolani;
- BPC în doză utilizată nu influențează comportamentul de evitare pasivă la animalele intacte, fără leziuni;
- BPC poate îmbunătăți comportamentul de evitare pasivă în mare măsură la șobolanii cu leziuni pe NB.

27). *Influența BPC asupra activității motorii a iepurilor cu tractul spinal contuzionat.*

Scopul acestei cercetări a fost de a investiga dacă BPC poate să modifice consecințele contuzionării tractului spinal. În acest studiu s-au folosit iepuri adulți de ambele sexe. S-a efectuat o laminectomie dorsală medială L₁-L₆ sub anestezie cu pentobarbital. Prin folosirea tehnicii lui Albin și alții, s-a aplicat o leziune compactă a tractului spinal, măsurabilă. S-a controlat activitatea motorie în membrele inferioare conform cu sistemul Tarlov, o dată pe zi, în decurs de 9 zile. În principal, rezultatele au fost după cum urmează : 1) paraplegie completă; 2) mișcări voluntare minime; 3) animal capabil să stea în picioare, dar incapabil să fugă; 4) animal capabil să fugă cu unele spasticități și

necoordonare; și 5) activitate motorie normală.

Animalelor li s-a dat soluție salină în grupul de control și BPC în doze de 10 $\mu\text{g/kg}$ i.v., o dată pe zi, în decurs de nouă zile postoperatorii.

Trauma tractului spinal a provocat aproape paraplegie completă. Media activității motorii testate complet (în decursul celor nouă zile după operație) la animalele ce au primit soluție salină a fost 1,3 unitați Tarlov (N=4). La animalele care au primit BPC a fost de 2,5 unitați Tarlov (N=7).

Este de asemenea evident că BPC îmbunătățește activitatea motorie a iepurilor cu leziune a tractului spinal. Din rezultatele prezentate se poate presupune că BPC poate fi un medicament promițător în tratamentul funcției deteriorate e neuronului (trauma creierului sau a tractului spinal) și că BPC va trebui să se administreze cât se poate de repede după deteriorarea neuronilor.

28). *Influența BPC asupra motilității intestinale, temperaturii bazale și diurezei.*

Administrarea de BPC nu a avut nici o influență asupra diurezei, scăderii temperaturii bazale *in vivo* și asupra capacității de a se contracta a mușchului neted intestinal la cobai *in vivo*.

29). *Activitatea contra Trichinella spiralis.*

Aplicarea BPC concentrat la șoareci experimentali (DI) în doze de 10 $\mu\text{g/kg}$ greutate corporală intraperitoneal, infectați anterior cu doze orale de larve de *Trichinella spiralis* are o influență importantă asupra supraviețuirii animalelor.

30). *Reproducerea pe scară comercială*

La 1419 porci sănătoși (dintr-un total de 4306 porci) s-a administrat BPC (10 $\mu\text{g/kg}$ greutate corporală intramuscular) imediat după naștere, la alți 1440 în a 13-a zi de viață, cu o zi înainte de castrare, iar la restul de 1477 s-a administrat numai terapia cu Fe cunoscută. Contuzia, selectarea, mortalitatea, greutatea corporală și consumul de hrană au

fost analizate după 4 săptămâni. BPC, aplicat numai o dată, a scăzut mult viteza de selectare (la grupul tratat cu BPC imediat după naștere) și viteza de contuzionare (la ambele grupe tratate cu BPC). S-a obținut aceeași greutate corporală la animalele tratate cu BPC cu un consum de hrană mult mai mic.

Influența asupra infecției: s-au investigat 40 de porci întărcați afectați cu enterocolită *E.coli*, având vârsta de 28 de zile. S-a administrat BPC la 20 animale (10 $\mu\text{g/kg}$ greutate corporală intramuscular). Peste o lună s-a observat o însemnată scădere a ratei mortalității la animalele tratate cu BPC.

Într-un alt experiment, rata mortalității după prima săptămână de viață a fost investigată pe un număr total de 1200 porci sănătoși. La 400 animale s-a administrat BPC imediat după naștere, pe lângă terapia cunoscută cu Fe. La animalele tratate cu BPC (10 $\mu\text{g/kg}$ greutate corporală, intramuscular) s-a observat o mortalitate mult micșorată.

31). *Activitatea antivirală.*

Activitatea antivirală s-a investigat *in vitro* și *in vivo* (șoareci). BPC s-a utilizat în doze de 10 $\mu\text{g/kg}$ greutate corporală, i.p. sau i.e.v.. S-a constatat o activitate remarcabilă împotriva enterovirusurilor (tipul Echo : 6, 9, 11 și 16; tipul Coxsackie : A9, B3 și B4), virusurilor CNS (encefalitele Ixode, coriomeningita LCM) și a virusurilor ARBO (Tahyna, Bhanja și Calovo). Supraviețuirea prelungită (72 ore până la supraviețuire absolută) s-a constatat la șoarecii infectați.

În textul ce urmează vor fi descrise, cu alte cuvinte, unele aspecte ale prezentei invenții.

Problema tehnică.

