(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
București

ROMANIA

(11) Nr. brevet: 113430 B1
(51) Int.Cl.[6] A 61 K 35/78;
A 61 K 35/10;

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotarârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **92-01491**

(22) Data de depozit: **27.05.1991**

(30) Prioritate: **27.05.1990 DE P 4017091-8;**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.07.1998 BOPI nr. **7/1998**

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

(61) Perfectionare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **DE 91 / 00450 27.05.1991**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 91/18616 12.12.1991**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 109705

(71) Solicitant: **MACH WALTER, KIRCHSEEON, DE;**

(73) Titular: **MACH CHANTAL , KIRCHSEEON, DE;**

(72) Inventatori: **MACH WALTER, KIRCHSEEON, DE;**

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

(54) PROCEDEU DE OBȚINERE A GRUPEI DE SUBSTANȚE ACTIVE PENTRU CHEMOTERAPIA RESTITUTIVĂ A BOLILOR VIRALE INFECȚIOASE ȘI PREPARATE FARMACEUTICE CONȚINÂND ACESTE SUBSTANȚE

(57) **Rezumat:** Procedeul de obținere a grupei de substanțe active, în conformitate cu prezenta invenție, se efectuează în trei etape: I) prepararea de unități de lignină bogate în polizaharide(PLP), prin extracție din lemn sau materiale lemnoase și/sau din culturi celulare vegetale (A) în mediu apos, în condiții slab acide sau alcaline, și separarea părților componente solide insolubile; II) prepararea de unități lignoide sărace în polizaharide (LPL), cu masă moleculară mică, prin extracție alcalină apoasă la *p*H= 7... 14, din produse de carbonizare a lemnului sau materiale lemnoase biconvertite (B), și apoi separarea părților componente solide insolubile în alcalii, și III) prepararea unui produs de reacție solubil în apă LD(PLP=LPL) cu greutate moleculară mică (LD) din produsele din etapele I) și II), prin reacționarea produsului din etapa I), a unităților de lignină bogate în polizaharide (PLP) cu produsele din treapta II), cu unitățile lignoide sărace în polizaharide (PLP), în condiții alcaline apoase, la *p*H 9... 12; izolarea fracțiunilor LD ale acestui produs de reacție HD(PLP=LPL) prin ultrafiltrare la valori nominale ale secțiunii de separare de aproximativ 15 până la 40 kD și eliminând reziduul, după care urmează tratarea soluției cu schimbători de cationi H_+ la *p*H 3 până la 7,0 și prelucrarea în continuare a soluției acide a grupei de substanțe active LD(LPL= PLP). Preparatele farmaceutice care conțin grupa de substanțe active, obținute în conformitate cu procedeul descris mai sus, sunt constituite din soluția apoasă a produsului de reacție din treapta III), LD(PLP=LPL) care se prelucrează în sine cunoscut, prin asocierea cu substanțe auxiliare inactive, în vederea obținerii unui preparat farmaceutic fluid, în concordanță și cu alte forme de administrare, cum ar fi fiole injectabile. Aceste produse farmaceutice sunt administrate pentru combaterea infecțiilor virale și se administrează prin aplicarea locală sau parenterală. Se administrează pentru combaterea retrovirusilor, mai ales de tipul HIV și virusi SIDA.

Revendicări: 22
Figuri: 6

RO 113430 B1

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a grupei de substanțe active, pentru chemoterapia restitutivă a bolilor virale infecțioase, precum și la preparate farmaceutice, care conțin aceste substanțe.

Combaterea infecțiilor cu agenți virali este o problemă care, până în prezent, nu a fost rezolvată în totalitate. Una dintre problemele care nu poate fi rezolvată este mutația relativă a virușilor, care împiedică parțial sau total acțiunea medicamentelor antivirale sau a anticorpilor specifici corpurilor. O metodă prin care se conferă rezistență față de infecții multi-virale de felurile cele mai diverse este folosirea unui amestec de substanțe active, una dintre aceste substanțe trebuind să fie foarte eficientă; acest principiu se poate obține sub forma unui preparat de *gama*-globulină, unde este vorba de un amestec de anticorpi din sângele a mai mulți de 2000 de donatori, și care prezintă o mare parte a spectrului de anticorpi împotriva îmbolnăvirilor din Europa centrală, și de aceea se consideră că acest produs acționează împotriva celor mai diferite infecții pe baza multitudinii diferiților anticorpi.

Până în prezent, s-au efectuat încercări de combatere a infecțiilor cu virusi, prin metode care împiedică replicarea acestora în diferite stadii. Astfel, există medicamente de tipul Azidothymidină (AZT), care inhibă transcripția reversă, prin ruperea lanțului; însă aceste medicamente conduc și la acțiuni secundare considerabile care sunt acuzate de către pacienți.

Cercetările care s-au efectuat pe scară mondială, cu sulfat de dextran (compuși care au greutatea moleculară de 10 kD) din hemiceluloze vegetale, au arătat că și această grupă de substanțe nu reprezintă un progres practic considerabil pentru terapia pacienților cu HIV. Medicația pe cale orală, care se aplică cu sulfat de dextran, prezintă dezavantajul, printre altele, că dextranul în circulația sanguină și concentrația acestuia la locul contactului cu virușii nu sunt foarte eficiente precum și faptul că acesta posedă efecte secundare, destul de grave, cum

ar fi neuropenie sau diaree. Pe de altă parte, nici clinic nu s-au observat efecte însemnate prin aplicarea tratamentului cu sulfat de dextran.

S-a încercat să se obțină, pe cale tehnologică, proteine receptoare CD4, care ar trebui să se lege puternic de virusul gp 120, și ca urmare prin saturarea lui să se neutralizeze virusul, și astfel dă-l dezactiveze. Totuși, pentru a folosi acest CD4 artificial, ca element terapeutic, ar fi necesar să se injecteze această proteină artificială de celule, care stă în mod normal în afara membranei celulelor sănătoase, înseamnă pentru organism o iritare în mai multe straturi, a căror reacții imunologice precum și altele nu sunt de neglijat. Proteina CD4 solubilă ar putea să se lege și de glicoproteinele MHC-II și să influențeze în rău funcția lor normală, care ar conduce la bolnavii de SIDA și mai mult slăbirea lor imunologică. Pe de altă parte CD4, solubil ar trebui să fie administrat parenteral în doze ridicate (așa cum s-a arătat în literatura de specialitate).

Pentru a se rezolva această problemă, s-a propus să se obțină segmente mici de CD4, fragmente de proteine care să fie astfel structurate încât să fie recunoscute de gp 120. Dacă s-ar reuși aceasta, s-ar putea pune întrebarea dacă acest fragment de proteină nu ar duce la dereglări imunologice in vivo și ar putea declanșa perturbări care nu sunt cunoscute până în prezent bolnavilor de SIDA.

Din stadiul tehnicii, este cunoscut că la bolnavii de SIDA și ARC, factorul responsabil de apariția bolii, nu este numai o problemă a producției de virus. Problabil că HIV pune în funcțiune, ca antigen, promecanisme imunologice care înclină spre escaladare. Similitudini cu boli auto-imunologice (de exemplu *lupus eritematos*) arată că nu poate fi suficient să se efectueze numai o medicație chemoterapeutică anti-HIV. Rezultă faptul că este mai important să se includă în terapie această perpetuare auto-imunoligică, deci să se conceapă și să se dezvolte o formă nouă a "chemoterapiei anti-escalative ".

Se ajunge, deci, la concluzia că în cadrul unei infecții cu HIV la o activare complementară extremă, factorul de anafilaxie C5 induce producerea factorului de necroză tumorală și interleukina-1. Deci, HIV poate să pornească la scaladarea acestei cascade. Acest lucru a fost dovedit în cadrul a mai multor cercetări. Din acest fapt, se poate deduce ușor că o chemoterapie anti-HIV care se pare că ar avea succes, nu trebuie să se limiteze numai la inhibarea HIV ci trebuie să întrerupă cel puțin parțial aceste mecanisme autoimunologice de cerc vicios.

Acțiunea în comun escalativă individuală a diverselor noxe (cum ar fi HIV, factorul de producere a unor infecții oportuniste, cascade autoimune și altele) trebuie să se înțeleagă și mai bine, pentru a ajunge la o chemoterapie utilă, care este cu adevărat curativă. În acest mod, se pot realiza noi forme de terapie.

Bilanțul succesului terapiilor de până acum (de exemplu durata medie de viață după infectare de 13 - 18 luni sau rata de supraviețuire de 5 ani la un procentaj de 3,4 %; așa cum rezultă din literatura de specialitate din domeniu) dovedește că metodele chemoterapeutice care au fost folosite până în prezent nu sunt mulțumitoare.

Din datele care sunt cunoscute din literatura de specialitate, se știe că substanțele colorante naturale de tipul neopenichromină acționează la om, în cantități mici atunci când sunt administrate parenteral, ca fiind "substanțe conducătoare endogene", și măresc de exemplu activitatea membranei secundare a rinichilor.

Acest lucru este, probabil, prima dovadă că acești pigmenți redox care conțin unități chinoide pot să excite mecanisme "antiescalative" ale omului, fără însă a fi acestea o proteină, respectiv un hormon, și acest lucru nu are loc pe calea acțiunii de excitație nespecifică a corpurilor.

Se consideră că o chemoterapie viitoare a HIV trebuie să conțină în același timp (din punct de vedere imunologic) și elemente anti-escalative pentru a inhiba evoluția bolii.

Este cunoscut un procedeu de

obținere a unui produs cu acțiune imunostimulatoare din plante, ce constă în aceea că supernatantul (obținut prin epuizarea făinii de porumb integrale, în amestec cu apă, la temperatura de 50°C, timp de 1... 3 h, filtrare), se lasă la temperatura de 25... 30°C, timp de 6... 8 săptămâni, la *p*H 6,5... 7, după care se filtrează și depozitul obținut se concentrează până la obținerea unui reziduu moale, care se tratează cu etanol 80°, după care se înlătură alcoolul prin încălzire până la obținerea unui extract de culoare brun-închis și de consistență semifluidă. În perioada de extracție, de 6... 8 săptămâni, se efectuează o agitare la interval de 5... 7 zile. Făina de porumb integrală este preferabil să provină din porumb însilozat, cu prezența unei microflore specifice, care este predominant anaerobă.

Pentru o mai bună înțelegere a invenției, se dă în continuare explicarea prescurtărilor și a semnelor care sunt folosite în descriere.

LD = Low-Dalton (cu moleculă mică, de maxim 3000 D)

HD = High-Dalton (cu moleculă mare, de peste 3000 D)

P = lanțuri de polizaharide, legate nativ de unități de lignină, respectiv cu polizaharide ca membrii intermediari între lignină și celuloză.

L = unități de lignină (native), în toate variantele naturale.

LD-L = unități de lignină Low-Dalton, maxim 3000 G.

HD-L = unități de lignină High-Dalton

PLP = unități de lignină bogate în zahăr (cum ar fi de exemplu polizaharide/polioze), așa cum sunt extrase din făină de lemn, cu apă la *p*H alcalin, și de asemenea mai există variantele obținute prin biosinteza lemnului.

LPL = unități lignoide care sunt sărace în zahăr, în forma în care sunt extrase din produsele încarbonizate cu xilen, cum ar fi de exemplu lignit, cărbune de colorare (până la cărbune natural), prin medii alcaline polare (apoase), precum și altele, dar care prin procesul de încarbonizare sunt puternic sărăcite în purtători de energie de tipul polizaharidelor (cum

ar fi descompunerea microbinaă înainte de încarbonizare și altele asemănătoare).

LD(L-PL) = unități lignoide sărace în zahăr, așa cum sunt extrase în procesele de încarbonizare, prin medii alcaline apoase și altele, dar care prin procesul de încarbonizare sunt puternic sărăcite în purtători de energie și care sunt de tipul polizaharidelor cu greutate moleculară mică, care sunt solubile în apă la un *p*H sub 7,0.

LD(PLD) = fracțiunea Low-Dalton, din unități de lignină bogate în zahăr (așa cum s-a arătat msi sus)

HD(LDP=PLP) = produs de reacție dintre unitățile LD din unitățile bogate în zahăr și unitățile LD din unitățile L care sunt sărace în zahăr.

LD(PLD=LPD) = fracțiunea Low-Dalton a produsului de reacțiede mai sus, care se pretează la aplicare biologică, în conformitate cu prezenta invenție.