Problema tehnică este dacă este posibil sau nu să se influențeze prin farmacoterapie simultan :

1.1. hepatita acută (virală, provocată de medicamente, toxică, fulminantă, neținând cont de etiologie);

2. hepatita cronică;

3. ciroza ficatului;

4. colestază;

5. colelelitiază;
6. colangită;
7. transplantul de ficat -terapia înainte și după transplantare;
8. terapia înainte, precum și după, chirurgie la alte operații chirurgicale pe ficat (de exemplu, malformații congenitale, stenoză canalului bilei, benignă și malignă;
- 11.9. prevenirea inflamării pancreasului;
10. îmbunătățirea cursului inflamației pancreasului;
11. scăderea frecvenței pancreatitei postoperatorii;
12. prevenirea complicațiilor și a mortalității de la pancreatita acută;
13. scăderea frecvenței pancreatitei cronice;
- 11.14. hemoragia acută în tractul gastrointestinal superior;
15. gastrita erozivă;
16. ulcerul acut, gastric și duodenal ("ulcerul de stres");
17. ulcerul peptic cronic;
18. ulcerul ne-peptic al tractului gastrointestinal;
- IV.19. șocul (indiferent de etiologie);
- V.20. protecția parenchimului renal contra dezvoltării necrozei ischemice și hemoragice acute și cronice;
21. insuficiența renală acută și cronică, precum și toate cauzele capabile să le provoace;
- VI.22. traumele scheletului (fracturi);
23. operații de terapie asupra scheletului (osteotomie);
24. grefe pe schelet (caleme);
25. pseudoartroză;
26. artrodeză;
27. răni (viteză mărită de vindecare, vindecare "per primam");
28. arsuri (ale pielii și mucoaselor, viteză de însănătoșire mărită);
- VII.29. activitatea antitumorală;
- VIII.30. activitatea antiinflamatorie, antiedematoasă, antireumatică;
31. activitatea antipiretică;
32. artrita reumatică;
33. osteoartroză;

34. spondilita anchilozantă;
 35. artrită urică;
 36. reumatismul extra-articular (bursită, tendinită, sinovită, periartrită humeroscapulară);
 37. inflamare și edem după tratamentul chirurgical și nechirurgical fractură și dislocare;
 - IX.38. infarctul miocardic acut;
 39. miocardită;
 40. întârzierea schimbărilor ischemice în țesuturi;
 - X.41. consum mai mic de hrană;
 - XI.42. hiperprolactinemii;
 - XII.43. M.Parkinsoni, parkinsonism;
 - XIII.44. glaucom (scăderea presiunii intraoculare -activitate de tipul dopaminei și al pilocarpinei);
 - XIV.45. *diabetes mellitus*;
 - XV.46. intoxicare cu barbiturice;
 - XVI.47. stresul și toate evenimentele dăunătoare ce apar ca o consecință a stresului.
- Provocarea vătămarilor ficatului, pancreasului, stomacului și duodenului.*
- Sub anestezie ușoară cu eter, s-a făcut o laparotomie mediană. După aceea, canalul biliar a fost legat la distanță de duoden, în punctul în care artera hepatică (prin aceeași manevră chirurgicală, legată simultan împreună cu canalul biliar) ajunge la el din partea stângă, puțin sub vena portală, care rămâne neafectată deasupra legăturii. După aceea rana a fost cusută și animalele lăsate netulburate până la moarte sau sacrificare.
- Sub anestezie ușoară cu eter, s-a făcut o laparotomie mediană și canalul biliar s-a legat chiar înainte de intrarea sa în duoden. După aceea rana s-a cusut și animalele nu au mai fost deranjate până la moarte sau sacrificare.
- Animalele au fost scufundate în apă, la temperatura de 26°C, cu adâncimea de 20 cm, timp de 3 ore. Imediat după aceea, au fost sacrificate. Cu 24 ore înainte de imersarea lor în apă animalelor nu li s-a mai dat hrană, dar au avut acces liber la apă.
- Sub anestezie ușoară cu eter, s-a

făcut o laparotomie mediană și s-a legat pilorul. Rana s-a cusut și animalele nu au mai fost deranjate până la sacrificarea lor, numai după 15 minute de la legarea pilorului.

Animalele au fost imobilizate timp de 24 ore. S-a administrat indometacin simultan cu imobilizarea și 12 ore mai târziu. După 24 ore animalele s-au sacrificat.

Producerea fracturii, rănilor, arsurilor pielii și mucoasei.

Sub anestezie ușoară cu eter, s-a produs o fractură de tibie prin presarea cu degetul utilizând hipomoclon. Animalele au fost sacrificate la 5, 8, 9, 12 și 30 zile după producerea fracturii.

Sub anestezie ușoară cu eter, s-a produs o rană mare pe piele. Au fost sacrificate animale în fiecare zi în cursul primelor cinci zile și apoi după perioade de trei zile până la ziua a 15-a, precum și până la terminarea perioadelor de cinci zile până la o lună de la producerea răni.

Sub anestezie ușoară cu eter, s-a produs o arsură pe spatele animalului (15 x 30mm) prin aprinderea unui termocauter timp de 15 secunde. Animalele au fost sacrificate în ziua a 5-a, a 9-a și a 30-a după producerea leziunilor.

Sub anestezie ușoară cu eter, mucoasa nazală a fost arsă bilateral prin aprinderea termocauterului timp de 5 secunde. Animalele au fost sacrificate în ziua a 5-a, a 9-a și a 30-a după producerea leziunilor.

Producerea vătămării rinichiului.

Sub anestezie ușoară cu eter s-a făcut o legătură a pediculului renal. Animalele au fost sacrificate după 24 ore. Rana a fost cusută și animalele nu au fost deranjate până ce au murit sau au fost sacrificate.

Producerea efectului antiinflamator, antiedematos și antipiretic.

S-a administrat caragenină (1%) (0,05 ml s.c.) în labă ca agent inflamator; volumul labei a fost măsurat după 3 ore utilizând procedura standard.

Pentru creșterea temperaturii corpului s-a folosit sicoferment (2,5

g/kg, i.p.). Temperatura s-a măsurat după aceea rectal timp de 3 ore.

Producerea vătămării inimii.

Animalele au fost imobilizate în decurs de 24 ore. S-a administrat indometacin la începutul imobilizării (ora 0) și după 12 ore. După terminarea perioadei de 24 ore, animalele au fost sacrificate.

S-a administrat izoprenalină (30,0 mg/kg, i.p.) la 0 și 24 ore și după trecerea unei perioade de 48 ore animalele au fost sacrificate.

Producerea efectelor CNS.

-Investigarea efectelor asupra comportării spontane a animalelor (șoareci).

Pentru stabilirea prezenței neuro- nilor dopaminei în activitatea substanței BPC în CNS, s-a folosit un agonist cunoscut al dopaminei, apomorfina (20 mg/kg s.c.), precum și serotonină (5 mg/kg i.p.) [controale comparative] sau soluție salină (NaCl 0,9%) (martor). S-a cercetat comportamentul animalelor după aplicare. Comportarea stereotipă a fost analizată conform cu metoda lui Malick (1983).

-Investigarea efectelor asupra mușchilor irisului.

S-a aplicat soluția de investigat: local sau intraperitoneal. S-a măsurat diametrul pupilei la intervale de timp corespunzătoare (5, 10, 15, 30, 60, 90 și 120 minute), conform procedurilor standard.

-Investigarea efectelor asupra activității depresive a barbituricelor.

Prin aplicarea de pentobarbital de Na (50 mg/kg i.v.) s-a provocat o narcoză. Durata somnului sub barbituric a fost evaluată prin lipsa sau prezența așa, numitului "reflex de îndreptare".

Producerea efectelor asupra diabetes mellitus.

Diabetes mellitus a fost provocat prin administrarea de aloxan (100 mg/kg i.p.) precum și de streptozocină (100 mg/kg i.p.). S-a măsurat prin procedeele clasice conținutul de glucoză în urină și sânge. Animalele nu au fost deranjate până la moarte.

Evaluarea efectelor

Distribuția.

Studiile cu BPC marcat cu I-125 demonstrează acumularea de BPC, care este dependentă de doză și de timp, în cea mai mare parte chiar în stomac, cu distribuție în întregul organism, fie după administrarea orală, fie parenterală.

Observația clinică.

În studiile privitoare la vătămarea ficatului, pancreasului, stomacului și duodenului, rinichiului, inimii, fracturi, răni, arsuri (piele, mucoase), *diabetes mellitus* starea generală a animalelor tratate cu BPC a fost cu mult mai bună decât la grupele de control. Spre deosebire de grupele de control, la grupele tratate s-a observat, în principal, că nu se produce moarte sau rata mortalității este scăzută.

Observațiile macroscopice și patologice.

La animalele de control, cu legarea canalului biliar și a arterei hepatice s-a dezvoltat o necroză a ficatului galben-verde mare, uneori cuprinzând de asemenea în întregime loburile hepatice, precum și necroză a pancreasului și leziuni hemoragice în stomac și duoden. Administrarea de BPC a preîntâmpinat cu succes și dependent de doză leziunile descrise mai sus. La animalele de control aceste leziuni au apărut deja după 6 ore de la legare, în timp ce la animalele tratate ele nu au fost vizibile nici după 48 ore de la efectuarea legăturii. Examinarea patohistologică a susținut schimbările și diferențele observate macroscopic.

La animalele de control cu legătura la canalul biliar în locul intrării sale în duoden, au apărut o necroză puternică, precum și leziuni hemoragice în stomac și duoden. Administrarea de BPC în funcție de doză a prevenit dezvoltarea leziunilor descrise mai sus. Examinarea patohistologică a susținut schimbările și diferențele observate macroscopic.

La animalele de control supuse la testul de scufundare în apă, la stresul de restricție plus aplicare de indometacin, precum și la legarea pilorului pe timp

scurt (15 minute) s-a demonstrat producerea de leziuni gastrice însemnate. Prin administrare de BPC se reduce mult (sau se anulează complet) dezvoltarea de leziuni gastrice prin procedeele vătămătoare descrise mai sus.

La animalele de control cu legătura la pediculul renal s-au constatat leziuni grave ale rinichiului. La șobolanii tratați cu BPC aceste leziuni au fost cu mult mai mici. Examinarea patohistologică a susținut foarte bine schimbările și diferențele observate macroscopic.

În comparație cu animalele de control cu fractura de tibie, la animalele tratate cu BPC evoluția hematomului posttraumatic a fost cu mult mai puțin pronunțată, cu utilizarea funcțională mai curând a piciorului rupt. Examinarea patohistologică calitativă folosind metodele cunoscute a demonstrat o viteză de înșănătoșire a calusului mărită și exagerată la șobolanii tratați în toate perioadele de observare.

La animalele de control cu rană s-a constatat o dezvoltare mare de granulație seropurulentă în primele zile după provocarea rănilor. La șobolanii tratați cu BPC, spre deosebire de grupa de control, rana a fost uscată fără exudare, fără granulații vizibile (de la început). Examinarea patohistologică a susținut schimbările și diferențele observate macroscopic în toate perioadele investigate.