Procedeul de obținere a grupei de substanțe active, în conformitate cu prezenta invenție, se efectuează în trei etape: I) prepararea de unități de lignină bogate în polizaharide (PLP), prin extracție din lemn sau materiale lemnoase și/sau din culturi celulare vegetale (A) în mediu apos, în condiții slab acide sau alcaline, și separarea părților componente solide insolubile; II) prepararea de unități lignoide sărace în polizaharide (LPD) cu masă moleculară mică, prin extracția alcalină apoasă la *p*H= 7... 14, din produse de carbonizare a lemnului sau materiale lemnoase biconvertite (B), și apoi separarea părților componente solide insolubile în alcalii, și III) prepararea unui produs de reacție solubil în apă LD(PLP=LPL) cu greutate moleculară mică (LD) din produsele din etapele I) și II), prin reacționarea produsului din etapa I), a unităților de lignină bogate în polizaharide (PLP) cu produsele din treapta II), cu unitățile lignoide de sărace în polizaharide (LPL) cu produsele din treapta II), cu unități lignoide sărace în polizaharide (LPL) în condiții alcaline apoase la *p*H 9... 12; izolarea fracțiunilor LD ale acestui produs de reacție HD(PLP=LPL) prin ultrafiltrare la valori nominale ale secțiunii de separare de aproximativ 15 până la 40 kD, și eliminând reziduul, după care urmează tratarea soluției cu schimbători de cationi H^+ la *p*H 3 până la 7,0 și prelucrarea în continuare a soluției acide a grupei de substanțe active LD(LPL=PLP).

În treapta I) se prepară unități de lignină bogate în polizaharide HD(PLP) cu mai puțin de 100 kD; se ajustează valoarea *p*H-ului între neutru și slab acid, după extracții în medii apoase și separarea componentelor solide insolubile, urmată de o filtrare moleculară de preferință o ultrafiltrare la o valoare a secțiunii de separare mai mică decât 100 kD, de preferință,mai mică decât 70 kD și eliminarea reziduului, și se prelucrează în continuare soluția astfel obținută în trepata III).

În treapta a II) se obțin unități lignoide de LD-LPL cu masă moleculară mică, sărace în polizaharide, cu mai puțin de 40 kD, după cum urmează: după extracția alcalină și separarea componentelor solide insolubile în alcalii se efectuează o fragmentare alcalină la valori de *p*H mai mari de 8, și apoi o separare moleculară prin ultrafiltrare la secțiunea nominală de separare de 15 până la 35 kD, și produsul astfel obținut se prelucrează în treapta III). După reacționarea produselor bogate în polizaharide cu fracțiunile sărace în polizaharide cum ar fi de exemplu intermediarii din treptele I) și II) se efectuează, eventual, o separare a substanțelor solide și soluția rămasă se prelucrează în continuare. Prelucrarea, în continuare, a soluției acide LD(LPL=PLP) obținută în treapta III) are loc prin filtrarea particolelor, îndepărtarea pirogenilor prin filtrare, urmată de sperilizare precum și de o eventuală confecționare. Materialele lemnoase pentru extracția din treapta I) sunt alese din grupul care constă din: A1, cum ar fi lemn nativ; A2, cum ar fi substanțe analoage lemnului, de exemplu substanțe lemnoase produse biotehnologic prin prepararea (cultivarea) culturilor celulare vegetale; A3, cum ar fi substanțe sintetice analoage lemnului, de exemplu polimeri de dehidrogenare (DHP) din mono- și / sau dilignoli și grefare a DHP pe

polizaharide și A4, cum ar fi complecși de lignină-polizaharidă, adică reticulari, obținuți prin extracție alcalină din celuloză clorit din lemn, precum și amestecurile A1, A2, A3 și A4. Materialele inițiale utilizate în treapta II) sunt selectate din grupul care constă din: B1 cum ar fi produsele native de încarbonizare; B2, lemn bioconvertit prin microorganisme lignolitice active, de exemplu ciuperci albe de putrezire, cărbune bioconvertit și B3, cum ar fi lemn bioconvertit prin acțiunea unor enzime lignolice izolate ca fenoloxidaza sau amestecurile de B1, B2 și B3. Bazele folosite în prezentul procedeu sunt hidroxid de sodiu, hidroxid de potasiu, hidroxid de litiu și amoniac. Unitățile de lignină bogate în polizaharide (PLP) care sunt obținute în treapta I) sunt într-o concentrație de 0,05... 10 % în greutate, de preferință de circa până la 2% în greutate, și în special de preferință de circa 0,1 % în greutate. În treapta I), pentru obținerea produsului bogat în polizaharidă PLP, se efectuează o extragere la o valoare de *p*H de circa 12... 14, de preferință în mediu de hidroxid de potasiu, într-un interval de 1... 10 zile și la temperatura camerei de 20°C. Produsul de extracție PLP se obține prin extracție la temperatură ridicată până la 120°C, de preferință la temperaturi de peste circa 100°C în autoclavă. Produsele de încarbonizare a lemnului sunt alese din grupa care constă din ligniți, cărbuni coloranți sau cărbune brun. Extracția alcalină are loc cu soluție de hidroxid de potasiu 0,1... 0,8 M, de preferință 0,4 M și la temperatura camerei. Fragmentarea alcalină are loc pe o perioadă de 7 până la 10 zile, la *p*H 11, în mediu de hidroxid de potasiu și la temperatura camerei. Transformarea la produsul PLP=LPL din treapta II) are loc la o temperatură între temperatura camerei și 120°C, la o valoare a *p*H-ului de 8... 14, de preferință 10... 12. Produsul din treapta III) LD(PLP=LPL) se supune unei separări moleculare pentru obținerea unei fracțiuni LD, de preferință prin intermediul unei ultrafiltrări la presiune scăzută pe membrane de ultrafiltrare rezistente la alcalii, cu o secțiune de separare nominală de 18... 38 kD. Produsul din trepata III) LD(PLP=LPL) se supune unui schimb de ioni alcalini printr-un schimbător de cationi din rășina sintetică, sub formă de hidrogen, până la atingerea unei valori stabile a *p*H-ului, în intervalul de la 4 la 6,8, de preferință 5 până la 6. Produsul acid al treptei III) este eliberat de pirogeni prin filtrare, după tratamentul de schimb ionic, și apoi se sterilizează prin tratare în autoclavă, de exemplu la temperatura de 121°C pe o perioadă de 14 minute.

Preparatele farmaceutice care conțin grupa de substanțe active obținute în conformitate cu procedeul descis mai sus, sunt constituite din soluția apoasă a produsului de reacție din treapta III), LD(PLP=LPL) care se prelucrează în sine cunoscut, prin asocierea cu substanțe auxiliare inactive în vederea obținerii unui preparat farmaceutic fluid în concordanță și cu alte forme de administrare, cum ar fi fiole injectabile. Aceste produse farmaceutice sunt administrate pentru combaterea infecțiilor virale, și se administrează prin aplicarea locală sau parenterală. Se administrează pentru combaterea retrovirușilor, mai ales de tipul HIV și virusi SIDA. Aceste preparate farmaceutice prezintă Pt, Au, Pd chelatizați.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- prin adăugarea grupei de substanțe active, care au fost obținute în conformitate cu prezenta invenție, în cultura de celule infectate cu HIV (limfocite umane), așa cum rezultă din testul de mai jos, se ajunge în domeniul concentrațiilor ne-citotoxice la o inhibare semnificativă a formării synctiilor "activitate anti-HIV ";
- la sisteme de culturi celulare din neuroni centrali (din hipocampus, respectiv cortex) se ajunge în condiții de testare definite, atât la neuronii predistruși la care s-au provocat stricăciuni suplimentare artificiale în prealabil cât și la neuronii cărora nu li s-au adus stricăciuni prealabile suplimentare, la o creștere semnificativă de capacitate de supraviețuire, ceea ce din punct de vedere biologic reprezintă o inhibare a unor procese escalative (acțiunea de flancare restitutivă);

- dat fiind că neuronii sunt în mod evident un organ de predilecție pentru HIV, dar și pentru virusi convenționali (in situ, la pacient), această proprietate are o importanță curativă deosebită;

- testele orientative din domeniul de specialitate, cum ar fi de exemplu al cercetării de bază a bolii Parkinson, au arătat că este între altele foarte probabil ca grupa de substanțe active care au fost obținute în conformitate cu prezenta invenție, să prezinte capacitatea de trecere prin bariera sânge-creier;

- la o medicație pe termen lung (pe o perioadă de ani), nu apare nici o sensibilizare nedorită, deci lipsește orice reacție generală negativă asupra medicației, cum ar fi febra reactivă și altele asemănătoare, iar hemograma nu este influențată de medicație în sensul că aceasta nu se înrăutățește;

- la îmbolnăvirile provocate de infectare cu virusii convenționali (cum ar fi influența, vărsat de vânt etc), se ajunge la o restituție rapidă și completă cu normalizarea temperaturii, fără efecte secundare nedorite asupra circulației;

- dat fiind, că este vorba de o substanță activă ne-proteică, aceasta nu acționează nici ca co-antigen, nici ca substanță excitantă să producă febră.

Se dau, în continuare, 10 exemple de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1... 6, care reprezintă:

- fig.1a., schemă de preparare pentru o grupă de substanțe active, în conformitate cu prezenta invenție:

- fig.1b., altă schemă de preparare pentru o grupă de substanțe active, în conformitate cu prezenta invenție;

- fig.1c., altă variantă pentru prepararea unei grupe de substanțe active, în cofnormitate cu prezenta invenție;

- fig 2a, 2e. - spectre de fluorescență pentru soluțiile grupei de substanțe active, respectiv precursorul acestuia, în conformitate cu exemplul 1 de realizare (în apă);

- fig.3., un spectru C 13 al unei grupe de substanțe active;

- fig.4., reprezentarea grafică a activității LDH, în culturi de cortex la șobolani, sub lipsă de glucoză;

- fig.5., reprezentarea grafică a testului vital cu neuroni de hipocampus, după o perioadă de 48 ore <u>în vitro</u>;

- fig.6., schița măsurării extincției, în funcție de durata de iradiere a soluției de substanță activă.

Exemplul 1. *Prepararea unei grupe de substanțe active în conformitate cu prezenta invenție.*

Treapta I

Prepararea fracțiunii de lignină bogată în zahăr (PLP).

Pentru aceasta 300 g de lemn din miez de buștean măcinat, din larice siberiană (*Larix sibirfiaca)* se dispersează (ca lemn măcinat) în 6000 ml apă demineralizată și sub agitare, după care se adaugă 150 g de hidroxid de potasiu. Acest amestec se menține, sub agitare continuă și timp de 3 zile, la temperatura de 46°C până la 66°C (încălzirea este dielectrică și intermitentă). În continuare, substanțele solide se separă pe un filtru Nutsche, reziduul se aruncă, iar filtratul se centrifughează în condiții de curățenie și se reglează încet la un *p*H 11,5, prin adăugarea, în porțiuni mici, a unui schimbător de ioni din rășină sintetică (Amberlite IR 120), foarte acid sub formă de hidrogen, care a fost reactivat proaspăt, sub controlul permenent al *p*H-ului, peste un electrod de sticlă calibrat. Schimbătorul de ioni se separă și se aruncă. Soluția curată este clară, de culoare galbenă-aurie se separă prin separare moleculară cu ajutorul ultrafiltrării pe membrane de ultrafiltrare rezistente la alcalii care au o secțiune nominală de separare de 100 000 Daltoni, pentru îndepărtarea substanțelor și particolelor pirogene. Din această soluție, de matrice de culaore galbenă, se ia o probă de 20 ul, se diluează într-o cuvetă de cuarț(1 cm) cu 3 ml apă pentru determinări spectrale, se amestecă și se citesc o serie de spectre de excitație prin fluorescență la lungimile de undă 450 nm, 490 nm și 520 nm. Fluorimetrul se reglează în ceea ce privește sensibilitatea, în așa fel încât emisia de fluorescență relativă să fie la lungimea de undă de 450 nm la 100 sau

în apropiere de aceasta. Se înregistrează, apoi, spectrul de excitație la 450 nm (înregistrator 2 cm/minut, viteza de înaintare a lungimilor de undă de excitare 100 nm/min, și utilizând un aparat de tip SFM-23).

Pentru control, se înregistrează și spectrul de excitare la 490 nm, și de asemenea la 520 nm. S-a obținut o soluție galbenă a matricei PLP.

Treapta II

Obținerea fracțiunii de lignoid săracă în zahăr (LPL).