La animalele de control supuse la stres de restricție plus indometacin, s-au observat leziuni puternice miocardice cu valori crescute ale CPK în ser. Prin administrarea de BPC s-a redus mult vătămarea miocardului și au scăzut valorile CPK. Examinarea patohistologică a confirmat diferențele și schimbările observate macroscopic.

La animalele cu *diabetes mellitus* provocat experimental, BPC a eliminat glicozuria tranzitorie în grupele tratate cu aloxan. La animalele tratate cu streptozocin, administrarea de BPC a mărit supraviețuirea aproape de trei ori. La animalele tratate cu BPC au fost mai puțin pronunțate polidipsia și polifagia.

Efectul antiinflamator, anti-edema-

tos, antipiretic.

La animalele tratate cu BPC s-a observat o scădere puternică a edemului provocat de caragenină față de animalele de control în toate perioadele investi-

gate. La animalele tratate cu siccoferment, administrarea substanței BPC reduce semnificativ creșterea temperaturii corpului, în comparație cu rezultatele observate la grupa de control.

Efectele. Datele in vitro.

La două zile de la începerea cultivării celulelor de fibroblaste umane L-929 și melanom B-16, s-a administrat substanța BPC. La trei zile după aceea s-a evaluat numărul de celule cu un numărător de celule. Substanța BPC a demonstrat un efect toxic dependent de doză asupra celulelor de melanom. Nu s-a demonstrat nici un efect asupra fibroblastelor.

În comparație cu animalele de control cu arsuri ale pielii, la animalele tratate s-a constatat o însemnată creștere a formării crustei. La animalele de control cu arsuri ale mucoasei (de exemplu mucoasa nazală) în primele două zile s-a observat un edem grav al țesutului vătămat, urmat de secreție seropurulentă și de obstrucția funcțională parțială a respirației nazale. La animalele tratate cu BPC nu s-a observat evoluția schimbărilor descrise mai sus. Examinarea patohistologică a confirmat puternic diferențele și schimbările observate macroscopic.

Efectele asupra CNS.

Efectele substanței BPC asupra CNS au fost investigate prin observarea comportamentului animalelor (șoareci).

La 5 minute după aplicare s-a observat o creștere a locomotiei. Neastămpărul animalelor a crescut de la minut la minut, ajungând la un maxim după 30 minute. În acel moment animalele stăteau pe picioarele din spate și într-o poziție ca de lumânare și trăgeau aer pe nas. Fenomenul Straubs a fost evident, animalele alergau împrejurul cuștii și de asemenea a fost evidentă o piloerecție. După administrarea de apo-

morfină, schimbarea a apărut după 45 minute, fiind însoțită de o ședere parțială pe labele din spate. După administrarea de serotonină, s-a observat numai o scurtă perioadă de comportament stereotipic (locomotie intensificată, inspirație de aer, curățare cu intensitate mai mică).

Aplicarea pe ochi (sau i.p.) a condus la mioză (aproximativ 20%).

Prin administrare de BPC s-a scurțat durata somnului indus de barbiturice, ceea ce a fost stabilit prin micșorarea timpului fără reflexul de ședere drept (cel puțin 60%).

Efectul asupra presiunii sângelui, motilitatea intestinului, temperatura bazală, diureză.

Administrarea de BPC nu a produs efect asupra schimbărilor presiunii sângelui induse de adrenalină, noradrenalină, izoprenalină, acetilcolină și serotonină, nici asupra valorilor de bază ale presiunii sângelui (tensiunii).

Administrarea de BPC nu prezintă nici un efect asupra mușchiului neted al intestinului *in vitro* (cobai).

Administrarea de BPC nu micșorează temperatura de bază. Administrarea de BPC nu conduce la creșterea diurezei.

Mecanismul de acțiune.

Se poate presupune că acțiunea BPC, ca și a altor proteine exogene, este o sechelă a unuia din următoarele mecanisme: interacțiunea directă a proteinei sau a fragmentelor acesteia, cu receptorii celulelor; stimularea sau inhibarea eliberării de proteine active biologic (stimulatoare sau inhibitoare) sau de ne-proteine, prin mecanismele legate de receptor sau ne-receptor; interacțiuni cu enzimele care degradează peptidele endogene active biologic.

Numeroase efecte protectoare asupra entităților nosologice de altfel necorelate ar putea fi explicate dacă ele se aduc la un termen comun -stresul (vătămare) pe care îl provoacă în organism. Astfel, pare probabil ca BPC este substanța care reprezintă primul răspuns de închidere în sine (începând cu stomacul)

la orice eveniment plin de stres care afectează negativ organismul. De aceea mecanismul de acțiune al BPC reprezintă primul mecanism de apărare împotriva atacurilor stresante (vătămatoare).