Pentru aceasta, 600 g dintr-un lignit fin măcinat, se dispersează la temperatura camerei (circa 20°C) în 10000 ml dintr-o soluție de hidroxid de potasiu în concentrație de 1,68 %, și se agită continuu. Se dizolvă parțial, și după 9 h, se separă într-o centrifugă rapidă de substanțele solide, după care sedimentul se aruncă. După o perioadă de 24 ore, se realizează încă o separare de substanță solidă, prin utilizarea unei centrifuge rapide, după care substanța solidă se aruncă. După o fragmentare alcalină, timp de 5 zile și al temperatura de 20°C, se supune încă odată (centrifugatul obținut până acum) la o separare a substanței solide prin separare moleculară printr-o instalație de ultrafiltrare cu membrane de ultrafiltrare care sunt rezistente la alcalii, și cu secțiunea de separare nominală de 30.000 Daltoni. Ultrafiltratul se întrerupe după obținerea a 6,7 litri de filtrat. Ultrafiltratul obținut se reglează la o valoarea a a *p*H-ului de 5,5 cu un schimbător de ioni foarte acid, care este proaspăt activat (Amberlite IR 120) sub controlul unui electrod din sticlă calibrat. Această soluție care este slab acidă, se filtrează imediat pentru separarea substanțelor pirogene, pe un ultrafiltru. În continuare se efectuează o sterilizare termică în autoclavă la temperatura de 121°C și timp de 15 minute. Pentru determinarea de substanță solidă, se recoltează probe și se concentrează la temperatura de 85°C până la greutate constantă (radiator infraroșu). Ultrafiltratul astfel obținut, se folosește ca LPL(după reglarea la concentrația dorită), respectiv fracțiunea lignoidă săracă în zahăr (LPL) pentru reacția cu produsul din treapta I), așa cum s-a arătat mai sus.

În cele ce urmează se comentează spectrul C 13 al fracțiunii LPL folosite (produsul din treapta II), utilizând spectre 13C-NMR.

Pe baza spectrului 13C-NMR, se deosebește această probă mai ales prin numărul ei ridicat de grupe carboxil din lignina naturală, care se indică printr-un multiplet mediu la circa 168-180 ppm. În acest caz atomii printr-un multiplet mediu la circa 168-180 ppm. În acest caz atomii de C-carboxil, pe baza efectelor de nucleu care lipsesc și a acțiunilor de schimb cu nuclee legate direct de hidrogen, mai dau semnale deosebit de slabe, astfel concentrația lor ar trebui să fie mai ridicată decât intensitatea relativă a semnalelor lor. Un lucru corespunzător este valabil și pentru atomii de C-alfa-carbonil, care adsorb în zona 190,5... 198, și care arată totuși intensități mai slabe. Singuletul ascuțit la 158,2 ppm se poate repartiza cel mai bine atomul de carbon 4 din grupele p-hidroxifenil (pentru a nota atomii de carbon), așa cum rezultă din literatura de specialitate. Deoarece, măsurătorile substanțelor model corespunzătoare au fost efectuate în hexadeuteroacetonă ca solvent și cu un standard intern (așa cum este cunoscut din literatura de specialitate), ar trebui luate în considerare eventual și atomii mai probabili 3 și 5 din resturile de siringil pentru acest semnal.

Multipletul larg (7) în zona la 93 - 145 ppm, trebuie să fie repartizat atomilor de carbon 1,2,5 și 6 în restul de guaicil precum și 1,2,4 și 6 în resturile de siringil. Dizolvarea defectuoasă a spectrului în această zonă arată condensări puternice în lignină, care rezultă din pretratarea ei.

În zona atomilor de carbon alifatici, se pot repartiza semnalele (8), (9) și (15) ca semnale tipice de lignină, a legăturilor aril-glicerină-beta-arileter, care reprezintă tipul cel mai important de legătură în toate ligninurile. Totuși, și aici există o nesiguranță pentru repartizare din solvent și din standardul extern. Semnalul relativ slab

de metoxil la 58,6 ppm arată o dezmetoxilare parțială pe timpul pre-tratării probei. Semnalele care apar în acest interval bine structurate (10), (11) și (12) nu se găsesc în spectrele tipice de lignină (așa cum rezultă și din literatura de specialitate, din domeniu), și arată componente condensate de hidrați de carbon.

Este greu de explicat și multipletul lat (17), în zona la circa 0... 55 ppm. Aici ar trebui să absoarbă, de preferință, atomi de carbon alifatici, care nu sunt legați direct la oxigen. În lignină există foarte puțini atomi de acest fel, de exemplu atomi de C-beta în unitățile de pinorezinol și atomi de C-alfa în unitățile dibenzil-tetrahidrofuran (așa cum rezultă din literatura de specialitate). De aceea, se pare, că în timpul tratării oxidative sau a altor pretratări, s-au format asemenea atomi de carbon din lignină (de exemplu în CO-CH_3, -CHOH-CH_3 sau -CH_2-C) sau la prepararea ligninei din lemn.

În rezumat, se poate spune că la proba existentă este vorba de o lignină foarte modificată structural, a cărui caracter de lignină nu se mai poate demonstra. Repartizarea semnelelor este mai dificilă, prin utilizarea D_2O ca solvent, deoarece nu este solubil în hexadeuteroacetonă, în care s-au măsurat ligninele de comparație (așa cum rezultă din literatura de specialitate). Prin utilizarea unui standard extern, în locul standardului intern, se pot influența în mică măsură deplasările chimice, prin care pot apare deosebiri în deplasările chimice de circa 2 ppm. Aceste date sunt arătate în tabelul care urmează.

Deplasări ^{13}C-chimice în ppm de TMS ca standard exern, reluat în D_2O cu un spectrometru Varian XL-100-15

Nr.	**Delta (ppm)**	**Intensitatea**	**Repartiția** X)
(I)	(II)	(III)	(IV)
(1)	190,5-198	multiplet slab	grupe de alfa-carbonil si aldehidă cinamică
(2)	168-180	multiplet mediu	grupe de carboxil
(3)	164,0	slab	
(4)	158,2	singulet puternic	C-4 în p-hidroxifenil (C-3/5 în siringil) C-4 în guaiacil
(5)	150,5	slab	
(6)	148,5	slab	C-3 în guaiacil
(7)	93-145	multiplet lat	C-1/2/5/6 în guaiacil și C-1/2/4/6 în siringil
(8)	88,4	slab	C-beta în arilglicerin-beta arileteri
(9)	70,0	mediu	C-alfa în arilglicerin-beta arileteri
(10)	67,9	mediu	
(11)	67,4	mediu	
(12)	66,2	slab	
(13)	64,8	puternic	C-gama în fenilcumarani și C-gama și C-beta în unități beta-1-dilignol
(14)	63,8	mediu	C-gama în alcooli cinamici și arilglicerin-beta-arileteri cu alfa-carbonil
(15)	60,7	mediu	C-gama în arilglicerin-beta-arileteri
(16)	58,6	mediu	OCH_3
(17)	0-55	multiplet larg	atomi de C alifatici, de preferință nelegați la oxigen

X) - din literatura de specialitate (H.D. Ludemann și H.Nimz, Chimia macromoleculară 175, 2409, 1974).

Treapta III

Prin adaosul în trepte a fracțiunii de lignoid săracă în zahăr (LPL) în concentrație definită de 2 mg/ml, se înregistrează spectrul de excitație la 520 nm, în trepte de câte 5 µl adaos în cuveta de cuarț de capacitate de 3 ml (titrarea de fluorescență), până când, prin mărirea corespunzătoare a adaosului apare un vârf semnificativ de emisie la 465 nm, și emisia crește puternic în zona totală de lungimi de undă de emisie, iar la emisia de 394-396 nm crește cu o emisie relativă de 80 %. Se determină cantitatea necesară de fracțiune lignoidă săracă în zahăr (LPL) necesară prin adaosul de fracțiune lignoidă (LPL) în scopul acestei creșteri a fluorescenței (au fost de exemplu 10 ul din soluția de 0,2 %) și se înmulțește cu factorul 2,5.

Cantitatea de adaos astfel determinată, de fracțiune lignoidă, săracă în zahăr și care este în soluție (LPL) la soluția matricei, se determină apoi soluția de matrice care se află la dispoziție: de exemplu 5000 ml de soluție de concentrație 0,2 % de fracțiune săracă în zahăr (LPL); 120 µl matrice are nevoie de 10 µl soluție (LPL) de fracțiune lignoidă săracă în zahăr, deci după multiplicarea cu factorul 2,5 rezultă pentru 4000 ml matrice 2000 ori 2,5. Se amestecă intens, la temperatura de 45 până la 65°C, și după o reacție de 4 h la aceeași temperatură, se supune unei separări moleculare pe o instalație de ultrafiltrare cu membrană de ultrafiltrare rezistentă la alcalii și cu secțiunea nominală de separare de 30 kD, partera reținută se aruncă iar filtratul se prelucrează mai departe. Cu ajutorul unui schimbător de cationi foarte acid și sub formă de H^+, filtratul se reglează la un *p*H 5,5. și după filtrare pentru îndepărtarea pirogenilor, se sterilizează imediat pe cale termică. Din șarja obținută se scot probe pentru analiza biologică și analitică, după care se identifică prin spectroscopie cu fluorescență, se eliberează de substanțele pirogenice și apoi se condiționează în fiole pentru a fi folosite. Ca solvent, pentru condiționarea în fiole, și folosire pe cale parenterală se folosește o soluție sterilă de clorură de sodiu în concentrație de 0,9 %, care este folosită în mod curent în acest scop.

În fig.2c până la 2c, se arată mai întâi spectrle de excitație prin fluorescență la 450 nm, 490 nm la 520 nm lungime de undă de excitație a soluție PLP (grupa de substanțe A). Figurile 2d și 2e arată, după principiul de titrare prin excitație cu fluorescență la o lungime de undă de excitație de 520 nm, influența adaosului definit (în două trepte) de PLP, în trepte de 5 µl. Este hotărâtor apariția și înălțimea vârfului de emisie la 466 nm lungime de undă.

Pentru clarificare, schema de reacție este arătată încă odată în fig.nr.1.

În fig.1b. și 1c, sunt indicate modificările posibile ale acestui procedeu, așa cum eventual ar putea fi folosit.

Exemplul 2. *Obținerea unei grupe de substanța active în conformitate cu prezenta invenție*

Obținerea fracțiunii de lignină bogată în zahăr (PLP)

Pentru aceasta, 180 g miez de bușteau măcinat din Larex sibirfiaca, care este mărunțit la o mărime a particolelor de 0,05 până la 0,315 mm într-o moară pendulară și care înainte de extracție în mediu apos au fost eliberate prin extracție în mediu de etanol/benzen și mediu de etanol (standard TAPP T-12 m, 1959) și 120 g *Fagus sylvatica L* s-a prelucrat ca mai sus, în mod analog cu cele prezentate în cadrul exemplului 1 de realizare. Deoarece *Larix sibirifica* conține în lemnul său din miez arbogalactan (4 părți galactoză și o parte arabinoză), la fag există lanțuri de xilan care sunt încărcate cu acid oximetilglucuronic și L-arabinoză, prin care se modifică proprietățile produsului finit.

Amestecul de lemn, așa cum s-a arătat mai sus, se prelucrează în mod similar cu cele prezentate în cadrul exemplului 1, după care se realizează extracția cu hidroxid de potasiu în concentrație de 1M, în autoclavă pe o perioadă de 3,5 h și la temperatura de 121°C (așa cum se mai cunoaște și din literatura de specialitate).

Exemplul 3. *Obținerea unei grupe de substanțe active în conformitate cu invenția.*

(I) Obținerea fracțiunii de lignină bogată în zahăr (PLP).

Procesul de obținere a acestei fracțiuni s-a efectuat, în conformitate cu cele prezentate în cadrul exemplului 2.

(II) Obținerea fracțiunii lignoide sărace în zahăr (LPL). Această fracțiune s-a obținut din cărbune brun ecocen, care a fost pulverizat (în locul lignitului), așa cum s-a arătat în cadrul exemplului 1. În rest, prepararea a decurs, tot în conformitate cu exemplul 1 de realizare care a fost prezentat mai sus.

Exemplul 4. *Obținerea unei grupe de substanțe active în conformitate cu invenția.*

(I) Obținerea fracțiunii de lignină bogată în zahăr (PLP)

Pentru aceasta, 210 g lemn din miez de larice, 60 g lemn de miez de fag și 30 g lemn de coajă de fructe de *Prunus avium* s-au prelucrat așa cum s-a arătat în cadrul exemplului 2.

(II) Obținerea fracțiunii lignoide sărace în zahăr (LPL).

Pentru aceasta, cărbune brun miocenic, care a fost purificat de rășini, grăsimi și ceruri printr-un proces de extracție în Soxhlet cu benzen, a fost prelucrat mai departe ca în exemplul 1 de realizare.

Exemplul 5. *Obținerea unei grupe de substanțe active în conformitate cu invenția.*

(I) Obținerea fracțiunii de lignină bogată în zahăr (PLP)

Pentru aceasta, 210 g lemn de miez de larice, 90 g cărbune de sinteză (obținut așa cum este cunoscut din literatura de specialitate) au fost prelucrate pentru obținerea de PLP, așa cum s-a arătat în cadrul exemplului 2 de realizare. Mai departe, restul de prelucrare s-a realizat ca în cadrul exemplului 1 de realizare.

Exemplul 6. *Obținerea unei grupe de substanțe active în conformitate cu invenția.*

Un extract alcalin (A5) obținut din halogen-celuloză-clorit, și care a fost obținut din făină de lemn de fag (*Fagus sylvatica L*), delignificat cu $NaClO_2$ (cum se cunoaște din literatura de specialitate), și cu o soluție de hidroxid de potasiu de concentrație 4% (de asemenea cunoscut din literatura de specialitate), a fost supus unei separări a substanței solide, și a fost alimentat la începutul celei de a treia zi într-o cantitate de 900 ml (concentrație 0,12% conținut de substanță solidă, conținut de rest de lignină 2,3%) în soluție LPL din lignit (obținută ca în exemplul 1). Volumul soluției 2,1 % care are un *p*H de 11,4, a fost de 9100 ml. Timpul de fragmentare a fost de 9 zile. Soluția a fost prelucrată, mai departe, așa cum este prezentat în fig.1b., prin aceea că s-a realizat o separare a substanței solide, iar soluția rămasă a fost supusă unei filtrări moleculare prin ultrafiltrare pe membrane rezistente la alcalii cu limite nominale de secțiuni de separare de 18-38 kD și la o valoare a *p*H-ului de 8... 14. În continuare, soluția a fost acidulată prin utilizare de schimbători de ioni H^+ și a fost supusă unei filtrări aseptice pentru îndepărtarea particolelor pirogene. Filtratul obținut a fost sterilizat termic, la temperatura de 121°C în autoclavă, și în continuare a fost prelucrat așa cum s-a arătat în cadrul exemplului 1 de realizare.

Exemplul 7. *Obținerea unei grupe de substanțe active în cofnormitate cu invenția*

Treapta I.

Pentru aceasta, 100 g *Cortex Cinnamoni* care a fost măcinat, se extrag pe o perioadă de 6 zile cu 1000 g dintr-o soluție de hidroxid de potasiu în apă demineralizată, la temperatura de 60°C (în această fază *p*H-ul se reglează la valoarea de 8... 9, cu hidroxid de potasiu). Se menține o omogenizare a materialului în soluție, prin introducerea de oxigen. În continuare, substanțele solide au fost separate prin centrifugare, după care au fost înlăturate. Soluția de PLP, astfel obținută, a fost sterilizată termic în autoclavă, și apoi a fost lăsată să reacționeze imediat cu LPL din treapta II din exemplul 1, în condiții de mediu alcalin și la căldură. În continuare, prelucrarea s-a efectuat așa cum s-a arătat în cadrul exemplului 1 de

realizare. Această prelucrare, este explicată și în fig. 1c.

Exemplul 8. 600 g cărbune mărunțit (eocen), se descompune în mod identic ca produsul care a fost prezentat în cadrul exemplului 3, la temperatura camerei și în 10 litri de soluție ce conține 110 g hidroxid de potasiu și 60 g hidroxid de sodiu în apă demineralizată, pe o perioadă de peste 2 h până la 5 ore, și sub agitare în mediu alcalin. Înainte de dizolvarea hidroxizilor, se adaugă 20 g de cărbune activ care este divizat foarte fin și este în apă. Această parte de cărbune activ se separă cu partea de sediment, în faza de precentrifugare care urmează, ceea ce înseamnă deja o treaptă de purificare a produsului care este prevăzut pentru fragmentarea alcalină precentrifugarea se realizează în centrifuge de volum mare (în cazul că nu există acestea, precentrifugarea se face în centrifuge cu pahar, de exemplu la 4000 până la 5000 rot/minut) este necesară deoarece sedimentarea de substanță solidă (treapta următoare a procedeului) la acțiunea maximă a gravitației prin ultracentrifuge (și prin centrifuge rapide, cu cilindri de separare verticali la circa 40 000 rot/min) se oprește apoi imediat, când cantitatea sedimentului micșorează gradul de eficiență în cilindrul de limpezire, prin care orice producție industrială ar fi imposibilă. Precentrifugatul obținut se colectează, se tratează apoi cu 8 g de cărbune activ în 10 litri și apoi se supune unei ultracentrifugări atâta timp (în cazul necear în scurt circuit) până ce cilindrul de limpezire al ultracentrifugei rămâne practic curat și se pot recunoaște numai urmele cele mai minime ale unui sediment de felul lacului.

Acest produs prepurificat în mod intensiv (soluția brută de grupe de substanțe active), se depune la temperatura camerei și se lasă "să se autofragmenteze alcalin". Acest proces de fragmentare se urmărește prin măsurători continue ale valorii *p*H-ului. Ar trebui să se realizeze de cel puțin două ori, prin analiza probelor, o altă ultracentrifugare ca mai sus, pentru ca acele condensate care se formează de la fragmentare (și care nu sunt nedorite din punct de vedere farmacologic și nu au o stabilitate bună și o reactivitate moleculară) să se separe în mod continuu.

După autofragmentarea alcalină, deci după circa 9 zile, se realizează încă odată o limpezire foarte fină cu ajutorul ultracentrifugării, iar soluția (care este foarte alcalină) se supune prin ultrafiltrare la o secțiune de separare moleculară nominală de 30 000 Daltoni, la o fracționare blândă, așa încât la obținerea unei producții (așa cum s-a descris în exemplu) de 10 litri de ultrafiltrare când s-au obținut 74000 ml de ultrafiltrat, iar volumul de substanță reținută este de circa 2000 ml.

Substanța reținută se aruncă, instalația de ultrafiltrare se spală bine cu alcalii și filtratul se supune la treapta următoare de prelucrare. În continuare se realizează un contact al sărurilor alcaline ale ultrafiltratului cu schimbătorul de cationi din rășina sintetică foarte acidă (în forma extremă cu hidrogen) care este tot un proces și care are importanță pentru produsul finit.

Acidularea ultrafiltratului alcalin, de exemplu prin adaos de acid chiar și utilizarea de coloane de schimbători de ioni este complet neadecvată, deoarece de exemplu în ultimul caz coloana aderă ușor și se obține apoi un filtrat care nu se poate întrebuința.

În conformitate cu prezenta invenție, schimbul de cationi (schimbul ionilor de Na^+ și K^+ cu H^+) trebuie să fie realizat în șarje într-un vas de reacție iar procesul de dezionizare se măsoară continuu printr-un electrod de sticlă calibrat, în mod electronic.

Punctul care trebuie atins este o valoare a *p*H-ului de 5,1, și după atingerea unei valori se întrerupe imediat adaosul de schimbători de ioni. Această dezionizare ar trebui să se realizeze printr-o circulație constantă a produsului care este parțial alcalin, și prin formare de turbulență, respectiv printr-o pompă de circulație reglabilă care să evite formarea de zone cu concentrație ridicată de ioni.

Dat fiind că grupa de substanțe active nu s-a putut măsura mulțumitor până acum, metoda cea mai sigură pentru a se ajunge la grupe de substanțe active absolut identice din punct de vedere farmaceutic, este respectarea cu strictețe a celor mai mici trepte de reacție, așa cum au fost arătate în cadrul exemplului de realizare, în mod experimental.

Soluția de substanță activă supusă de acum înainte schimbării cationilor, se eliberează în mod cunoscut printr-un filtru steril de particole care ar putea să pătrundă în timpul contactului cu schimbătorul de ioni, și apoi se sterilizează imediat prin autoclavizare, de exemplu la temperatura de 121°C pe o perioadă de 20 min. Această grupă de substanțe active poate fi depozitată la temperatura de 4°C până la 20°C, timp de 18 luni și să se asigure stabilitatea, după care poate fi utilizată de exemplu la obținerea de soluții pentru injecții, utilizând ca solvent de exemplu soluție de clorură de sodiu de concentrație 0,9%.

Folosirea cărbunelui activ nu este o operație de purificare nespecifică, ci este o influențare a situației reacției în cursul fragmentării care a avut loc în acest scop. În principiu, ar trebui să se lucreze cu cărbune activ sub formă de pulbere p.a. Acest cărbune activ trebuie să îndeplinească unele valori a parametrilor, cum ar fi: valoarea *p*H-ului de 4,0... 7,0 (a unei soluții 5% în apă, la temperatura de 20°C și filtrat); capacitate de adsorbție a albastrului de metilen mai mare decât 12 ml/0,1 g (la soluție 0,15%). Este esențială funcția variată a cărbunelui activ, de exemplu prin conținutul în oxizi de suprafață care pot conferi cărbunelui activ proprietăți bazice sau acide. Deși suprafețele curate ale cărbunelui sunt hidrofobe, oxizii de suprafață formează totuși în situ, zone hidrofile astfel că cărbunele activ poate fi udat de apă și astfel preia o influență asupra situației reacției în timpul fragmentării. Apoi, mai este importantă repartizarea granulometrică a cărbunelui activ, de exemplu circa 50 % să fie format din particule care să fie mai mici decât 40 microni. La această distribuție granulometrică, adausurile la cărbunele activ se pot separa tehnologic în condiții curate, fără folosirea de agenți ajutători pentru filtrare.

Exemplul 9. Produsul care este prezentat în exemplul 8 de realizare, în "principiul unuia sau mai multor ioni", care a fost eliberat deja de particolele de sedimente prin ultrafiltrare, se încălzește un timp scurt cu ajutorul microundelor la temperatura de 46°C și apoi se lasă să se răcească până la temperatura camerei. Amestecul alcalin de produs se prelucrează mai departe, după o purificare foarte fină, cu ajutorul ultracentrifugării (pentru amănunte, a se vedea exemplul 8).

Grupa de substanțe active se modifică, printr-o modificare fizică forțată a proceselor fragmentării.

Exemplul 10. În urma cercetărilor fotometrice ale reacției, s-a dovedit că substanțele terapeutice obținute în conformitate cu prezenta invenție, de exemplu cu exemplul 8 de realizare, trebuie modificate intensiv prin activarea cu fotoni la 388... 378 nm,. La această transformare a reacției pentru substanță, în domeniul unităților captatori de fotoni ai grupei de substanțe active, se ajunge la procese în sensul fotocromiei. Prin aceasta se înțeleg reacții fotochimice reversibile, la care substanța A trece într-o altă formă (conformație) sau compusul B trece această reacție într-un sens sau în cel contrariu, se declanșează prin adsorbție de lumină UV sau din spectru vizibil. Substanțele terapeutice au fost influențate atât cu lungimea de undă 388 nm, până ce sub controlul extincției de exemplu după 90 min, se ajunge la un maxim de extincție. Se poate folosi radiația monocromatică 388 nm într-un fotometru cu două radiații, în același timp ca radiația de măsurare și să înregistreze (cum este arătat în fig.6.), o lungime a benzii, de exemplu 5 nm.

Pe lângă măsurarea maximului de extincție (vezi fig.6) se poate determina suplimentar, prin măsurarea fluorescenței, modulația conformației (înregistrarea spectrului de excitare). Prin influențarea fotocromă a grupei de substanțe active se

ajunge în toate zonele a spectrofluometriei de excitare la o formă a curbei, care este mult diferită față de cea a curbei nule. Aceste sisteme induse de UV influențează acțiunea chemoterapeutică in situ, și respectiv *in vivo*. Această soluție de substanță activă, este folosită în experiența clinică nu numai la tratarea SIDA, ci și la limfomul celulei T, putând fi folosită și la influențarea limfocitelor T. Se cunoaște că prin activarea UV a 8-MOP, care constă dintr-un inel de furan și cumarină, se poate influența CTCL. Cheltuiala este însă foarte ridicată (leucafereză) pe când la compusul activat UV care este obținut în conformitate cu prezenta invenție, este necesar să se efectueze o medicație parenterală obișnuită.

În general trebuie să se constate, că condițiile de extracție a lemnului au o influență mare asupra structurii moleculare a unităților de lignină-polizaharidă solubile. Structura moleculară a matricei depinde în acest caz, în mod diferit, de materialul inițial, deci dacă se utilizează paie sau ierburi sau lemn de miez de buștean al unui copac. Pentru a se evita agenții de protecție ai plantelor, trebuie să se folosească copaci vechi. În acest caz este hotărâtoare natura lemnului (de conifere, de foioase) și de asemenea materialul inițial, adică partea din plantă care este folosită (coajă de nuc, sâmburi de piersică, părți de lemn moale; astfel legătura dintre P și L la coaja de nuc este mai puternică decât, de exemplu, la un lemn moale).