Din cele de mai sus, se trage concluzia că este posibil să se acționeze din punct de vedere farmaceutic folositor în decursul următoarelor boli, prin aplicare de BPC :

I.1. hepatită acută (indusă de virus, medicamentoasă, toxică, fulminantă, indiferent de etiologie);

2. hepatită cronică;

3. ciroza ficatului;

4. colestază;

5. coledocolitiază;

6. colangită;

7. terapia transplantului de ficat înainte și după transplantare;

8. terapia preoperatorie și postoperatorie la alte operații chirurgicale pe ficat (de exemplu, malformații congenitale, stenoză de coledoc benignă sau malignă;

II.9. prevenirea pancreatitei;

10. îmbunătățirea cursului pancreatitei;

11. scăderea ratei pancreatitei postoperatorii;

12. prevenirea complicațiilor și a mortalității de la pancreatită acută;

13. scăderea incidenței pancreatitei cronice;

III.14. hemoragia acută în tractul gastrointestinal superior;

15. gastrita erozivă;

16. ulcerul acut, gastric și duodenal ("ulcer de stres");

17. ulcerul peptic cronic;

18. ulcerul ne-peptic al tractului gastrointestinal;

IV.19. șocul (toate etiologiile);

V.20. protecția parenchimului renal contra dezvoltării necrozei ischemice și hemoragice acute și cronice;

21. insuficiența renală acută și cronică, precum și toate cauzele sale;

VI.22. traumele scheletului (fracturi);

23. proceduri terapeutice asupra sistemului scheletului (osteotomie);

24. grefe pe schelet;

25. pseudoartroză;

26. artrodeză;

27. răni (vindecare mai rapidă, vindecare "per primam");

28. arsuri (ale pielii și mucoaselor, însănătoșire mai rapidă);

VII.29. activitatea antitumorală;

VIII.30. efect antiinflamator, anti-edematos, antireumatic;

31. efect antipiretic;

32. artrita reumatică;

33. osteoartroză;

34. spondilita anchilozantă;

35. gută;

36. reumatismul extra-articular (bursită, tendinită, sinovită, periartrită humeroscapulară);

37. inflamare și edem după tratamentul chirurgical și nechirurgical, care însoțesc fracturile și dislocările;

IX.38. infarctul miocardic acut;

39. miocardita;

40. întârzierea schimbărilor ischemice ale țesuturilor;

X.41. consum mai mic de hrană (efect anorexitiv);

XI.42. hiperprolactinemii;

XII.43. boala lui Parkinson;

XIII.44. glaucom (scăderea presiunii intraoculare -efectul dopaminei și al pilocarpinei);

XIV.45. *diabetes mellitus*;

XV.46. intoxicare cu barbiturice;

XVI.47. stresul și toate bolile provocate de stres ale organismului.

Administrarea substanței se face per os sau parenteral, sub forma de pilule, capsule, drajeuri, preparate linguale, vaginale, supozitoare, soluții injectabile, spray nazal, unguente, creme, geluri, spray, picături de ochi, picături pentru urechi, picături pentru nas.

Invenția de față prezintă următoarele avantaje:

-are efecte benefice în tratamentul multor boli;

-îmbunătățește rata fertilității;

-îmbunătățește activitatea mo-

torie;

-are activitate antivirală;

Se prezintă exemplele de realizare

a invenției, în legătură cu fig. 1 și 2, care reprezintă:

- fig. 1, spectrul UV pentru caracterizarea substanței BPC

- fig. 2, spectrul IR pentru caracterizarea substanței BPC

Exemplul 1. *Procedeul de izolare a substanței BPC.*

Materialul din care se izolează substanța BPC se obține din suc gastric al 542 de pacienți repetat și reproductibil și din surse animale.

Materialul se depozitează la 2...8°C. Materialul se omogenizează. După aceea este centrifugat (12 000 G⁹/30 minute). Apoi se colectează supernatantul. 200 ml din supernatant se dializează în apă (+4°C), 1:125, ceea ce înseamnă că până se ajunge la o conductibilitate de 100 μS. După aceea dializatul este liofilizat. Reziduul uscat se dizolvă în 10 ml apă redistilată și se aplică pe o coloană cromatografică cu un gel schimbător de ioni modificat DEAE (40-80 μm). Coloana este de 25 x 250 mm. Pentru diluare se folosește un tampon (acetat de sodiu 0,01 M, pH 5,2). Detectarea fracției se face cu un detector de ultraviolete în intervalul de 2800 nm. Fracțiile de 40-120 ml se colectează. Eluatul este întâi concentrat cu AQUACIDE -3 (Calbiochem, SUA) și apoi liofilizat.

Substanța uscată se dizolvă în 10 ml tampon fosfat 0,2 M, pH 7,4 și după aceea se pune pe o coloană cromatografică cu SEPHACRYL -S -200 (2,5 x 450 mm) cu o curgere de 1,2 ml/minut. Se colectează fracții de 80-200 ml.

Soluția este dializată față de apă distilată, concentrată cu AQUACID -3 și liofilizată. Se obțin aproximativ 200 mg substanță uscată, albă.

Caracterizarea. Substanța BPC este caracterizată prin spectrele IR și UV (fig. 1 și 2).

Pe bază proprietăților farmacologice descrise, substanța BPC se poate utiliza în tratamentul câtorva boli și dereglări, în special când formarea normală a acestui agent în organism este

insuficientă sau chiar absentă.

Ea se mai poate folosi pentru tratamentul :

a) *tuturor bolilor și dereglărilor provocate de stres;*

b) *dereglărilor de circulație :* ulcer (de diferite origini), șoc (de diferite etiologii), ischemie și infarcturi (în diferite organe);

c) *inflamație și edeme :* inflamațiile și edemele de toate etiologiile, hepatita acută și cronică, ciroza ficatului, colangită, pancreatită (de diferite etiologii), gastroduodenită, nefrită și nefropatii, miocardită, pericardită, endocardită, artroză și artrită (de diferite etiologii), rinita, dereglări reumatice, dereglări de articulații de diferite etiologii, febră, leziuni provocate de radicali liberi;

d) *traume și chirurgie:* traumatism (tratament pre - și post -traumatic), grefare, răni, arsuri, fracturi, complicații post -operatorii.

e) *stare malignă :* unele tipuri de tumori;

f) *diabetes mellitus;*

g) *dereglări de etiologie dopaminergică sau similară ei :* obezitate, boala lui Parkinson, hiperprolactinemii, glaucom și somn provocat de barbiturice (otrăvire cu barbiturice);

h) *boli și dereglări ale sistemului nervos:* boala lui Alzheimer, leziuni ischemice și traumatice ale sistemului nervos și întârzierea schimbărilor degenerative senile;

i) *stomatologie :* boli și dereglări ale mucoasei bucale, tratamentul chirurgical al alveolelor periodontale, inhibarea resorbției rădăcinilor;

j) *sistemul hematopoietic:* neutropenia, anemia aplastică, sindromul mielodisplazic, transplantarea de măduvă osoasă;

k) *leziuni provocate de radiații :* sindromul de radiație acut și protecția împotriva leziunilor din cauza radiațiilor;

l) *imunologie:* reacții de hipersensibilitate, alergii și transplantari;

m) *fertilitate :* creșterea fertilității, terapia oligoastenospermei și promovarea lactației;

n) *utilizare veterinară* : în locurile de creștere a animalelor, scăderea mortalității, împiedicarea creșterii, contuzii, îmbunătățirea transformării hranei, creșterea greutății corporale;

o) *virusologie* : *terapia antivirală*;

p) *diverse* : schimbarea grasă a ficatului, colestază, colelitiază, disfuncții acute și cronice ale rinichiului, îmbolnăvirea toxică a ficatului și rinichiului.

Substanța BPC se utilizează ca medicament pentru administrare enterală, locală, rectală și parenterală. Compozițiile farmaceutice sunt formulate prin adăugarea de adjuvanți anorganici și organici. Pentru tablete și drajeuri se adaugă de exemplu talc, lactoză, amidon, stearați etc., pentru soluții și suspensii se adaugă de exemplu apa, alcoolii, glicerină etc.. Pentru supozitoare se adaugă de exemplu uleiuri naturale, uleiuri hidrogenate, ceruri sau polietilenglicoli. Compoziția poate în general să conțină conservanți, agenți tampon, stabilizatori, agenți activi de suprafață, intermediari de dizolvare, agenți de îndulcire și coloranți adecvați.

O doză zilnică corespunzătoare pentru substanța BPC este de la 5 la 50 $\mu\text{g/kg}$ greutate corporală și se poate administra într-o singură doză sau divizată în părți.

Exemplul 2. *Prepararea substanței BPC din suc gastric uman.*

Suc gastric uman de aceeași proveniență ca cel din exemplul 1 se centrifughează, se dializează și se liofilizează conform procedurii din exemplul 1.

Reziduul uscat (80,4 mg) se dizolvă în tampon acetat 0,1 M (3 ml, pH=5,22) și se aplică pe o coloană cromatografică (10 x 50 mm) cu rășină schimbătoare de ioni Fractogel -TSK^R (Merck) echilibrată în prealabil cu tampon acetat (pH=5,2). Viteza de curgere este de 0,7 ml/minut. Se colectează fracțiile cu un spectromonitor UV la 280 nm. Se colectează prima fracție cu absorbție puternică UV.

Această fracție este dializată față de apa distilată și apoi liofilizată (47 mg).

Acest reziduu uscat se dizolvă din

nou în tampon acetat (1 ml) și se aplică pe o coloană cromatografică (16 x 560 mm) umplută cu gel Sephadex -G -100^R (Pharmacia Fine Chemicals) echilibrată în prealabil cu tampon acetat. Viteza de curgere este de 0,3 ml/minut. Se colectează fracțiile de la al 66-lea până la al 108-lea ml, se dializează față de apa distilată și se liofilizează. Se obține o pulbere albă care corespunde cu produsul descris în exemplul anterior 1.

Exemplul 3. *Prepararea substanței BPC din suc gastric uman.*

Materia primă utilizată pentru prepararea substanței BPC se obține reproductibil din suc gastric din stomacul a 542 de pacienți. Materialul colectat trebuie să fie depozitat la +2 până la +8°C. Materialul se omogenizează înainte de utilizare.

O parte alicota (200 ml) din acest material se separă mai întâi prin centrifugare (12 000 G timp de 30 minute) în părți brute și supernatantul lichid. Acest lichid se dializează față de apă demineralizată (1:125) la +4°C, până când se ajunge la o conductibilitate de 100 μS . După aceea soluția se liofilizează. Reziduul uscat se dizolvă în 10 ml apă distilată și se aplică pe o coloană cromatografică (25 x 250 mm) umplută cu gel schimbător de ioni modificat DEAE (de exemplu Trisacryl M -DEAE^R, IBF). Pentru eluare se folosește tampon acetat de sodiu (0,01 M, pH=5,2). Fracțiile se controlează cu detectorul de ultraviolete la 280 nm. Fracțiile de la al 40-lea până la al 120-lea ml de eluat se colectează, se concentrează utilizând AQUACIDE -3^R (Calbiochem.) apoi se dializează și se liofilizează.

Substanța uscată se dizolvă în 10 ml tampon fosfat 0,2 M, (pH=7,4) și se purifică din nou pe o coloană cromatografică (2,5 x 450 mm) umplută cu SEPHACRYL -S -200^R (Pharmacia Fine Chemicals). Curgerea are o viteză de 1,2 ml/minut. Se colectează fracțiile de la al 80-lea la al 200-lea ml, se dializează față de apă distilată, se concentrează utilizând AQUACID -3 și apoi se liofilizează. Se obțin 2 mg substanță albă.