Pentru produs, mai este esențial și metoda de exctracție a rețelei LD-PLP, și pentru aceasta se pretează mai ales metoda de extracție alcalină, tratamentul cu apă fierbinte/vapori de apă sub presiune (autoclave sau/și electroforeza cu clorură de sodiu, folosită ca electrolit.

Grupa de substanțe active, în conformitate cu prezenta invenție, conține foarte multe unități de structură din domeniul substanțelor naturale arene și hidrați de carbon.

Prin efectuarea mai multor teste, pe o perioadă de mai mulți ani, la pacienți au arătat că substanțele active în cantități terapeutice de 2 - 7 fiole de câte 2 mg/24 ore, pot întrerupe infecții grave de Influența (ca și infecții amestecate virale și bacteriene) într-un interval de 24 până la 48 ore, și fără să prezinte efecte secundare. Chiar și pacienții care sunt grav bolnavi de astmă, care au suferit infecții gripale grave, pot fi influențați prin administrarea a 10 mg/80 kg corp în așa fel încât să se poată evita o altă criză de astm.

În situația bronhospasmului la animalul supus experienței, se dovedește o acțiune sigură a dozelor atoxice (pe cale parenterală), în sensul unei inhibări a spasmului (inhibarea serotoninei și inhibarea sintezei prostaglandinei).

Grupa de substanțe active, obținute în conformitate cu prezenta invenție, se administrează parenteral și dozele curative, la pacienții ARC, sunt de 20... 40 mg/săptămână. Chiar și la o supradozare extremă, de exemplu 48 mg/24 h și repetată, nu se ajunge la perturbări acute și nici la perturbări cronice de natură locală sau sistemică.

Domeniile principale în care se indică folosirea substanței active obținută în cofnormitate cu prezenta invenție - fără însă să se intenționeze o limitare a acestora, sunt: infecții HIV, cazuri ARC cu infecții oportuniste, deteriorări ale celulelor prin infecții cronice cu virusuri în general, influențarea curativă a multirezistenței după caz a celulelor de cancer față de chemoterapia antitumorală, boli ale sistemului nervos central.

Produsul de reacție, obținut în conformitate cu prezenta invenție, (LPL= PLP) dezvoltă, conform cercetărilor efectuate, pe de o parte acțiune inhibitoare a virușilor iar pe de altă parte este lipsit de efecte secundare.

Un avantaj al grupei de substanțe active care prezintă lanțuri de zaharuri, în conformitate cu prezenta invenție, este că aceasta este o "ne-proteină" care nu deranjează apărarea imunologică față de substanțele albuminoase străine de corp, și de aceea se pretează pentru o medicație pe termen lung.

Se consideră că grupa de substanțe active, obținută în conformitate cu prezenta

invenție, împiedică fixarea sau atașarea unui virus, mai ales a unui virus HIV la o celulă gazdă. Aceasta este, cel mai probabil, o fracțiune glicoproteinică care (deoarece nu este proteină) nu declanșează o reacție imună în sens negativ. Aceasta acționează chiar pe sistemul de testare cel mai sensibil, pe o celulă izolată a creierului, ca "factor de supraviețuire".

În doze curative la om (de exemplu în doze de 0,10 mg/kg greutate corporală) grupa de substanțe active acționează și la o administrare de durată mai mare, și nu manifestă fenomene de sinsibilizare, este netoxică și prezintă efecte toxice. Grupa de substanțe de zone hidrofile care conferă o bună solubilitate în apă.

În rezumat, trebuie să se constate că grupa de substanțe active în conformitate cu prezenta invenție, pe baza structurii ei "neproteinice" și a faptului că nu prezintă toxicitate, se pretează la o administrare pe un termen lung.

Un avantaj deosebit al acestei grupe de substanțe active, este acela că se pretează și la protecția celulelor nervoase, în sensul unui factor de supraviețuire.

Un avantaj cu totlul deosebit al acestei grupe de substanțe active este diversitatea ai, ceea ce face să ofere întotdeauna cele mai diferite conformații ale acestei substanțe active și a distribuției pentru virus.

Se cunoaște că foarte mulți virusi, și mai ales virusul HIV, se modifică și se adaptează foarte repede, astfel încât o singură conformație nu mai este suficientă (eficientă) împotriva unui virus mutand.

Unitățile de gluco-lignină folosite, în conformitate cu prezenta invenție, sunt sisteme complicate de polizaharidă-poliozălignină, care pe baza diversității lor sterice și de distribuție a încărcăturii, pot satura glucoreceptorii cei mai diferiți. Grupa de substanțe active, în conformitate cu prezenta invenție, care este ne-proteinică (cu moleculă mică și solubilă în apă), constă în esență din unități de fenilpropan sărăcite pe lanțuri de zahăr (lanțuri de polizaharide), cu domenii chinoide (orto-, respectiv para-chinoică).

Domeniile moleculare lignoide, care au afinitate față de lanțurile laterale ale zahărului și sunt parțial sărăcite în mod stero-specific în glucomolecule, se găsesc în natură în așa numitele produse de încarbonizare; deci în cărbuni de culoare, ligniți, dar sub formă de urme și în cărbuni naturali. În cursul încarbonizării milenare s-a ajuns la o sărăcire în lanțuri de polizaharidă, respectiv polioze care formează legătura biologică dintre unitățile de lignină și celuloză. Acest lucru se întâmplă prin descompunerea microbiologică, transformările oxidative pe termen lung și altele, care duc la un produs de încarbonizare sărăcit în hidrați de carbon.

Mai departe există avantajul invenției, că sistemul de molecule are capacitatea de a pătrunde biologic prin membranele celulare, așa cum s-a demonstrat experimental in situ, măsurători la celule nervoase și celule ale ficatului.

Prin cercetări științifice s-a putut stabili, că acțiunea grupei de substanțe active este surprinzător de semnificativă pe culturi celulare infectate, și nu apar efecte secundare importante de natură toxică.

Ca urmare, această grupă de substanțe active se pretează la o medicație pe temen lung, și în această situație nu apare nici o pierdere a activității ei. De asemenea, poate fi folosită și în cazul când există suspiciune, fără să existe riscul că se poate combina cu substanțe active nespecifice fără probleme, precum și o acțiune restitutivă.

S-au efectuat diferite teste, asupra grupei de substanțe active care a fost obținută în conformitate cu prezenta invenție.

Teste al grupei de substanțe active obținute în conformitate cu exemplul 1 de realizare, asupra limfocitelor umane infectate cu virusul HIV.

Ca sistem de testare s-au folosit limfocite din sângele cordonului ombilical al unor nou născuți, care au fost preactivate timp de două zile cu 10 µg/ml fitohemaglutinină (PHA). Acest sistem de cultură celulară este un sistem limfocitar foarte sensibil și bun pentru cercetarea

HIV. S-au infectat circa 200.000 limfocite din sânge din cordon ombilical activate cu PHA în 1 ml culturi, în prezența substanței de testare cu HIV-2-izolat HIV-2ROD (concentrație finală de circa 200 unități care formează syncytien/ml). O valorificare microscopică, și la lumină, a culturilor infectate a avut loc în ziua a treia după infectare (cercetare asupra formării fuziunilor de celule induse cu virus, așa numitul syncytien).

Grupa de substanțe active s-a dizolvat în mediul de cultură, fără filtrare prealabilă. S-au testat concentrații de 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml, 20 ug/ml, 2 ug/ml și 0,2 ug/ml. S-au cercetat două șarje, și anume A88-1 și A88-4.

În tabelul care urmează, se pot vederea rezultatele testului șarjei A88-1 a exemplului 1 de realizare, în plăci găurite cu 24 găuri, asupra inhibării formării de syncytien.

Concentrație	**Valorificare microscopică la lumină, în ziua 3 - 4 după infectare**	
ug/ml	**Formare de syncytien**	**Suportabilitate**
200	-	colonii brune
100	-	colonii brune
50	-	colonii brune
20	+	colonii brune
2	++	colonii brune
0,2	++	colonii brune
Control	+++	

- fără formare de syncytien (1-10)
+ formări izolate de syncytien (10 - 50)
++ formare clară de syncytien (10 - 50)
+++ formare puternică de syncytien (peste 50).

În tabelul care urmează, se pot vedea rezultatele testului șarjei A88-4 în plăci cu 24 găuri, asupra inhibării formării de syncytien

Concentrație	**Valorificarea microscopică la lumină, în ziua 3 - 4 după infectare**	
ug/ml	Formarea de syncytien	Viabilitate
200	-	colonii brune
100	-	colonii brune
50	-	colonii brune
20	+	colonii brune
Control	+++	

Teste de valorificare a inhibiției formării de syncytien, cu șarja II.
Celule de destinație: limfocite periferice (PBL)
Virus: HIV - 2ROD, 10^5 SFU/ml, circa 1.500.000 cpm/ml/90 min.
Diluția finală folosită: 1:500

Rezultatele testului sunt arătate în tabelul care urmează.

Concentrație (µg/ml)	**Formare de syncytien, în ziua**		
	2	3	4
1	+	+	+
5	+	+	+
10	+/-	+/-	+/-
25	-	-	-
35	-	-	-
50	-	-	-
75	-	-	-x
100	-	-	-x
150	citotoxic		

X = citotoxicitate ușoară

Așa cum se poate vedea din tabelul de mai sus, se constată că această șarjă a fost eficientă la o concentrație peste 10 µg.

Test asupra activității anti-HIV a grupei de substanțe active (LABOR II).

Pentru efectuarea acestui test, o grupă de substanțe active obținute în conformitate cu prezenta invenție a fost cercetată in vitro, în două concentrații de 2 mg/ml și 16 mg/ml. În acest caz s-a examinat proteina HIV-core p24 prin utilizarea tehnicii "antigen-capture", după o infectare primară cu celule H9.

S-a utilizat drept substanță pozitivă (de control) acidul fosfonoformic și s-au cercetat diferite compoziții de AZT și ddC. În cadrul acestui test, ambele probe au arătat o activitate antivirală. Astfel, Labor II utilizează formarea de syncytien, după o infecție primară a celulelor MT-2 ca punct final.

Rezultatele testului sunt arătate în tabelele care urmează.

LABOR I

Concentrația substanței active ug/l	**% de inhibare ale p24**		
	Adaptogen 2 mg/ml	**Adaptogen 16 mg/ml**	**Foscarnet**
1	sub 30	30-50	
1	sub 30	50 - 75	
10			50 - 75
20	50 - 75	sub 75	
50			sub 75
100	sub 75	sub 75	toxic
500	toxic	sub 75	toxic
EC apreciat 50	15-20 µg/ml	1-2 µg/ml	sub 10 µg/ml

Controlul pozitiv: AZT și dideoxicitidina (DDC) au fost testate cu câte 1 - 10 ug/ml, și au arătat o inhibare de peste 75% a expresiei p24 fără citotoxicitate.

LABOR II

Concentrația substanței active µg/ml	**% de inhibare a formării de syncytien**	
	Adaptogen 2 mg/ml	**Adaptogen 16 mg/ml**
0,1	33	
0,16		14,5
1,0	50	
1,6		
10	82	
16		88
48		100
100	100	
160		100
500	toxic în oarecare măsură	
EC 50	1 µg/ml	1 µg/ml

Control pozitiv: ddA cu 0,25 (inhibare 90%) și 2,5 µg/ml (inhibare 100%)

Din cele prezentate mai sus, apare evident că grupa de substanțe active obținute în conformitate cu prezenta invenție, împiedică atacul virușilor HIV asupra celulelor. În doze curative, în concentrație de circa 0,1 mg/kg greutate corporală, această grupă de substanțe active acționează fără sensibilizare, și la o administrare pe o perioadă îndelungată, deci fără să prezinte efecte secundare sau toxicitate. Această grupă de substanțe active dispune de domenii hidrofile, care îi conferă o bună solubilitate în apă.

Bineînțeles că sunt posibile și alte modificări, care sunt cunoscute specialiștilor din domeniu, cum ar fi de exemplu introducerea altor monomeri pe suprafața unei matrice.

Ca urmare a celor arătate, această grupă de substanțe active obținute în conformitate cu prezenta invenție, se pretează pentru o medicație pe termen lung fără să prezinte o pierdere a eficacității: și se poate folosi fără să prezinte risc, și la cazurile care sunt numai bănuite de infecție. În general, grupa de substanțe active prezintă o acțiune restitutivă și se poate administra prin injecții, fără să prezinte probleme. Din cele arătate mai sus, și în urma testelor efectuate, rezultă că grupa de substanțe active poseda proprietăți antivirale semnificative.