Substanță preparată -BPC -este foarte solubilă în apă. Se descompune între 180 și 200°C. Greutatea moleculară, determinată prin cromatografia în gel, este estimată la 40 000 - 5 000 Daltoni. Spectrul în ultraviolet (în apă) arată absorbție în regiunile indicate în fig. 1.

Spectrul în infraroșu (în KBr) arată benzi de absorbție în regiunile indicate în fig. 2.

Substanța BPC are o structură de proteina pliată cu secvența parțială de aminoacizi de la terminația azot : H_2N -Gly-Glu-Pro-Pro-Gly-Lys-Pro-Ala-Asp-Asp-Ala-Gly-Leu-Val-.-COOH.

Exemplul 4. *Prepararea substanței BPC din suc gastric de porcine.*

Suc gastric de porcine omogenizat (85 ml) se centrifughează, se dializează și se liofilizează conform cu procedura descrisă în exemplul anterior, pentru a se obține 440 mg reziduu

uscă. Apoi, 110 mg din acest reziduu se dizolvă în tampon acetat 0,1 M (6 ml, pH=5,22) și se aplică pe o coloană cromatografică (10 x 50 mm) cu rășină schimbătoare de ioni Fractogel -TSK^R și se prelucrează cum s-a descris în exemplul anterior. Se obțin 44 mg concentrat gălbui.

O parte din acest concentrat (24 mg) se dizolvă în același tampon acetat (1 ml) și se aplică pe o coloană cromatografică (16 x 565 mm) umplută cu gel Sephadex^R -50/80,) echilibrată cu tampon acetat . Viteza de curgere este de 1,35 ml/minut. Se colectează eluatul între al 65-lea și al 108-lea ml, se dializează față de apa distilată și se liofilizează. Pulberea albă obținută (10 mg) are (în intervalul de acuratețe și reproductibilitate al metodelor analitice utilizate) aceeași greutate moleculară și alte proprietăți ca și produsul descris în exemplele de mai sus.

Exemplul 4. *Tablete.*

Se constituie o compoziție din următoarele componente :

Compoziția	mg/tabletă
substanță BPC	0,3
lactoză	37,7
amidon	6,0
talc	3,0
tragacant	2,5
stearat de magneziu	0,5
	50 mg.

Exemplul 5. *Capsule*

Se constituie o compoziție din următoarele componente :

Compoziția	mg/capsulă
substanță BPC	0,3
lactoză	99,0
stearat de magneziu	0,7
	100 mg.

Exemplul 6. *Produse de pus sub limbă.*

Se constituie o compoziție din următoarele componente :

Compoziția	mg/produs sublingual
substanța BPC	0,3
manită	100,0
amidon	5,0
polivinilpirolidonă	1,5
talc	3,2
	110 mg

Exemplul 7. Supozitoare.

Se constituie o compoziție din următoarele componente :

<u>Compoziția</u>	<u>mg/supozitor</u>
substanță BPC	0,5
polietilenglicol 300	478,0
polietilenglicol 1500	529,0
polietilenglicol 6000	38,0
emulgator	14,5
	1060 mg.

Exemplul 8. Crema.

Se constituie o compoziție din următoarele componente:

<u>Compoziția</u>	<u>mg/250 g crema</u>
substanță BPC	0,05
emulgator	25,00
ulei de arahide hidrogenat	50,0
tween 60	120,0
propilenglicol	30,0
hidroxibenzoat de metil	0,16
hidroxibenzoat de propil	0,17
	250 g.

Exemplul 9. Soluție injectabilă.

Pentru a obține o soluție injectabilă se formează o compoziție din :

<u>Compoziția</u>	<u>mg/ml</u>
substanță BPC	0,3
carboximetilceluloza de sodiu	1,5
polivinilpirolidonă	5,8
lecitină	2,7
alcool benzilic	0,01
tampon	cât este necesar
apă bidistilată până la	1 ml.

Exemplul 10. Soluție.

Se constituie o soluție din următoarele componente :

<u>Compoziția</u>	<u>g/ 25 ml</u>
substanță BPC	0,05
glicerină	15,00
alcool benzilic	0,01
tampon	cât este necesar
apă bidistilată până la	25 ml.

Exemplul 11. Injecție uscată

Se formează o compoziție din următoarele componente :

<u>Compoziția</u>	<u>greutate (mg)</u>
substanță BPC	0,3
manită	10,0 mg

Exemplul 12. Spray nazal

Se constituie o compoziție din următoarele componente:

<u>Compoziția</u>	<u>mg/fiecare doză</u>
substanță BPC	0,5
alcool benzilic	0,15
uligiol [®] -812	14,00
freon	60,00
	74,65 mg

Exemplul 13. *Picături pentru ochi, urechi și nas.*

Se constituie o compoziție din următoarele ingrediente :

Compoziția	mg/5 ml
substanță BPC	45
stabilizator	5
fosfat acid de sodiu	116
fosfat diacid de sodiu	33
clorură de benzalconiu	0,5
apă bidistilată până la	5 ml.

Exemplul 14. *Produse vaginale.*

Se constituie o compoziție din următoarele componente :

Compoziția	mg/produs vaginal
substanță BPC	0,3
polietilenglicol 300	150,0
polietilenglicol 1500	1290,0
polietilenglicol 6000	700,0
propilenglicol	200,0
tween 40	59,7
lactoză	<u>100,0</u>
	2500 mg.

Exemplul 15. *Unguent oftalmic.*

Se constituie o compoziție din următoarele componente :

Compoziția	mg/ 3,5 g
substanță BPC	45
ulei de parafina	1000
emulgator	100
vaselină albă	<u>2355</u>
	3500 mg.

Revendicări

1. Compus de protecție a corpului (BPC), **caracterizat prin aceea că**, are greutatea moleculară de 40.000 ± 5000 Daltoni, determinată prin cromatografie în gel, cu spectre în infraroșu și ultra-violet așa cum au fost identificate în fig. 1 și 2, are secvența parțială N-terminală de aminoacid:

$H_2N-Gly-Glu-Pro-Pro-Gly-Lys-Pro-Ala-Asp-Asp-Ala-Gly-Leu-$
 $-Val...-COOH$

și se obține prin procedeul pentru prepararea sa, conform revendicărilor 2,3 și 4.

2. Compus de protecție a corpului (BPC), conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, este utilizat în tratarea de boli și tulburări induse de supra-solicitare; tulburări circulatorii: ulcer de

30 diferite proveniențe, șoc cu etiologie diferită, ischemii și infarcturi în organe diferite; *inflamări și edeme*: de orice etiologie, hepatită acută sau cronică, ciroză hepatică, cholangită, pancreatită de
 35 orice etiologie, gastroduodenită, nefrită și nefropatii, miocardite, pericardite, endocardite, artroză și artrită de diferite etiologii, rinite, tulburări reumatice de etiologie diferită sau combinată, febră, leziuni induse de radicali liberi; *traume și*
 40 *chirurgie*: traumatism tratament pre- și post- traumatic, grefe, răni, arsuri, fracturi, complicații după operații; *malignitate*: unele tipuri de tumori; *Diabetes mellitus*; *Tulburări dopaminergice sau cu etiologie similară*: obezitate, boala Parkinson, hiperprolactinemii, glaucom și somn prelungit indus de barbiturice, otrăvire cu barbiturice; boli și tulburări ale
 45 sistemului nervos: boala lui Alzheimer, tulburări ischemice și traumatice ale

sistemului nervos și întârzierea schimbărilor degenerative senile; *stomatologie*: boli și tulburări ale mucoasei bucale, tratamentul chirurgical al pungilor peridontale, inhibiția resorbției rădăcinilor; *sistemul hematopoetic*: neutropenie, anemia aplastică, sindromul mielosplastic al transplantului de oase subțiri; *leziuni provocate de radiație*: sindromul acut de radiație și protecția împotriva leziunilor provocate de radiație; *imunologie*: reacții de hipersensibilitate, alergii și transplanturi; *fertilitate*: creșterea fertilității, terapia oligoastenospermiei și sporirea lactației; *utilizare veterinară*: în creșterea comercială a animalelor, micșorarea mortalității, oprirea creșterii, contuzii, transformarea îmbunătățită a nutrețului, creșterea greutateii corporale; *terapie antivirală*; *diverse*: modificarea grăsimilor din ficat, colestază, colelitiază, disfuncții acute și cronice ale rinichilor, vătămarea toxică a ficatului și rinichilor.

3. Compus de protecție a corpului (BPC), conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, se utilizează sub formă de compoziție farmaceutică, împreună cu un suport acceptabil farmaceutic, și se prezintă sub formă de tablete, capsule, lingualete, supozitoare, vaginalete, injecții, soluții, spray nazal, unguente, creme, geluri, spray, drajeuri, picături pentru ochi, picături pentru pus în urechi și picături pentru pus în nas.

4. Procedeu pentru preparare a compusului de protecție a corpului, **caracterizat prin aceea că**, se obține din suc gastric uman sau animal, colectat și omogenizat, apoi se separă în părți crude și lichid supernatant prin centri-

fugare, utilizând 12.000 rotații timp de 30 minute; lichidul supernatant se dializează față de apă demineralizată (1:125) la +4°C, până când se atinge o conductibilitate de 100μS și apoi se liofilizează; rezidul uscat se purifică în coloană cromatografică umplută cu gel sau rășină de schimb anionic slab bazică, utilizând un tampon acetat de sodiu 0,01 ml/l cu pH între 5 și 6 ca eluant; fracția activă se dializează față de apă demineralizată (1:125) la +4°C până când se atinge o conductibilitate de 100μS, și apoi se liofilizează; concentratul uscat se purifică într-o coloană cu gel prin cromatografie, utilizând un tampon fosfat 0,2 mol/l cu pH între 7 și 8 ca eluant; din concentratul uscat purificat se obține în final compusul de protecție a corpului, prin dializa și liofilizarea acestuia.

5. Procedeu pentru preparare a compusului de protecție a corpului, conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că**, în etapa de purificare a rezidului uscat în coloană cromatografică se utilizează o coloană cromatografică cu DAEA, DMAE, GAE sau cu gel sau rășină de schimb de anioni cu alte grupuri bazice modificate.

6. Procedeu pentru preparare a compusului de protecție a corpului, conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că**, purificarea concentratului uscat într-o coloană cu gel se efectuează utilizând un gel anorganic sau organic cu matrice din dextran, polistiren, poliacrilamidă, aragoză, polivinil sau altă matrice, având posibilitatea de fracționare în intervalul de greutate moleculară de 20.000 și 100.000 Daltoni.

Președintele comisiei de examinare: **ing. Barbu Mara**

Examinator: **ing. Eremia Laura**