Șir de teste I (dovedirea efectului de supraviețuire, fără încărcare adjuvantă celulară).

Grupa de substanțe active obținută în conformitate cu prezenta invenție posedă și proprietăți contra-escalative (restitutive), așa cum rezultă din cele ce urmează. Tulburările acute în

domeniul sistemului nervos central, cum ar fi de exemplu la șocuri, răniri ale creierului, ischemie, etc, sunt întovorășite de cele mai multe ori de degenerarea, respectiv de moartea celulelor neuronilor centrali. De asemenea există o serie mare de îmbolnăviri neurologice și neurovegetative ale sistemului nervos central, cum ar fi de exemplu Parkinson, sindromul Alzheimer, sindromul Korsakoff, care sunt caracterizate prin moartea unor populații selective de neuroni.

De aceea cercetarea morții celulelor respective, cum ar fi de exemplu supraviețuirea neuronilor centrali este de o mare importanță. În ultimii ani, cercetarea asupra factorilor neurotropi și asupra acțiunii de schimb a neuronilor s-a îmbogățit cu noi noțiuni ale condițiilor supraviețuirii neuronilor in vivo și in vitro. La acestea se adaugă și noile rezultate în ceea ce privește însemnătatea membran-lipidelor sub includerea ganglizidelor și fosfolipidelor, în ceea ce privește capacitatea de a trăi a celulelor nervoase arată că peroxizii, respectiv radicalii de oxigen pot juca un rol important pentru atacarea lipidelor membranei, astfel îmbunătățind capacitatea de supraviețuire, respectiv împiedicarea morții celulelor nervoase.

Materiale și metode.

I. Prepararea de cultură de neuroni Hippocamus.

Hipocampii unor embrioni de șobolan în vârstî de 17 zile se disociază, utilizând un tratament cu tripsină/EDTA și o foarfecă mecanică se plachează pe Coverslips acoperite cu polilisină. După o fază de aderare în ser 10%, celulele cresc într-un mediu definit, fără ser.

II. Testul de fluorescență.

Două substanțe colorante fluorescente se introduc, combinat, în cultură pentru a colora diferit celulele vii și celulele moarte. Dietatul de fluoresceină (FDA) se preia într-o treaptă preliminară nefluorescentă numai de către celulele vii, se scindează hidrolitic și astfel se transformă într-un compus fluorescent (fluoresceină). Bromura de ethidiu (EtBr= = numele liber internațional pentru 3,8-diamino-5-etil-6-fenilanthridiniu-bromură) rămâne exclus față de celulele vii și pătrunde numai în celulele moarte, unde reprezintă nucleu roșu de fluorescență.

Medii.

DMEM (mediu Eagles modificat Dulbeccos)

KKS (ser fetal de vițel), în concentrație de 10% în DMEM (și inactivat timp de ½ oră, la temperatura de 56°C)

HM (Hormon-Mix)

Insulină	$8,8x10^{-7}$ M
Transferrină	$1,1x10^{-8}$ M
Triiodotironină	$3x10^{-10}$ M
Hidrocortizon	$2x10^{-8}$ M

în DMEM

Concentrațiile de substanță activă, folosite sunt:

În fiole se găsesc 2 mg/ml soluție

Diluare cu DMEM		Concentrație finală în mediu (100 ul/2 ml)	
1:10	200 µg/ml	10 µg/ml	(1)
1:100	20 µg/ml	1 µg/ml	(2)
1:1000	2 µg/ml	100 ng/ml	(3)
1:10 000	200 ng/ml	10 ng/ml	(4)
1:100 000	20 ng/ml	1 ng/ml	(5)

Soluția se adaugă la celulele fixate în concentrațiile (1) - (5) după faza de fixare, în mediu. Testul vital se efectuează după 48 h. Din câte trei culturi, pentru fiecare condiție, se numără câte 15 câmpuri cu circa 50 neuroni/câmpi.

Rezultat.

Testul vital arată o influență pozitivă într-un domeniu de concentrație de circa 100 ng/ml mediu asupra supraviețurii neuronilor în cultură, în comparație cu cultura de control. La concentrația de 10 µg/ml se observă un efect ușor toxic.

La aprecierea efectului de supraviețuire, trebuie să aibă în vedere că celulele cresc în condiții optime, adică nu se poate aștepta o îmbunătățire esențială a supraviețurii. De aceea este adecvat să se realizeze experiențele în condiții suboptimale (șir de teste II).

Test vital Hipp, neuroni hipocampus, după 48 h *in vitro*.

Raport celule vii/celule moarte.

Sir de teste II. Influența asupra supraviețurii de neuroni, după deteriorare.

La înregistrări microcinematografice s-a observat, că celulele care au fost expuse în câmpul vizual al unei iluminări mai lungi la o lampă cu halogen, mor mai repede decât celulele care nu au fost expuse. La cercetarea acestei cauze, s-au găsit explicații din literatura de specialitate, și anume că mediile de cultură cu celulele care sunt expuse la lumina unor așa zise lămpi de zi (cu procentaj ridicat la lumina cu unde scurte), se formează fotoproduse letale. La iradierea cu triptofan, respectiv medii care conțin triptofan și riboflavină cu Uv apropiat (365 nm), se formează cantități toxice de H_2O_2 (așa cum rezultă din literatura de specialitate).

Peroxizii și radicalii de oxigen au legătură cu procesele de îmbătrânire ale celulelor precum și deteriorarea acestora, prin influențe toxice în câmp vizual (de exemplu ca urmare a hipotoxiei).

Stadiul următor cercetează influența substanței active asupra acestui efect de deteriorare a celulei, după iluminarea acesteia cu lumina unei lămpi de halogen.

Într-o încercare preliminară s-a determinat mai întâi durata de expunere la lumină, care duce la micșorarea vădită a supraviețuirii celulelor, dar care nu este complet letală. Ca metodă, s-a procedat astfel: neuronii din hippocampus de embrioni de șobolan (din ziua 17) au fost preparați, așa cum s-a descris mai sus. După o creștere de 3 până la 4 h în incubator, s-au scos cojile de cultură și apoi s-au expus unei iluminări. În continuare s-a adăugat substanța activă, în trei trepte de concentrație, cu mediu proaspăt de cultură, și în continuare s-a cultivat pe o perioadă de 20 de h. Supraviețuirea celulelor a fost determinată cu testul de fluorescență, care este un proces cunoscut în domeniu. Drept control, s-au folosit atât celule care au fost luminate cât și celule care nu au fost iluminate, cărora li s-au adăugat mediu proaspăt însă fără să conțină substanță activă, și în același moment.

Iluminarea.

S-a făcut cu o lampă de halogen 500 W cu reflector, la distanța de 40 cm(indice de expunere la locul cupelor Petri, care a fost măsurat este de 18,5), pe o durată de expunere de 20 minute. În timpul expunerii, capsulele cu cultură sunt în baia de apă, la o temperatură care este măsurată direct în mediu, și care nu depășește 34°C.

Rezultatul obținut este prezentat în fig.4., din care rezultă:

Celulele vii, în procente (supraviețuirea), după 24 h în cultură:

1) Supraviețuire, fără expunere la lumină, după 24 ore

2) După expunere la lumină, fără substanță activă

3) După expunere și după adaos de 1 µg/ml substanță activă

4) După expunere și după adaos de 0,1 µg/ml substanță activă

5) După expunere și după adaos de 0,01 µg/ml substanță activă

Se dovedește un efect clar asupra supraviețuirii neuronilor din cultură, în condițiile care au fost descrise, și iese în evidență că o concentrație de 1 ug/ml de substanță activă este suficientă, la care în condiții optime și după 48 h nu se observă un fenomen de supraviețuire. Este posibil, ca în condiții normale, un efect toxic ușor se suprapune acțiunea de protecție, care este preponderent după deteriorarea prin lumină.

Nu s-a soluționat până acum, care parte a spectrului este cea mai eficientă pentru efectele letale. Dar, s-a exclus presupunerea că mediul se încălzește prin lungimile de undă a spectrului luminii, și că eventual prin aceasta se deteriorează celulele.

Revendicări

1. Procedeu de obținere a grupei de substanțe active pentru chemoterapia restitutivă a bolilor virale infecțioase **caracterizat prin aceea că** cuprinde trei trepte:

I) prepararea de unități de lignină bogate în polizaharide (PLP), prin extracție din lemn sau materiale lemnoase și/sau din culturi celulare vegetale (A), în mediu apos, în condiții slab acide sau alcaline, și apoi separarea părților componente solide indolubile;

- II) prepararea de unități lignoide sărace în polizaharide (LPL) cu masă moleculară mică, prin extracție alcalină apoasă *p*H 7 - 14 din produse de carbonizare a lemnului sau materiale lemnoase bioconvertite (B) și apoi separarea părților componente solide insolubile în alcalii, și

III) prepararea unui produs de reacție solubil în apă LD (PLP=LPL) cu greutate moleculară mică (LD) din produsele din treapta I) și treapta II), prin reacționarea produsului obținut în treapta I), a unităților de lignină bogate în polizaharide (PLP) cu produsele din treapta II), cu unități lignoide sărace în polizaharide (LPL) în condiții alcaline apoase la *p*H 9 - 12, după care urmează izolarea fracțiunilor LD ale acestui produs de reacție HD(PLP = LPL) prin ultrafiltrare la valori nominale ale secțiunii de separare de aproximativ 15 până la 40 kD și eliminând reziduul; după care urmează tratarea soluției cu schimbători de cationi H^+ la *p*H 3 până la 7,0 și prelucrarea în continuare a soluției acide a grupei de substanțe active LD(LPL=PLP).

2. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în treapta I) se prepară unități de lignină bogate în polizaharide HD(PLP) cu mai puțin de 100 kD; se ajustează valoarea *p*H-ului între neutru până la slab acid, după extracția în medii apoase și separarea componentelor solide insolubile; urmată de o filtrare moleculară de preferință o ultrafiltrare la o valoare a secțiunii de separare mai mică decât 100 kD, de preferință mai mică decât 70 kD, și eliminarea reziduului, după care se prelucrează în continuare soluția astfel obținută în treapta III)

3. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în treapta II) se obțin unități lignoide LD-LPL cu masă moleculară mică, sărace în polizaharide, cu mai puțin decât circa 40 kD, după care urmează: după extracția alcalină apoasă și separarea componentelor solide insolubile în alcalii se efectuează o fragmentare alcalină la valori a *p*H-ului mai mari de 8 și apoi o separare moleculară prin ultrafiltrare

la secțiunea nominală de separare de 15 până la 35 kD și produsul astfel obținut se prelucrează în treapta III).

4. Procedeul, conform uneia dintre revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că**, eventual după reacționarea produselor bogate în polizaharide cu fracțiunile sărace în polizaharide cum ar fi de exemplu intermediarii din treptele I) și II) se efectuează o separare a substanțelor solide și soluția rămasă se prelucrează în continuare.

5. Procedeu, conform uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că** prelucrarea în continuare a soluției acide LD(LPL-PLP) obținută în treapta III) are loc prin filtrarea particolelor, îndepărtarea pirogenilor prin filtrare, urmată de sterilizare precum și de o eventuală prelucrare.

6. Procedeu, conform uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că** materialele lemnoase pentru extracție din treapta I) sunt alese din grupul constând din:

A1, cum ar fi lemn nativ;

A2, cum ar fi substanțe analoage lemnului, de exemplu substanțe lemnoase produse biotehnologic prin preparare (cultivarea) culturilor celulare vegetale;

A3, cum ar fi substanțe sintetice analoage lemnului, de exemplu procedeului de producere de polimeri de dehidrogenare (DHP) din mono- și/sau dilignoli și grefare a DHP de polizaharide, și

A4, cum ar fi complecși de lignină-polizaharidă (reticulari), obținuți prin extracția alcalină din celuloză clorit din lemn, precum și amestecuri de A1, A2, A3 și A4.

7. Procedeu, conform uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că** materialele inițiale utilizate în treapta II) sunt selectate din grupul constând din:

B1, cum ar fi produse native de încarbonizare;

B2, cum ar fi lemn biconvertit prin microorganisme lignolitice, de exemplu ciuperci albe de putrezire, cărbune bioconvertit;

B3, cum ar fi lemn bioconvertit prin acțiunea unor enzime lignolitice izolate (ca fenoloxidaza), sau amestecuri B1, B2, B3.

8. Procedeu, conform uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că** bazele sunt hidroxid de potasiu, hidroxid de sodiu, hidroxid de litiu și amoniac.

9. Procedeu, conform uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că** unitățile de lignină bogate în polizaharide (PLP obținute în treapta I) există într-o concentrație de 0,05... 10 % în greutate, de preferință de circa până la 2 % în greutate și în special de preferință de circa 0,1% în greutate.

10. Procedeu, conform uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că,** în treapta I), pentru obținerea produsului bogat în polizaharidă PLP, se efectuează o extragere la o valoare a *p*H-ului de circa 12 - 14, de preferință în hidroxid de potasiu pe o perioadă de 1 - 10 zile și la temperatura de 20°C.

11. Procedeu, cofnorm uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că** produsul de extracție PLP se obține prin extracție la temperatură ridicată până la 120°C, de preferință la temperaturi de peste circa 100°C și în autoclavă.

12. Procedeu, conform uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că** produsele de încarbonizare a lemnului sunt alese din grupa constând din ligniți, cărbuni colorați, cărbune brun.

13. Procedeu, conform uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că** extracția alcalină are loc în mediu de hidroxid de potasiu 0,1... 0,8 M, de preferință 0,4 M, la temperatura camerei.

14. Procedeu, conform uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că** fragmentarea alcalină are loc pe o perioadă de 7 zile până la 10 zile, la *p*H 11, cu hidroxid de potasiu și la temperatura camerei.

15. Procedeu, conform uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că** transformarea la produsul PLP=LPL din treapta III) are loc la o temperatură cuprinsă între temperatura camerei și 120°C, și la o valoare a *p*H-ului de 8... 14, de preferință 10 - 12.

16. Procedeu, conform uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că** aceea că produsul din treapta III) se supune unei separări moleculare pentru obținerea unei ultrafiltrări la presiune scăzută pe membrane de ultrafiltrare rezistente la alcalii cu o secțiune de separare nominală de 18 - 38 kD.

17. Procedeu, conform uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că** produsul din treapta III) LD(PLP=LPL) se supune unui schimb de ioni alcalini printr-un schimbător de cationi din rășină sintetică, sub formă de hidrogen, până la atingerea unei valori stabilite a *p*H-ului, în intervalul de la 4 la 6,8, și de preferință de 5 până la 6.

18. Procedeu, conform uneia din revendicările precedente, **caracterizat prin aceea că** produsul acid din treapta III) LD(PLP=LPL), după tratamentul de schimb cationic este eliberat de pirogeni prin filtrare și apoi se sterilizează prin tratare în autoclavă, de exemplu la temperatura de 121°C și timp de 14 minute.

19. Preparate farmaceutice care conțin grupe de substanțe active obținută în conformitate cu procedeul descris, **caracterizate prin aceea că** soluția apoasă a produsului de reacție obținut în treapta III), LD(PLP=LPL) se prelucrează în sine cunoscut, prin asociere cu substanțe inactive în vederea obținerii unui preparat farmaceutic lichid sau în concordanță cu alte forme de condiționare a produsului, cum ar fi de exemplu fiole injectabile.

20. Preparate farmaceutice, conform revendicării 19, **caracterizate prin aceea că** se administrează pentru combaterea infecțiilor virale, prin aplicare parenterală sau locală.

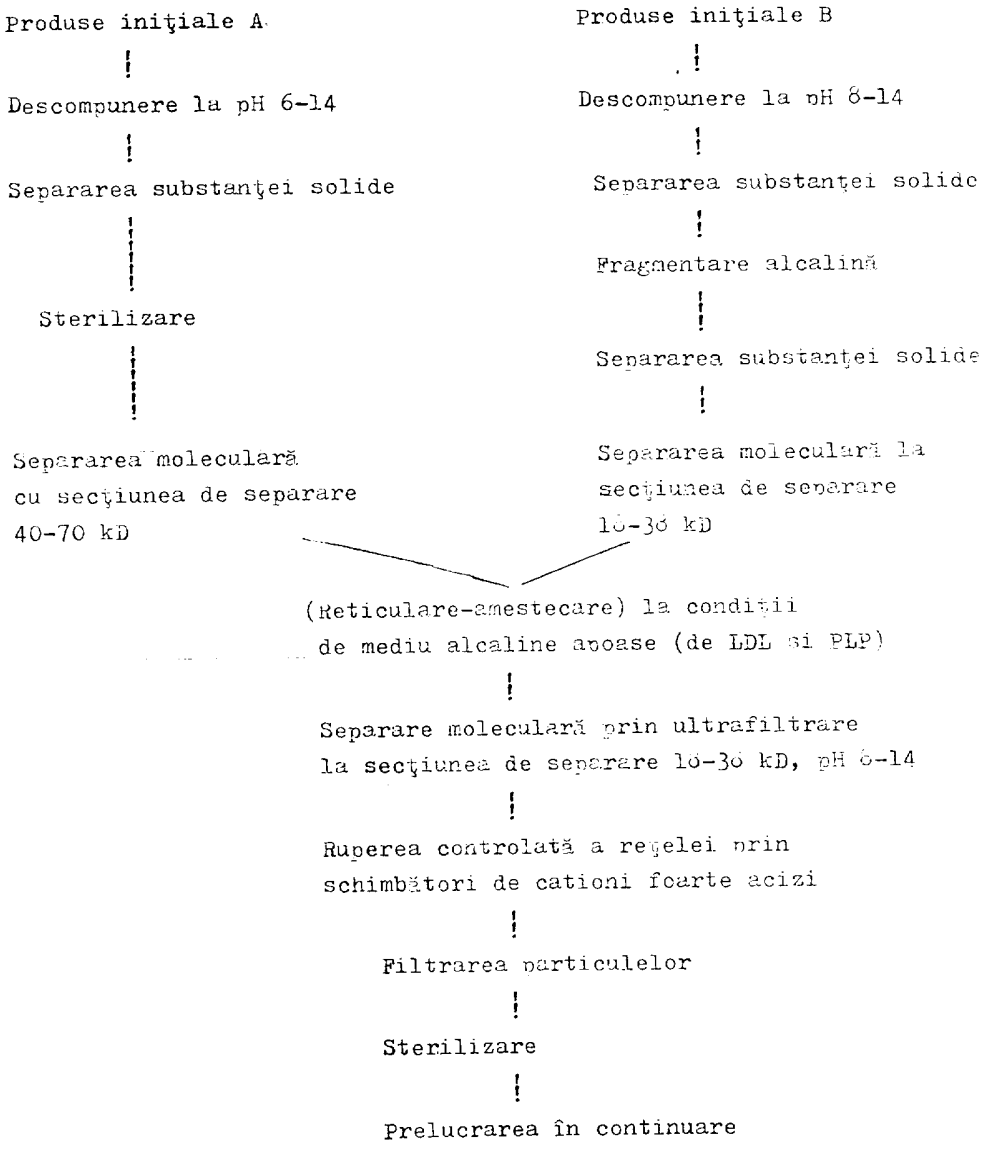
21. Preparate farmaceutice, conform revendicării 19, **caracterizate prin aceea că** se administrează pentru combaterea retrovirușilor, mai ales de tipul HIV și virusi SIDA.

22. Preparate farmaceutice, conform revendicării 19, **caracterizate prin aceea că** prezintă Pt, Au, Pd chelatizați.

Președintele comisiei de examinare: **chim. Mariela Hăulică**
Examinator: **farm. Pentelescu Elena**

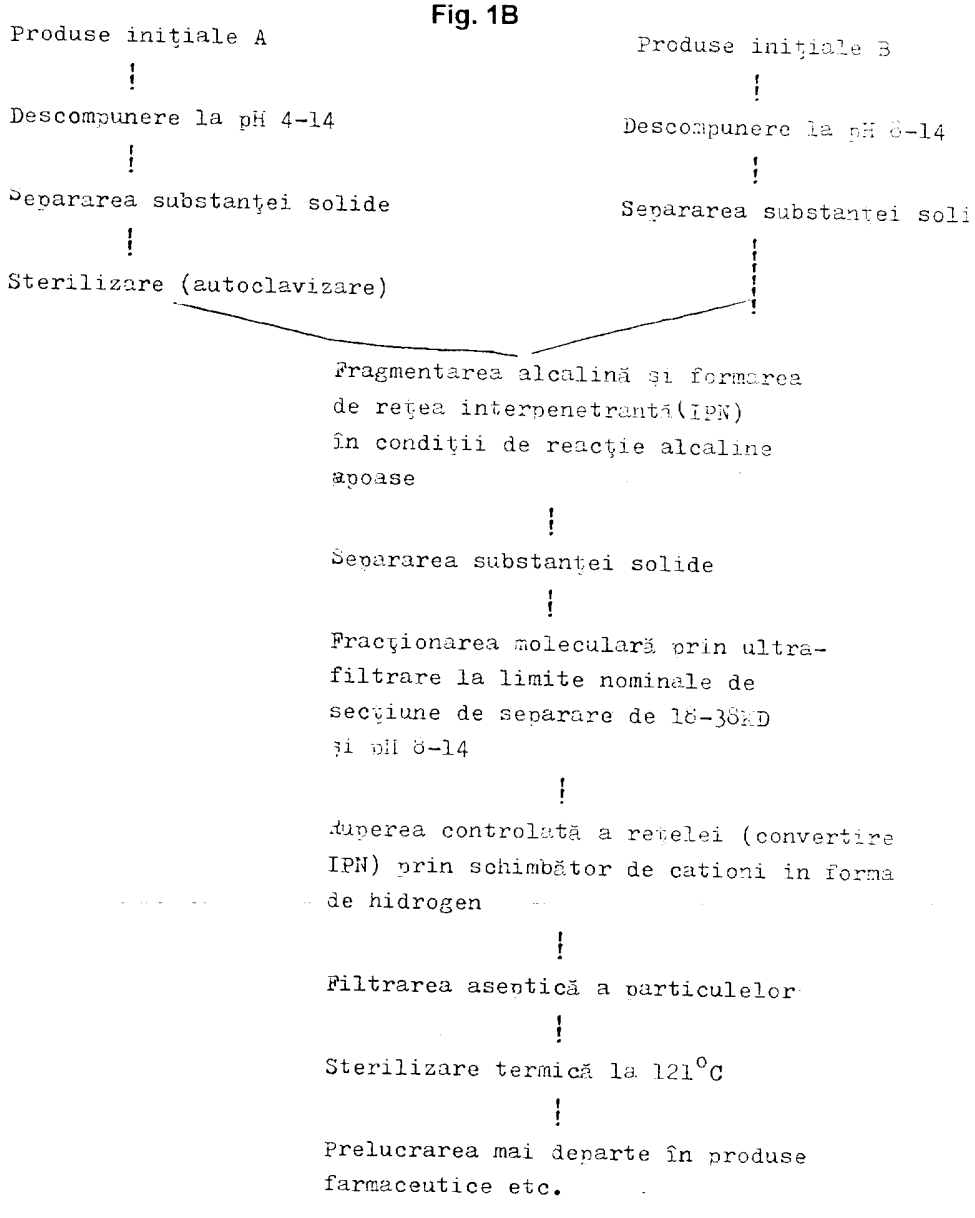
(51) Int.Cl.[6] A 61 K 35/78;
A 61 K 35/10;

Fig. 1A



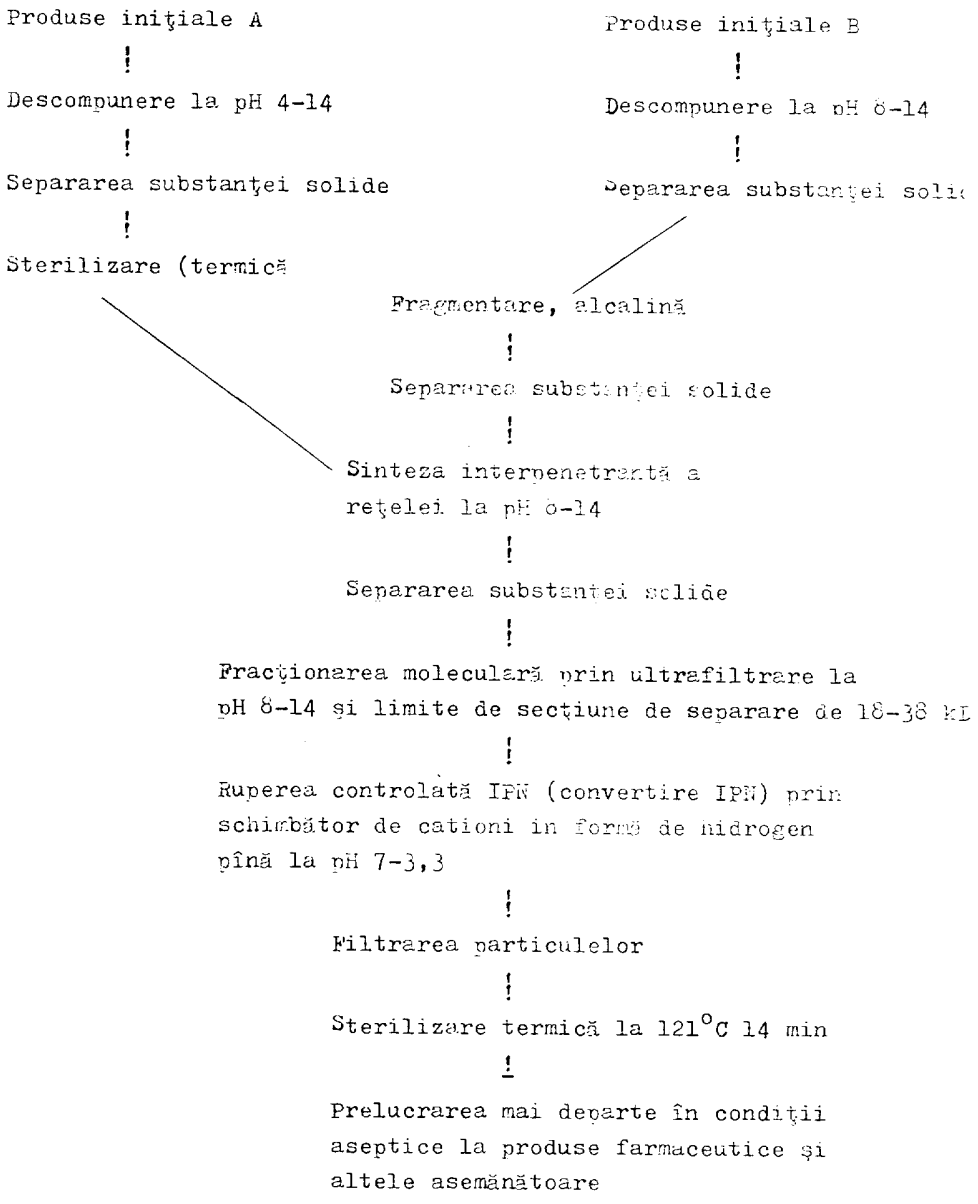
(51) Int.Cl.[6] A 61 K 35/78;
A 61 K 35/10;

Fig. 1B

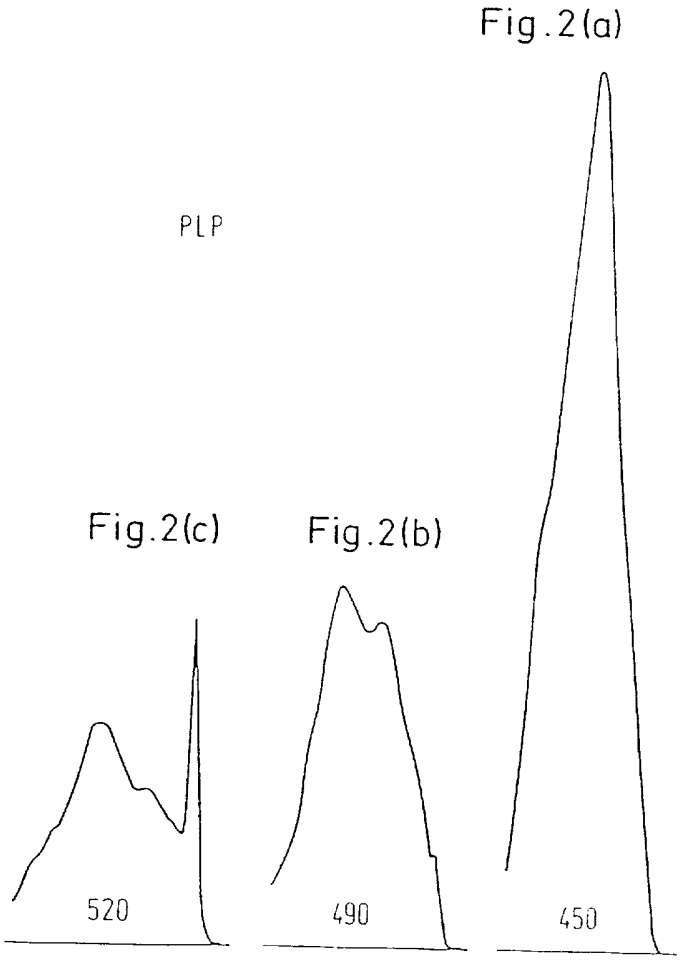


(51) Int.Cl.[6] A 61 K 35/78;
A 61 K 35/10;

Fig. 1c



(51) Int.Cl.[6] A 61 K 35/78;
A 61 K 35/10;



(51) Int.Cl.[6] A 61 K 35/78;
A 61 K 35/10;

Fig. 2(e)

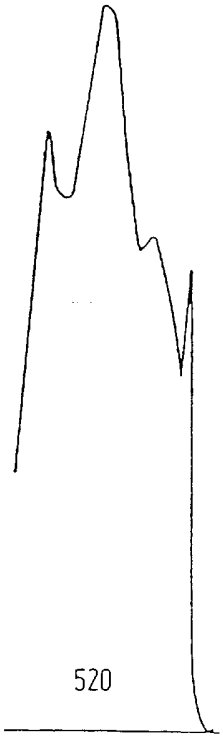


Fig. 2(d)



(51) Int.Cl.[6] A 61 K 35/78;
A 61 K 35/10;

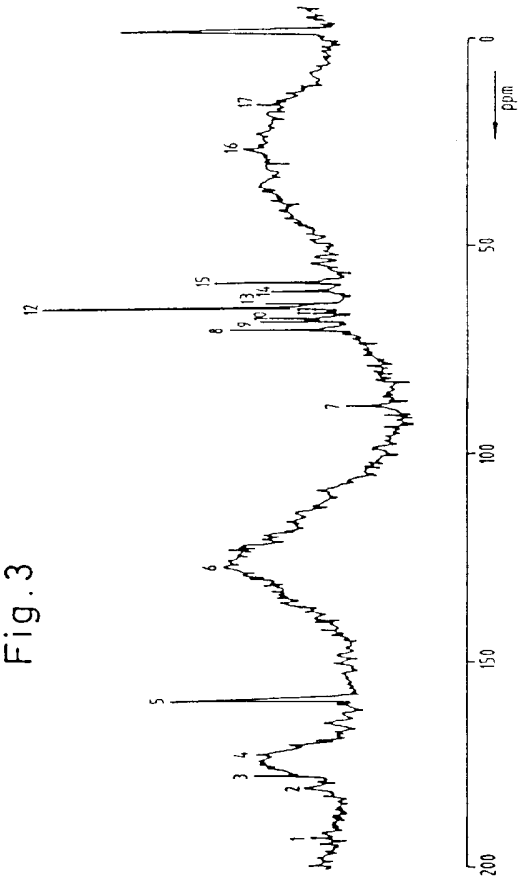
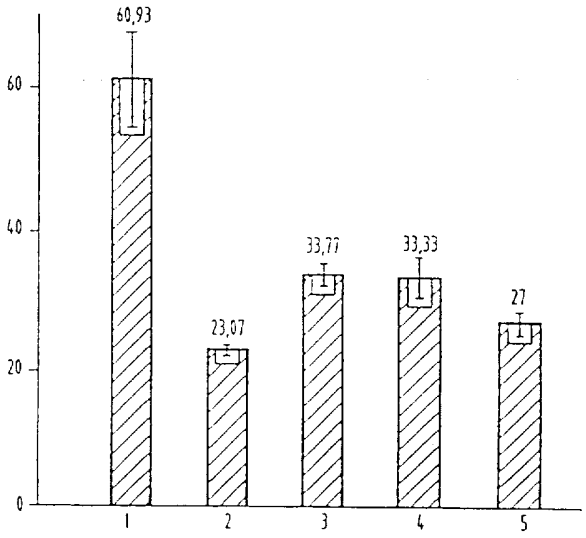


Fig. 3

(51) Int.Cl.[6] A 61 K 35/78;
A 61 K 35/10;

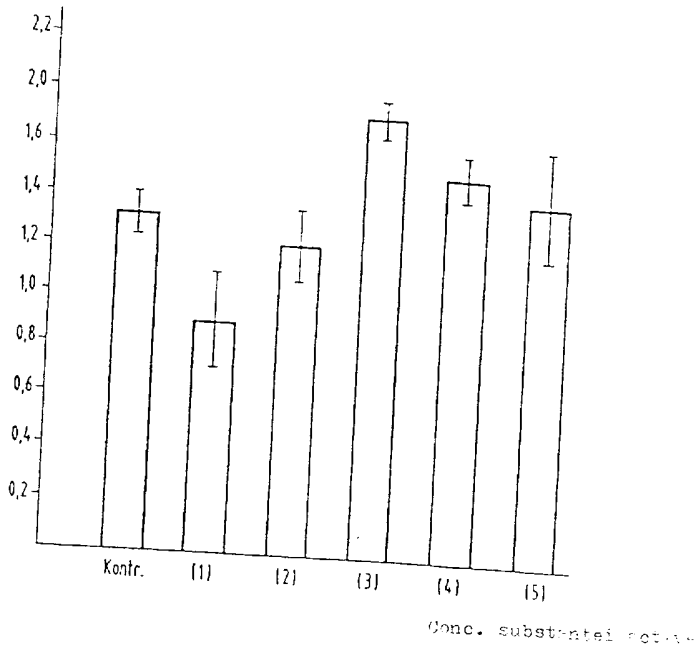
Fig. 4



1) Supraviețuire fără expunere după 24 ore
2) după expunere fără substanță activă
3) după expunere și după adaos de 1 µg/ml substanță activ
4) după expunere și după adaos de 0,1 µg/ml substanță activ
5) după expunere și după adaos de 0,01 µg/ml substanță activ

(51) Int.Cl.[6] A 61 K 35/78;
A 61 K 35/10;

Fig. 5



(51) Int.Cl.^{6} A 61 K 35/78;
A 61 K 35/10;

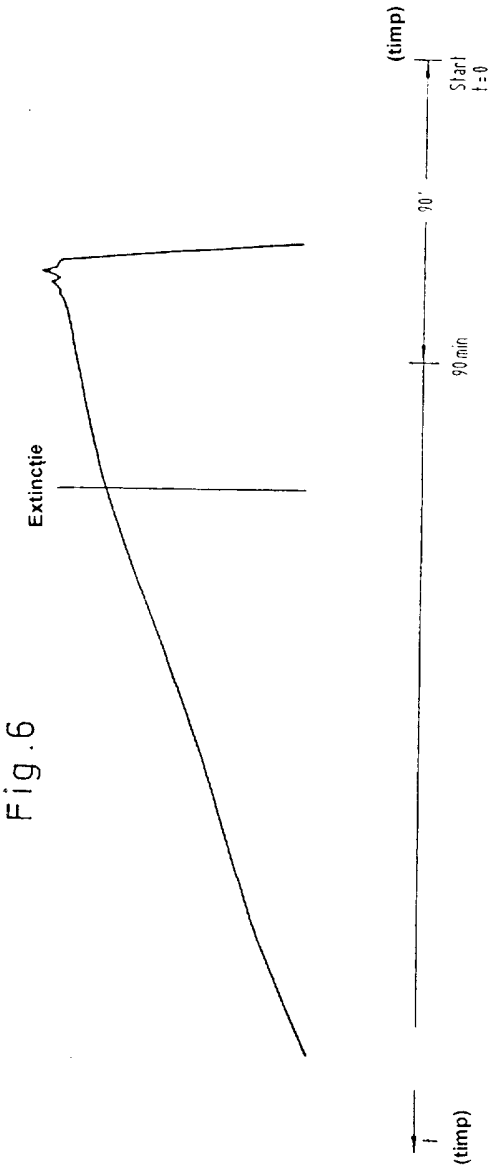


Fig.6

Metodă de măsurare: Spectrofotometru cu două radiații SHIMADSCHU INDICARE DIGITALĂ + INREGISTRATOR; cuvetă de cuarț, radiația de măsurare 380 nm, viteza: 2 cm/oră reglare ABS 0,-0,2 valoare de pornire absolută 0,505, Slit 8 nm, timpul total de măsurare 24 ore Constanță la timp lung mai bună decît 2,0 %/24 ore (grătar 1200 linii/mm, dispersare Czerny-Turner modificat, temperatura de măsurare: 21°C

Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci