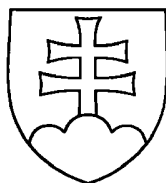


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 19.06.1999
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 09/102 355
(32) Dátum priority: 23.06.1998
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 12.06.2000
(86) Číslo PCT: PCT/US99/13949, 19.06.1999

(21) Číslo dokumentu:

1691-99

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷:

A 61K 35/78
A 61K 47/00

(75) Prihlasovateľ a pôvodca vynálezu: Shehadeh Ahmad Abdallah, Granite Bay, CA, US;

(74) Zástupca: Rott, Růžička, Guttmann, v. o. s., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Kompozícia rastlinného extraktu a spôsob so schopnosťou posilňovať imunitu**

(57) Anotácia:
Kompozícia rastlinného extraktu árona, extraktu granátového jablka, extraktu ibišteka a extraktu čaju. Kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu in vitro stimuluje transformáciu lymfocytov a produkciu cytokínov, inhibuje gp120 väzbu in vitro a poskytuje potenciálneho kandidáta na terapiu a ošetrovania imunitných porúch a HIV infekcie.

Kompozícia rastlinného extraktu a spôsob so schopnosťou posilňovať imunitu

Oblasť techniky

Tento vynález sa všeobecne týka rastlinných extraktov, spôsobov a ošetrovaní a predovšetkým potom kompozície rastlinného alebo bylinného extraktu a spôsobu, ktorý má terapeutické účinky posilňovania imunity a antivírusové efekty na zosilňovanie a stimulovanie prirodzenej imunitnej odozvy u ľudí.

Doterajší stav techniky

História náuky o rastlinách je nerozlučne prepojená s modernou medicínou. Mnohé bežné moderné medikamenty sa vyvinuli z prastarých liečiteľských tradícií spojených s určitými rastlinami. Liečivé vlastnosti mnohých rastlín boli identifikované so špecifickými chemickými zlúčeninami, ktoré boli izolované, vyčistené a v mnohých prípadoch synteticky reprodukované. Mnohé bežne známe drogy pochádzajú pôvodne z rastlín. Salicylová kyselina, predchodca aspirínu, bola pôvodne izolovaná z kôry vrby bielej a tavelníka. Chinín, užívaný pri liečení malárie, bol získaný z kôry chinínovníka. Vinkristín, ktorý sa používa pri ošetrovaní rakoviny, pochádza zo zimozeleny. Taxol, liek proti rakovine, bol pôvodne izolovaný z kôry a ihličia pacifického tisu. Snáď najznámejší je morfin a kodeín, ktoré pochádzajú z ópia maku. Morfin je doposiaľ štandardom, ku ktorému sa prirovnávajú nové syntetické lieky na zmierňovanie bolesti.

Použitie rastlín na medicínalne účely časovo predchádza historické záznamy. Ibiš lekárske, hyacint a myši chvost obyčajný boli nájdené starostlivo umiestnené okolo kostí pravekého muža v Iraku. Koreň ibiša lekárskeho je upokojujúca bylina s protizápalovými vlastnosťami a je používaný pri ošetrovaní zapálených alebo podráždených membrán slizníc. Hyacint sa používa ako diuretikum na podnietenie tkanív, aby sa z nich uvoľňovala prebytočná voda. Myši chvost obyčajný je dlhú dobu oceňovaný prostriedok na znižovanie teploty a proti horúčke, ktorý bol kedysi používaný tak široko, ako je dnes aspirín.

Moderní lekári, predovšetkým v Spojených štátoch, majú sklon spoliehať sa na liečenie syntetickými alebo chemicky pripravenými medikamentmi. Skôr než používať na liečenie celé rastliny alebo rastlinné extrakty, majú farmakológovia pre použitie na liečenie sklon identifikovať, izolovať, extrahovať a syntetizovať aktívne zlúčeniny z rastlín. Avšak tento prístup má ne-

výhody. Vedľa jednotlivých fyziologicky aktívnych zlúčenín prítomných v rastlinách sú tu tiež minerály, vitamíny, glykozidy, oleje, alkaloidy, bioflavonoidy a ďalšie látky, ktoré môžu mať význam pre podporu medicínskych vlastností konkrétnej rastliny. Tieto dodatkové látky môžu spôsobovať synergický efekt, ktorý neexistuje, keď sa vyčistené fyziologicky aktívne zlúčeniny používajú samotné. Okrem toho je ešte toxicita vyčistenej fyziologicky aktívnej zlúčeniny všeobecne vyššia, ako keď sú fyziologicky aktívne zlúčeniny prítomné spolu s inými rastlinnými látkami.

Účinnosť rôznych rastlinných liečivých prostriedkov, extraktov, tekutých liekov a spôsobov liečby je bežne známa a terapeutické rastlinné produkty sú stále viac považované za žiadané alternatívy syntetických liečiv. Napríklad US. patent č. 4,446,130 publikuje použitie extraktu žen-šenu, ktorý má stimulatívne a diuretické účinky. US. patent č. 4,886,665 opisuje použitie farmaceutického prípravku z ovsu a extraktu z žihľavy. US. patent č. 4,671,959 publikuje aplikáciu prírodných olejov na zmierňovanie stresu. US. patent č. 5,064,675 sa týka kompozície rastlinného extraktu, ktorá má upokojujúci účinok. US. patent č. 5,407,675 zverejňuje rastlinný extrakt pre použitie na ošetrovanie kože na hlave. US. patent č. 5,178,865 opisuje zmes rastlinného extraktu, ktorá in vitro zabraňuje infekcii HIV (Human Immunodeficiency Virus). US patent č. 5,500,340 a US patent č. 5,294,443 uverejňujú použitie rastlinných extraktov pri zníženej imunite a autoimúnnych poruchách.

Ľudská imunitná odozva je neobyčajne zložitá a vyžaduje konštantnú interakciu medzi bunkami, ktoré sú do imunitného systému zapojené. Medzibunková komunikácia je uľahčovaná vylučovaním mediátorových ("messenger") proteínov známych ako cytokíny, ktoré spôsobujú podnecovanie rastu buniek, podporujú aktiváciu buniek, riadia výmenu buniek, stimulujú funkciu makrofágu, ničia antigény a majú i iné funkcie. Cytokíny obsahujú obvykle lymfokíny, ktoré sú vylučované T-lymfocytmi a monokíny vylučované monocytmi. Významnou triedou cytokínov sú interferóny, ktoré sú využívané na obranu proti vírusovej infekcii a rastu rakovinových buniek. Cytokíny zahŕňujú tiež interleukíny, ktoré sa týkajú diferenciácie buniek a faktorov nekrózy tumorov i faktorov transformujúceho rastu, ktoré sa zúčastňujú na sprostredkovaní zápalu a cytotoxických reakcií. Inou významnou skupinou proteínov pri ľudskej imunitnej odozve sú imunoglobulíny, ktoré sú vylučované B lymfocytmi. Imunoglobulíny slúžia ako protilátky, ktoré vzdorujú vírusovým, bakteriálnym a iným antigénom.

Osoby, ktoré trpia chorobami zníženej imunity alebo stavmi ako je vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV), rakovina, hepatitída, obličkové zlyhanie, diabetes, astma, artritída a

podobne, často trpia znížením hladín lymfocytov a tomu zodpovedajúcim spôsobom zníženia hladiny cytokínov. Keď sa napríklad jednotliviec infikoval HIV, sú v necharakteristicky nízkom počte prítomné lymfocyty majúce na povrchu buniek antigén známy ako CD4. Zatiaľ čo u zdravých jedincov tieto bunky s CD4 lymfocytmi sú prítomné v koncentráciách okolo 800 buniek na mililiter séra, HIV nakazený jedinec vykazuje menej než 200 CD4 buniek na mililiter séra, keď sa vyvíjajú oportúnne infekcie. Špecifické typy CD4 lymfocytov známe ako TH1 a TH2 bunky sa zdajú byť predovšetkým významné v bunkami sprostredkávanej odozve na HIV infekciu. TH1 bunky produkujú interleukín-2 (IL-2) a gama interferón (IFN γ). TH2 bunky produkujú interleukíny -4, -5 a -10 (IL-4, IL-5 a IL-10). O cytokínoch vylučovaných TH1 a TH2 bunkami sa predpokladá, že majú jedna ku druhej opozičný efekt tak, že cytokíny vylučované TH1 bunkami pôsobia regulačne na produkciu cytokínov vylučovaných TH2 bunkami a naopak. Na začiatku priebehu HIV infekcie dominuje odozva TH1 a sekrécia IL-2 TH1 bunkami zvyšuje aktivitu CD8 lymfocytov.

Prírodne sa vyskytujúce interferóny, interleukíny a imunoglobulíny vylučované lymfocytmi sú dobre uspôsobené na reguláciu ľudskej imunitnej odozvy a ošetrovanie pacientov s imuno-deficienciou alebo s potlačenou imunitou môže byť efektívne. Je známa priemyslová produkcia interferónov, interleukínov a imunoglobulínov technikami génového inžinierstva, pričom gény zodpovedajúce za produkciu týchto proteínov sú vložené do baktérií, ktoré sa potom kultivujú a zbierajú. Interferóny, interleukíny a imunoglobulíny vylúčené geneticky modifikovanými baktériami sa potom vyčistia a podávajú pacientom injekčnou striekačkou alebo intravenóznymi metódami. Metóda orálneho podávania na poskytovanie interferónov, interleukínov a imunoglobulínov pacientom nebola doposiaľ realizovaná, pretože žalúdočné kyseliny a enzýmy tieto proteíny štiepia skôr, než sa môžu dostať do krvného riečišťa.

Predpokladá sa, že mnohé rastliny majú blahodarný efekt na ľudský imunitný systém. Napríklad *Echinacea purpurea* a *Echinacea angustifolia* sú považované za stimulátory aktivity T-buniek. (Mowery D. B., *The Scientific Validation of Herbal Medicine*, Keats Publishing, Inc., New Canaan Press, 1986, str. 118-119). O *Astragalus membranaceus* sa myslí, že je u myši schopné stimulovať produkciu interferónu a imunoglobulínov A a G (IgA a IgG). (Kaiser J. D., *Immune Power. A Comprehensive Treatment Program for HIV*, St. Martin's Press, New York, 1993, str. 59-60).

Avšak rastlinný alebo bylinný extrakt, ktorý by poskytoval stimulujúci alebo zosilňujúci účinok na ľudský imunitný systém bol až doposiaľ neznámy.

Preto teda je tu potreba kompozície rastlinného extraktu, spôsobu kompozície a metódy, ktorá poskytne zdravotný doplnok a všeobecné ošetrovanie osobám alebo zvieratám, ktoré majú choroby alebo stavy, ktoré potlačujú imunitnú odozvu. Predkladaný vynález uspokojuje tieto potreby rovnako ako iné a všeobecne prekonáva nedostatky, ktoré v tejto oblasti nachádzame

Podstata vynálezu

Predkladaný vynález predstavuje kompozíciu rastlinného extraktu, spôsob jej prípravy a jej použitie na stimuláciu alebo posilňovanie imunitnej odozvy u ľudí a zvierat. Názvy, klasifikácie a zemepisný pôvod vo vynáleze použitých rastlín a bylín sú uvedené nižšie v Tabuľke 1

TABUĽKA 1

Názov použitej rastliny	Klasifikácia	Pôvod	Časť/časti
Áron (Arum)	Araceae	Ázia, Afrika, Európa a Ameriky	Listy a/alebo korene
Granátové jablko (Pomegranate)	Punica granatum čel'ad' Punicaceae	Sýria, Irak, Turecko, Taliansko, iné časti sveta	Šupky plodov
Čaj (Tea)	Camelia Sinensis čel'ad' Theaceae, čajovitých	Čína, Japonsko, Východná India	Listy
Ibištek (Hibiscus)	Malvaceae, rod slezovitých	Afrika, Východná India, Čína	Kvety

Ako je podrobnejšie nižšie opísané, pri príprave kompozície rastlinného extraktu podľa vynálezu môže byť typicky použité čerstvé alebo sušené listie, semená, kôra, ovocie, šupka, kvety a/alebo korene každej z vyššie uvedených rastlín alebo bylín. Avšak preferované, k extrakcii používané časti áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju sú tie, ktoré ukazuje Tabuľka 1. Obvykle sú rastliny extrahované horúcou vodou, i keď alternatívne možno používať etanolové roztoky a etanol.

Všeobecne povedané kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu obsahuje extrakt áronu (Arum). Iné uskutočnenie podľa vynálezu je kompozícia rastlinného extraktu, ktorá obsahuje medzi približne desiatimi percentami a približne deväťdesiatimi percentami extraktu áronu a medzi približne desiatimi percentami a približne deväťdesiatimi percentami extraktu granátového jablka. Kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu môže ďalej obsahovať medzi približne

desiatimi percentami a približne deväťdesiatimi percentami extraktu ibišteka a/alebo medzi približne desiatimi percentami a približne deväťdesiatimi percentami extraktu čaju. Je výhodné, keď kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu obsahuje v podstate rovnaké podiely extraktu áronu, extraktu granátového jablka, extraktu ibišteka a extraktu čaju.

Kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu poskytuje zdravý a nutričný doplnok ľudskej stravy v tom, že obsahuje vitamín C, vitamín E, vitamín D2, vitamín D3, vitamín K, rozpustené minerály vrátane fosforu, sodíka, draslíka, zinku, horčíka a medi a rad blahodarné pôsobiacich proteínov. Proteíny zahrňujú rôzne cytokíny alebo cytokínom podobné proteíny a imunoglobulín alebo imunoglobulínu podobné proteíny, o ktorých sa usudzuje, že poskytujú stimulujúci alebo zosilňujúci efekt na imunitný systém. Kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu ako nutričný doplnok môže byť požívaná orálne alebo môže byť aplikovaná miestne.

Experimentálne výsledky (diskutované nižšie) naznačujú, že kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu je účinná pri zosilňovaní ľudskej imunitnej odozvy. Pokusy *in vitro* ukazujú, že kompozície rastlinného extraktu podľa vynálezu stimulujú bunkou sprostredkovanú imunitu stimulujúcu blastogénu alebo zárodkovú transformáciu lymfocytov a sprostredkovanú stimuláciu produkcie cytokínov v suspenziách lymfocytov u normálnych osôb, pacientov s leukémiou a pacientov trpiacich zlyhaním obličiek. Počiatočné experimentálne výsledky tiež ukazujú, že kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu je účinná pri inhibícii HIV infekcie *in vitro*. Tieto experimenty a získané údaje demonštrujú, že kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu je užitočný zdroj alebo kandidát na potenciálne terapie imunitných ťažkostí.

Vhodný spôsob zhotovenia kompozície rastlinného extraktu podľa vynálezu sa skladá z krokov prípravy extraktu áronu (*Arum*), prípravy a extraktu granátového jablka, prípravy a extraktu ibišteka, prípravy a extraktu čaju a spojenia extraktov áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju.

Spôsob použitia vynálezu na stimuláciu bunkami sprostredkovanej imunity *in vitro* zahrňuje styk alebo expozíciu buniek s účinným množstvom preparátu zloženým v podstate z extraktu áronu, extraktu granátového jablka, extraktu ibišteka a extraktu čaju.

Spôsob použitia vynálezu na stimuláciu blastogény lymfocytov *in vitro* zahrňuje styk alebo expozíciu suspenzie lymfocytov s účinným množstvom preparátu zloženým v podstate z extraktu áronu, extraktu granátového jablka, extraktu ibišteka a extraktu čaju.

Spôsob použitia vynálezu na stimuláciu produkcie cytokínov v periférnych mononukleárných krvných bunkách in vitro zahrňuje styk alebo expozíciu takých buniek s účinným množstvom preparátu zloženým v podstate z extraktu áronu, extraktu granátového jablka, extraktu ibišteka a extraktu čaju.

Predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu a spôsob, ktorý je užitočným zdrojom alebo kandidátom pre terapie a ošetrovanie ľudí a zvierat trpiacich imunosupresívnymi a autoimúnnymi chorobami, ťažkosťami, infekciami alebo stavmi.

Iným predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu a spôsob, ktorý poskytuje nutričný výživový doplnok pre ľudí a zvieratá.

Iným predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu a spôsob, ktorý stimuluje alebo zosilňuje imunitnú odozvu u ľudí a zvierat.

Ďalším predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu a spôsob, ktorý stimuluje bunkou sprostredkovanú imunitu in vitro.

Ďalším predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu a spôsob, ktorý stimuluje bunkou sprostredkovanú imunitu u ľudí a zvierat.

Iným predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu a spôsob, ktorý in vitro stimuluje transformáciu blastu alebo blastogenézu lymfocytov.

Iným predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu a spôsob, ktorý stimuluje transformáciu blastu alebo blastogenézu lymfocytov u ľudí a zvierat.

Ďalším predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu a spôsob, ktorý in vitro stimuluje produkciu cytokínu v periférnych mononukleárných krvných bunkách.

Ďalším predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu a spôsob, ktorý stimuluje produkciu cytokínu v periférnych mononukleárných krvných bunkách u ľudí a zvierat.

Iným predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu a spôsob, ktorý stimuluje produkciu cytokínu u ľudí a zvierat.

Ďalším predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu a spôsob na inhibíciu väzby gp120 na MT4 bunky in vitro.

Ďalším predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu a spôsob na inhibíciu HIV infekcie MT4 buniek in vitro.

Iným predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu obsahujúcu extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju na inhibíciu HIV infekcie u ľudí.

Iným predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu a spôsob na ošetrovanie imunosupresívnych chorôb, ktorý je relatívne netoxický.

Ďalším predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu, v ktorej sú obsiahnuté rôzne cytokíny a/alebo cytokínom podobné proteíny a imunoglobulín a/alebo imunoglobulinu podobné proteíny.

Ďalším predmetom vynálezu je poskytnúť kompozíciu rastlinného extraktu, ktorá obsahuje vitamín C, vitamín E, vitamín D2, vitamín D3, vitamín K, rozpustené minerály vrátane fosforu, sodíka, draslíka, zinku, horčíka a medi a rad blahodarne pôsobiacich proteínov.

Ďalšie predmety a výhody vynálezu budú vysvetlené v nasledujúcich častiach opisu, v ktorých je uvedený podrobný opis s tým cieľom, aby bolo opísané výhodné uskutočnenie vynálezu bez toho, že by tým mal byť obmedzený.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Predložený vynález bude lepšie pochopený odkazom na nasledujúce obrázky, ktoré majú iba ilustratívny charakter.

Obrázok 1 je grafickým znázornením účinku kompozície rastlinného extraktu podľa vynálezu na blastogézu normálnych lymfocytov.

Obrázok 2 je grafickým znázornením účinku kompozície rastlinného extraktu podľa vynálezu na blastogézu lymfocytov pacientov s leukémiou.

Obrázok 3 je grafickým znázornením účinku kompozície rastlinného extraktu podľa vynálezu na blastogézu lymfocytov pacientov s obličkovým zlyhaním.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Predložený vynález sa týka používania rastlinných extraktov z áronu (Arum), granátového jablka, ibišteka a čaju a ich rôznych kombinácií na zosilňovanie alebo stimuláciu imunitnej odozvy u ľudí a zvierat, na ošetrovanie osôb alebo zvierat trpiacich imunosupresívnymi a autoimúnnymi chorobami alebo stavmi a na inhibíciu HIV infekcie u ľudí. Príklad 1 ukazuje spôsob prípravy a zloženia rastlinného extraktu z áronu (Arum), granátového jablka, ibišteka a čaju. Príklad 2 sa vzťahuje na použitie kompozície rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt z áronu, extrakt z granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju pre zárodočnú transformáciu suspenzií normálnych lymfocytov in vitro. Príklad 3 sa vzťahuje na použitie kompozície rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt z áronu, extrakt z granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju pre blastogézu periférnych krvných lymfocytov pacientov s akútnou leukémiou, in vitro. Príklad 4 sa vzťahuje na použitie kompozície rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt z áronu, extrakt z granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju pre blastogézu periférnych krvných lymfocytov pacientov s obličkovým zlyhaním, in vitro. Príklad 5 sa vzťahuje na použitie kompozície rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt z áronu, extrakt z granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju na stimuláciu produkcie cytokínov v periférnych krvných mononukleárných bunkách (PMBC) u normálnych pacientov, in vitro. Príklad 6 sa vzťahuje na použitie kompozície rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt z áronu, extrakt z granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju na inhibíciu väzby gp120 na MT-4 bunky in vitro, ako bolo zamerané väzbou s OKT-4A. Príklad 7 sa vzťahuje na použitie kompozície rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt z áronu, extrakt z granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju na inhibíciu väzby gp120 na MT-4 bunky in vitro, ako bolo zamerané s anti gp 120 mAb. Príklad 8 opisuje analytické zhodnotenie spojených extraktov áronu (Arum), granátového jablka, ibišteka a čaju.

Príklad 1

Príprava extraktu

Tento príklad opisuje prípravu a spojovanie extraktov áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju. Odkazuje sa na Tabuľku 1 hore, kde sa uvádzajú preferované časti rastlín áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju použité pre extrakčné pochody. Procesy uvedené nižšie môžu byť zväčšené na produkciu väčších množstiev extraktov. Podrobnosti uvedené pre prípravu v nasledujúcich výpisoch vyjadrujú v súčasnej dobe preferovanú metódu prípravy extraktu a nemôžu

byť považované za limitujúce. K tomu, aby sa v súhlase s vynálezom získali vhodné extrakty áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju môžu byť nižšie opisované množstvá a doby podstatne zmenené.

1. Príprava extraktu z áronu (Arum)

Približne 20 gramov sušeného, jemne rozdrveného áronu a jeden liter destilovanej vody boli vložené do nerezového tlakového hrnca a uzavreté v ňom nerezovým vekom. Potom bola zmes zohriata k varu (približne 100 °C) a nechala sa variť okolo štyridsaťpäť minút. Potom bola zmes zohriata na približne 130 °C, varená okolo 15 minút, potom sa nechala ochladiť pod 100 °C, a tak sa získal kvapalný extrakt z áronu. Extrakt z áronu pokiaľ bol ešte horúci, bol používaný spôsobom, ktorý je opísaný nižšie.

2. Príprava extraktu z granátového jablka

Približne 60 gramov sušeného, jemne rozdrveného granátového jablka a jeden liter destilovanej vody boli vložené do nerezového tlakového hrnca a uzavreté v ňom nerezovým vekom. Potom bola zmes zohriata k varu (približne 100 °C) a nechala sa variť okolo štyridsaťpäť minút. Potom bola zmes zohriata na približne 130 °C, varená okolo 15 minút, potom sa nechala ochladiť pod 100 °C, a tak sa získal kvapalný extrakt z granátového jablka. Extrakt z granátového jablka pokiaľ bol ešte horúci, bol používaný spôsobom, ktorý je opísaný nižšie.

3. Príprava extraktu z ibišteka

Približne 15 gramov sušeného, jemne rozdrveného ibišteka a jeden liter destilovanej vody boli vložené do nerezového tlakového hrnca a uzavreté v ňom nerezovým vekom. Potom bola zmes zohriata k varu (približne 100 °C) a nechala sa variť okolo štyridsaťpäť minút. Potom bola zmes zohriata na približne 130 °C, varená okolo 15 minút a potom sa nechala ochladiť pod 100 °C, a tak sa získal kvapalný extrakt z ibišteka. Extrakt z ibišteka pokiaľ bol ešte horúci, bol používaný spôsobom, ktorý je opísaný nižšie.

4 Príprava extraktu z čaju

Približne 40 gramov sušeného, jemne rozdrveného čaju a jeden liter destilovanej vody boli vložené do nerezového tlakového hrnca a uzavreté v ňom nerezovým vekom. Potom bola zmes zohriata k varu (približne 100 °C) a nechala sa variť okolo štyridsaťpäť minút. Potom bola zmes zohriata na približne 130 °C, varená okolo 15 minút a potom sa nechala ochladiť pod 100 °C, a tak sa získal kvapalný extrakt z čaju. Extrakt z čaju pokiaľ bol ešte horúci, bol používaný spôsobom, ktorý je opísaný nižšie.

5. Príprava spojených extraktov z áronu a z granátového jablka

Približne 50 ml každého z extraktu áronu a z extraktu granátového jablka boli, pokiaľ boli ešte teplé až horúce (približne medzi 40 °C a 100 °C), prenesené do nerezového tlakového hrnca, uzavreté v ňom nerezovým vekom a za stáleho miešania alebo trepania okolo 1,5 hodiny spolu zohrievané pri približne 100 °C. Takto získaná zmes môže byť ochladená a skladovaná pri ochladení alebo použitá ešte teplá alebo horúca na prípravu ďalších kombinácií extraktov ako je opísané nižšie. Podľa všeobecne identickej procedúry boli pripravené takisto spojené extrakty z áronu a ibišteka, z áronu a čaju, z granátového jablka a ibišteka i z granátového jablka a čaju.

6. Príprava spojených extraktov z áronu, z granátového jablka, z ibišteka a z čaju

Približne 100 ml spojených extraktov z extraktu áronu a z granátového jablka, pripravených ako je uvedené vyššie, spolu s približne 50 ml z extraktu ibišteka pripraveného ako je uvedené vyššie a približne 50 ml extraktu z čaju pripraveného ako je uvedené vyššie, boli pokiaľ boli ešte teplé až horúce (približne medzi 40 °C a 100 °C) prenesené do nerezového tlakového hrnca, uzavreté v ňom nerezovým vekom a za stáleho miešania alebo trepania okolo 1,5 hodiny spolu zohrievané pri približne 100 °C. Takto získaná zmes má spravidla rovnaké podiely každého z extraktov z áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju opísaných vyššie. Spojená zmes extraktov z áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju môže byť ochladená na teplotu miestnosti. Počas ochladzovania, bol ku spojenej zmesi, keď mala približne 30 °C až 60 °C, pridaný roztok pufru ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), aby zmes získala slabo kyslé pH. Je výhodné, keď je pH spojených extraktov adjustované asi na 4,0, lepšie je 3,8, i keď pH pod 7 je prijateľné. Spojené extrakty z áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju podľa horeuvedeného postupu boli uchovávané za chladenia pri približne 4 °C. Ku spojeným extraktom môže byť ako konzervačná látka pridaný benzoan sodný a pokiaľ sa to požaduje môžu byť pridávané príchute a potravinárske farbivá

Výsledky chemickej analýzy spojenej zmesi extraktov z áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju sú uvedené nižšie v príklade 8.

Vyššie uvedený postup bol použitý na prípravu spojenej zmesi extraktov z áronu, granátového jablka a ibišteka za vynechania extraktu z čaju. Tento postup bol použitý tiež na prípravu spojenej zmesi extraktov z áronu, granátového jablka a čaju za vynechania extraktu z ibišteka. Vyššie uvedený postup bol použitý ďalej na prípravu spojenej zmesi extraktov z granátového jablka, ibišteka a čaju za vynechania extraktu z áronu. Ďalej bol tento postup použitý na prípravu spojenej zmesi extraktov z granátového jablka a ibišteka za vynechania extraktov z áronu a čaju.

Príklad 2

Zárodočná transformácia lymfocytov u normálnych pacientov *in vitro*

Tento príklad opisuje účinok kompozície rastlinného extraktu obsahujúcej extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju, opísanej v príklade 1 na bunkou sprostredkovanú imunitu, ktorá bola stanovovaná zárodočnou transformáciou alebo blastogénou normálnych lymfocytov *in vitro*.

Blastogénza je počiatkový stupeň indukcie bunkou sprostredkovanej imunity a je spojená s uvoľňovaním či vylučovaním rôznych interleukínov, ktoré sú základom medzibunkovej interakcie imunitného systému. Bunkou sprostredkovaná imunita je zapojená do obranného systému ľudského tela proti zhubným nádorom, určitým vírusovým infekciám vrátane HIV, medzibunkovým bakteriálnym infekciám, rovnako tak ako do regulácie rôznych celulárnych a humorálnych imunologických interakcií a prevencie autoimúnnych reakcií.

Zárodočná transformácia bola meraná pomocou konvenčného testu lymfocytov, pri ktorom ^3H (tríciový) tymidín bol pridaný do suspenzie lymfocytov, potom nasledovala inkubácia, zhromaždenie buniek a zmeranie rádioaktivity nazhromaždených buniek. Vysoká hodnota rádioaktivity ukazuje, že lymfocyty podľahli transformácii a prijali ^3H tymidín.

Lymfocyty zdravej krvi troch normálnych pacientov boli získané separáciou hustotných gradientov na Ficoll Isopaque. Do mikrotitračných platní s mnohými jamkami upravených tak, že obsahovali suspenzie lymfocytov v Hanksovom roztoku, doplnenom 10 %-ným tel'acím fetálnym sérom, penicilínom a streptomycínom, bolo do jamiek každej z platní pridané 5 μl , 10 μl a 20 μl spojenej zmesi extraktov áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju. Konečný objem suspenzie

lymfocytov v každej jamke bol 0,2 ml. Potom boli mikrotitračné platne inkubované 72 hodín pri 37 °C v CO₂ inkubátore. Do každej jamky bolo potom pridané 0,05 ml ³H (tríciovaneho) tymidinu, nasledovala ďalšia inkubácia 24 hodín pri 37 °C, po ktorej boli bunky zobrať automatickým hromadným zberačom a scintilačným počítačom bola zmeraná rádioaktivita. Stimulačný index bol vypočítaný z priemeru impulzov pre každú koncentráciu spojeného extraktu. Výsledky uvádza Tabuľka 2 a Obrázok 1.

TABUĽKA 2

	Priemer impulzov (Stupeň ³ H absorpcie)	Stimulačný index
Nespojené extrakty	284 impulzov /min (pozadie)	0
Spojené extrakty 20 µl	815 impulzov /min	2,86
Spojené extrakty 10 µl	723 impulzov /min	2,54
Spojené extrakty 5 µl	463 impulzov /min	1,63

Výsledky uvedené v Tabuľke 2 a na Obrázku 1 ukazujú, že prídavok zvyšujúcich sa množstiev spojených extraktov k suspenzii lymfocytov má za následok zvyšujúce sa množstvo alebo stupne transformácie lymfocytov či blastogenézy, čo ukazuje zvýšený počet radiačných impulzov spôsobený zvýšenou absorpciou ³H. Výsledky ukazujú, že kompozícia rastlinného extraktu obsahujúca zmes extraktov áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju zosilňuje alebo stimuluje bunkami sprostredkovanú imunitu stimuláciou blastogenézy a výslednú sekréciu cytokínov u normálnych osôb. Ďalej tieto výsledky ukazujú, že kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu je užitočným zdrojom alebo kandidátom pre potenciálne terapie a ošetrovanie porúch imunity.

Príklad 3

In vitro blastogenéza periférnych krvných lymfocytov u pacientov s akútnou leukémiou

Tento príklad opisuje účinok kompozície rastlinného extraktu obsahujúcej extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju, opísanej v príklade 1 na bunkou sprostredkovanú imunitu, ktorá bola ďalej stanovovaná *in vitro* zárodočnou transformáciou alebo blastogenézou lymfocytov u piatich pacientov trpiacich leukémiou. Ako kontrola pre kalibrá-

ciu alebo meranie účinnosti spojených extraktov bol použitý PHA (fytohemagglutínin), známy silný mitogén, ktorý stimuluje transformáciu lymfocytov.

Mikrotitračné platne s mnohými jamkami boli upravené tak, že obsahovali suspenziu lymfocytov od piatich pacientov trpiacich leukémiou, v Hanksovom roztoku, doplnenom 10 %-ným tel'acím fetálnym sérom, penicilínom a streptomycínom. Do jamiek každej z platní bolo pridané 5 μ l, 10 μ l a 20 μ l spojenej zmesi extraktov áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju. Ako kontrola bol potom do jamiek pridaný PHA (fytohemagglutínin) v koncentráciách 1 : 50 a 1 : 100. Konečný objem suspenzie lymfocytov v každej jamke bol 0,2 ml. Mikrotitračné platne boli inkubované 72 hodín pri 37 °C v CO₂ inkubátore, potom bolo do každej jamky pridané 0,05 ml ³H (tríciovaneho) tymidínu, nasledovala ďalšia inkubácia 24 hodín pri 37 °C. Bunky boli zobrať automatickým hromadným zberačom a scintilačným počítačom bola zmeraná rádioaktivita. Stimulačný index bol vypočítaný pre každú koncentráciu spojených extraktov. Výsledky uvádza Tabuľka 3 a Obrázok 2.

TABUĽKA 3

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

Výsledky uvedené v Tabuľke 3 a na Obrázku 2 ukazujú, že prídavok zvyšujúcich sa množstiev spojených extraktov k suspenzii lymfocytov pacientov trpiacich leukémiou, má za ná-

sledok zvyšujúce sa množstvo transformácie lymfocytov či blastogenézy, čo ukazuje zvýšený počet radiačných impulzov spôsobený zvýšenou absorpciou ^3H . Kompozícia rastlinného extraktu obsahujúca extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju spôsobuje schopnosť stimulovať transformáciu lymfocytov, ktorá je najmenej tak veľká ako PHA. Stimulácia zárodočnej transformácie vzrástla na 306 % pri najvyššej (20 μl) koncentrácii. Tieto výsledky ukazujú, že kompozícia rastlinného extraktu obsahujúca extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju zosilňuje alebo stimuluje bunkami sprostredkovanú imunitu *in vitro* stimuláciou blastogenézy a teda výslednú sekréciu cytokínov v lymfocytoch pacientov trpiacich leukémiou. Ďalej tieto výsledky ukazujú, že kompozícia rastlinného extraktu podľa výnálezu je užitočným zdrojom alebo kandidátom pre potenciálne terapie a ošetrovanie porúch imunity.

Príklad 4

In vitro blastogenéza periférnych krvných lymfocytov u pacientov s obličkovým zlyhaním

Tento príklad opisuje účinok kompozície rastlinného extraktu obsahujúcej extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju, opísanej v príklade 1 na bunkou sprostredkovanú imunitu, ktorá bola ďalej stanovovaná *in vitro* zárodočnou transformáciou alebo blastogenézou lymfocytov u pätnástich pacientov trpiacich obličkovým zlyhaním. Ako kontrola pre kalibráciu alebo meranie účinnosti spojených extraktov bol použitý PHA (fytohemagglutínín) vo dvoch koncentráciách.

Mikrotitračné platne s mnohými jamkami boli upravené tak, že obsahovali suspenziu lymfocytov pätnástich pacientov s obličkovým zlyhaním, v Hanksovom roztoku, doplnenom 10 %-ným tel'acím fetálnym sérom, penicilínom a streptomycínom. Do jamiek každej z platní bolo pridané 5 μl , 10 μl a 20 μl spojenej zmesi extraktov áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju. Ako kontrola bol potom do jamiek pridaný PHA (fytohemagglutínín) v koncentráciách 1 : 50 a 1 : 100. Konečný objem suspenzie lymfocytov v každej jamke bol 0,2 ml. Mikrotitračné platne boli inkubované 72 hodín pri 37 °C v CO_2 inkubátore, potom bolo do každej jamky pridané 0,05 ml ^3H (tríciovaneho) tymidínu a nasledovala ďalšia inkubácia 24 hodín pri 37 °C. Bunky boli zobrať automatickým hromadným zberačom a scintilačným počítačom bola zmeraná rádioaktivita. Stimulačný index bol vypočítaný pre každú koncentráciu spojených extraktov. Výsledky uvádza Tabuľka 4 a Obrázok 3.

TABULKA 4

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

Výsledky uvedené v Tabuľke 4 a na Obrázku 3 ukazujú, že prídavok zvyšujúcich sa množstiev spojených extraktov k suspenzii lymfocytov pacientov s poruchami obličiek, má za následok zvyšujúce sa množstvo transformácie lymfocytov či blastogenézy, čo ukazuje zvýšený počet radiačných impulzov spôsobený zvýšenou absorpciou ^3H . Spojené extrakty áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju spôsobujú schopnosť stimulovať transformáciu lymfocytov, ktorá je najmenej tak veľká ako PHA. Stimulácia zárodočnej transformácie vzrástla na 306 % pri najvyššej (20 μl) koncentrácii. Tieto výsledky ukazujú, že spojené extrakty áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju zosilňujú alebo stimulujú bunkami sprostredkovanú imunitu in vitro stimuláciou blastogenézy a teda výslednú sekréciu cytokínov v lymfocytoch pacientov s obličkovým zlyhaním. Ďalej tieto výsledky ukazujú, že kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu je užitočným zdrojom alebo kandidátom pre potenciálne terapie a ošetrovanie porúch imunity.

Príklad 5

Stimulácia produkcie cytokínov u normálnych osôb

Účinok kompozície rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju na produkciu cytokínov ľudskými periférnymi mononukleárnymi krvnými bunkami (PMBC) bol meraný metódou, ktorú opisali D. Schols a E. De Clencq v *Human Immunodeficiency Virus Type gp120 Induces Anergy In Human Peripheral Blood Lymphocytes By Inducing Interleukin Production*, J. Virol. zv. 70, str. 4953-4960 (1996), na ktorej obsah sa tu odkazuje. Priemerné výsledky dvoch normálnych pacientov sú uvedené v Tabuľke 5.

TABUĽKA 5

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

Ako je možné vidieť v Tabuľke 5 prítomnosť kompozície rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju indukuje produkciu podstatne vyššieho množstva interleukínu 10 (IL-10) a γ -interferónu (γ -IFN) ako sú hladiny vylučované v jamkách bez rastlinného extraktu. Interleukín 2 (IL-2) bolo možné detegovať v jamkách, kde boli spojené extrakty prítomné v koncentrácii 10 %. Ako bolo zistené pomocou trypanovej modrej nebola zaznamenaná toxicita u kultúry buniek pri 10 % koncentrácii spojených extraktov. Tieto výsledky ukazujú, že spojené extrakty áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju zosilňujú alebo stimulujú produkciu cytokínov in vitro v PMBC normálnych osôb. Ďalej tieto výsledky ukazujú, že kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu je užitočným zdrojom alebo kandidátom pre potenciálne terapie a ošetrovanie porúch imunity.

Príklad 6

Inhibícia gp120 väzby na MT-4 bunky in vitro. Merané pomocou OKT-4A monoklonálnej protilátky.

Účinok kompozície rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju ("spojené extrakty") na väzbu gp120 na MT-4 bunky, ako bolo zisťované pomocou OKT-4A monoklonálnych protilátok (mAb), bol určený metódou, ktorú opísali J. Neyts, D. Reymen, D. Letourneur, J. Jozefonvicz, D. Schols, J. Este, G. Andrei, McKenna, M. Witvrouw, S. Ikeda, J. Clements a E. De Clercq v *Differential Antiviral Activity of Derivatized Dextrans*, Biochem. Pharmacol., zv. 50, str. 743-751 (1995), na ktorej obsah sa tu odkazuje. Povlakový proteín HIV gp120, ktorý sa viaže na OKT-4A epitop, blokuje kompetitívnu väzbu OKT-4A mAb. Spojené extrakty áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju blokujú väzbu gp120, ako je ukázané v Tabuľke 6.

TABUĽKA 6

Vzorky v jamkách	OKT-4A mAb väzba (Relatívny počet buniek)
Negatívne kontroly	4
Pozitívne kontroly	600
gp120	7
50 % spojených extraktov	150
25 % spojených extraktov	100
12,5 % spojených extraktov	90
6,25 % spojených extraktov	80
3,13 % spojených extraktov	30
1,57 % spojených extraktov	10
0,79 % spojených extraktov	8

Ako je možné vidieť v Tabuľke 6, vzrastajúce množstvo kompozície rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju spôsobuje zvýšenú inhibíciu väzby gp120 na MT-4 bunky. Tieto výsledky ukazujú, že kompozícia rastlinného extraktu obsahujúca extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju je užitočným zdrojom alebo kandidátom pre potenciálne anti-HIV terapie in vivo a ošetrovanie infikovaných hostiteľov.

Príklad 7

Inhibícia gp120 väzby na MT-4 bunky in vitro. Merané pomocou anti-gp120 monoklonálnej protilátky.

Účinok kompozície rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju ("spojené extrakty") na väzbu rgp120 na MT-4 bunky, ako bolo zisťované pomocou anti-gp120 monoklonálnych protilátok (mAb), bol určený metódou, ktorú opísali D. Schols, M. Baba, R. Pauwels a E. De Clercq v *Flow Cytometric Method To Demonstrate Whether Anti-HIV-1 Agents Inhibit Virion Binding To T4⁺ Cells*, na ktorej obsah sa tu odkazuje. Spojené extrakty áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju blokujú väzbu gp120, ako je ukázané v Tabuľke 7.

TABUĽKA 7

Vzorky v jamkách	Anti-gp 120 mAb väzba (Relatívny počet buniek)
Negatívne kontroly	4
Pozitívne kontroly	90
50 % spojených extraktov	60
10 % spojených extraktov	70
2 % spojených extraktov	40
0,4 % spojených extraktov	80
Dextran sulfát, 25 µg/ml (pozitívna kontrola)	50

Ako je možné vidieť z tabuľky, kompozícia rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju inhibuje väzbu gp120 na MT-4 bunky. Tieto výsledky ukazujú, že kompozícia rastlinného extraktu obsahujúca extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju je užitočným zdrojom alebo kandidátom pre potenciálne anti-HIV terapie in vivo a ošetrovanie infikovaných hostiteľov.

Príklad 8

Chemická analýza spojených extraktov

Na skúmanie chemického zloženia kompozície rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju boli pre rôzne vitamíny, tuky, farbivá, proteíny, minerály a ďalšie zlúčeniny použité konvenčné analytické techniky. Tieto výsledky sú zhrnuté v Tabuľke 8.

TABUĽKA 8

Predmet analýzy	Metóda	Výsledok
Celkový obsah tuku	Lyofilizácia	3,689 g/10 ml
Obsah tuku, zvyšok	Lyofilizácia	3,50 g/100 ml
Obsah tuku, zvyšok	Rotačná odparka	4,83 g/100 ml
Nerozpustné podiely	Gravimetria	0,198 g/100 ml
Obsah popola, vlhký 105°C	Gravimetria	1,4 g/100 ml
Hodnota pH, nezriedené	Elektrometria	5,20
Hodnota pH, 1:10/voda	Elektrometria	5,47
Glycidy, celkom	Fotometria	20 % v sušine
Makromolekuly	Gélová permeačná chromatografia, gravimetria	15 % v sušine
Proteíny celkom	Fotometria	2,8 mg/100 ml
Polysacharidy, celkom	Fotometria	7,8 % v sušine
Polysacharidy, nerozpustné	Fotometria	0,1 % v sušine
Polysacharidy, rozpustné	Fotometria	7,5 % v sušine
Nukleové kyseliny, celkom	Fotometria	53,7 mg/100 ml
RNA	Fotometria	28,4 mg/100 ml
DNA	Fotometria	25,2 mg/100 ml
Polyfenoly	Fotometria	<2 mg/100 ml
Lipidy, celkom	TLC	<0,1 %
Na	Zafarbenie plameňa	+++
K	Zafarbenie plameňa , KClO ₄	+
Mg	Titánová žltá	++
Ca	Oxalát	++
Zn	Dithizon	+
Cu	Methocuproin	+
Fosfát	Molybdenát amónny	+++

Imunoglobulín A (IgA)	BIA s proteínovým G čipom, AC s jacalin sepharose	nepreukázateľný
Imunoglobulín G (IgG)	BIA s imobilizovaným proteínom A	+
Imunoglobulín M (IgM)	BIA s imobilizovaným proteínom B	nepreukázateľný
Imunoglobulín E (IgE)	Anti-Ig na testovacej platni	nepreukázateľný
Adenozín	TLC	++
Guanozín	TLC	+
Tymidín	TLC	++
N,N-Dimetylguanozín	TLC	nepreukázateľný
Adenín	TLC	+
Guanín	TLC	+
Cytozín	TLC	+
Tymín	TLC	+
Steárová kyselina	TLC	<1 mg/ml
Interleukín 4 (IL-4)	ELISA	34 pg/ml (NWG 50 pg/ml)
Interleukín 5 (IL-5)	ELISA	332 pg/ml (NWG 50 pg/ml)
Interleukín 6 (IL-6)	ELISA	69 pg/ml (NWG 30 pg/ml)
Interleukín 10 (IL-10)	ELISA	44 pg/ml (NWG 50 pg/ml)
Interleukín 12 (IL-12)	ELISA	1095 pg/ml (NWG 1000 pg/ml)
γ -Interferón (IFN- γ)	ELISA	29 pg/ml (NWG 50 pg/ml)
Tumor nekrosis faktor α (TNF α)	ELISA	5,7 pg/ml (NWG 3 pg/ml)
Červená farba	UV/VIS	0,7 % sušiny
Zelená farba	UV/VIS	15,7 % sušiny
Žltá farba	UV/VIS	<0,2 % sušiny
Modrá farba	UV/VIS	<0,1 % sušiny
Vitámín C	TLC, fotometricky	3 mg/100 ml
Vitámín E	TLC	+
Vitámín K	TLC	+
Vitámín D2	TLC	+
Vitámín D3	TLC	+
Endotoxíny	LAL test	14 IU

Ako je možné vidieť z výsledkov v Tabuľke 8, kompozícia rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju zahrňuje mnohé esenciálne vitamíny vrátane vitamínu C, vitamínu E, vitamínu K, vitamínu D2, vitamínu D3 rovnako ako rôzne esenciálne minerály a ďalšie blahodarne pôsobiace materiály a poskytuje teda užitočný a nutričný diétny doplnok, keď sa užíva orálne.

Analytické výsledky uvedené v Tabuľke 8 tiež ukazujú, že v kompozícii rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju sú prítomné rôzne cytokíny a cytokínom podobné proteíny. V spojených extraktoch áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju sú predovšetkým prítomné detegovateľné množstvá IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF α . Okrem toho sa ukazuje, že v kompozícii rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju sú prítomné stopy IgG alebo imunoglobulínu podobný proteín. Prítomnosť ľudského IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF α a IgG je trochu nekonzistentná s rastlinným pôvodom kompozície rastlinného extraktu. Sú však známe rastlinné protivírusové faktory (AVF), ktoré majú blízku sekvenčnú homológiu s ľudským β -interferónom (IFN β) a o ktorých sa predpokladá, že spôsobujú antivírusovú aktivitu spôsobom obdobným ako ľudské interferóny. Vyššie opísané pozitívne výsledky pre IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF α a IgG možno teda prirátat' interleukínom podobným proteínom, interferónom podobným proteínom, TNF podobným proteínom a imunoglobulínom podobným proteínom, ktoré sú prítomné v kompozícii rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju. Teda označenie "kompozícia rastlinného extraktu obsahujúceho extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju" ako je tu používané, malo by byť tiež chápané ako zahrňujúce alebo obsahujúce IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF α a IgG rovnako ako interleukínom podobné proteíny, interferónom podobné proteíny, TNF podobné proteíny a imunoglobulínom podobné proteíny.

Diskusia

Vyššie uvedené experimenty in vitro a výsledné údaje ukazujú, že kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu je užitočným potenciálnym zdrojom alebo kandidátom pre terapie zosilňujúce imunitu a ošetrovanie ľudí i zvierat trpiacich poruchami, infekciami alebo stavmi chorôb,

vrátane imunosupresívnych stavov prirátaných leukémii, obličkovému zlyhaniu, rôznym rakoviným ochoreniam a nádorom, vírusovým infekciám, bakteriálnym infekciám a parazitárnym infekciám. Presné chemické zloženie(ia) a farmakologický(é) mechanizmus(mechanizmy), ktorých výsledkom je stimulácia zárodočnej transformácie a produkcia cytokínov, stanovované neboli. Kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu môže obsahovať jedinú farmakologicky účinnú ingredienciu, komponent alebo činidlo pôsobiace samotné, alebo spojenie takých ingrediencií, komponentov alebo činidiel a/alebo biologické metabolity alebo ich deriváty pôsobiace separátne alebo synergicky. In vivo terapie a ošetrovania budú pravdepodobne založené na ústne podávaných dávkach kompozície rastlinného extraktu podľa vynálezu v kvapalnej alebo tuhej forme. In vivo je takisto možné podávanie kompozície rastlinného extraktu podľa vynálezu rektálne, parenterálne, intravenózne, topicky, inhaláciou aerosólu alebo subkutánnym spôsobom. Kompozícia rastlinného extraktu môže byť in vivo podávaná v prímеси alebo v kombinácii s vhodnými excipientami, nosičmi, antivírusovými činidlami, imunitnými modulátormi, chemoterapeutickými činidlami, protilátkami alebo ich kombináciami. Farmakologické preparáty podľa vynálezu môžu mať jednotku dávky vo forme tabliet, kapsúl, čapíkov, ampúl alebo odmeriavaných kvapalných alebo aerosólových dávok.

V súčasnej dobe sa predpokladá, že farmakologicky účinná zložka alebo zložky podľa vynálezu sú prítomné v árone a/alebo granátovom jablku. Počiatočné pokusy naznačujú, že samotný extrakt áronu, samotný extrakt granátového jablka a spojené extrakty áronu a granátového jablka majú určité imunitu zvyšujúce efekty. Avšak vhodné uskutočnenie vynálezu predstavujú spojené extrakty áronu, granátového jablka rovnako ako ibišteka a čaju. Predpokladá sa, že ibištek a čaj poskytujú ďalšie zložky alebo činidlá, ktoré pôsobia ako excipienty alebo nosiče, alebo ktoré spolu s komponentami poskytovanými áronom alebo granátovým jablkom majú synergický účinok. Okrem toho, preferovaný spôsob získania kompozície rastlinného extraktu obsahujúcej extrakt áronu, extrakt granátového jablka, extrakt ibišteka a extrakt čaju, pri ktorom sa spojené extrakty spolu zahrievajú v stupňoch opísaných v príklade 1, je považovaný za výhodnejší ako púhe miešanie alebo spojovanie extraktu áronu, extraktu granátového jablka, extraktu ibišteka a extraktu čaju navzájom bez dodatočného zahrievania.

Vyššie uvedené experimenty in vitro a výsledné údaje ukazujú, že kompozícia rastlinného extraktu podľa vynálezu je užitočným potenciálnym zdrojom alebo kandidátom pre anti-HIV a ďalšie antivírusové terapie a ošetrovanie ľudí i zvierat trpiacich HIV, ďalšími vírusovými infekciami alebo komplikáciami či poruchami spojenými s takýmito vírusovými infekciami. Rastlinný

extrakt podľa vynálezu môže potenciálne inhibovať alebo zabráňovať infekcii buniek množstvom rôznych vírusov, vrátane, ale nielen, vírusov herpes simplex, vírusov ľudského papilómu (HPV), vírusov kiahní, vírusov vezikulárnej stomatitidy, coxsackie vírusov, syncytiálnych vírusov, cytomegalovírusu, vírusov varicelly zoster. Anti-HIV aktivita rastlinného extraktu podľa vynálezu môže obsahovať jedinú farmaceuticky aktívnu ingredienciu, zložku alebo činidlo pôsobiace samostatne, alebo spojenie takých ingrediencií, zložiek alebo činidiel a/alebo biologických metabolitov alebo ich derivátov. In vivo terapie a ošetrovania s použitím kompozície rastlinného extraktu podľa vynálezu na anti-HIV a antivírusové ošetrovania budú pravdepodobne založené na ústne podávaných dávkach kompozície rastlinného extraktu podľa vynálezu v kvapalnej alebo tuhej forme. In vivo je takisto možné podávanie kompozície rastlinného extraktu podľa vynálezu rektálne, parenterálne, intravenózne, topicky, inhaláciou aerosólu alebo subkutánnym spôsobom. Ako ošetrovanie pri imunosupresívnych liečeniach môže byť kompozícia rastlinného extraktu in vivo podávaná v prímеси alebo v kombinácii s vhodnými excipientami, nosičmi, antivírusovými činidlami, imunitnými modulátormi, chemoterapeutickými činidlami, protilátkami alebo ich kombináciami. Farmakologické preparáty podľa vynálezu môžu mať jednotku dávky vo forme tabliet, kapsúl, čapíkov, ampúl alebo odmeriavaných kvapalných alebo aerosólových dávok.

V súlade s tým je zrejmé, že tento vynález dáva k dispozícii kompozíciu rastlinného extraktu, ktorá poskytuje doplnok výživy, ktorý in vitro stimuluje bunkou sprostredkovanú imunitu, ktorý in vitro stimuluje blastogézu lymfocytov, ktorý in vitro stimuluje produkciu cytokínov lymfocytmi, ktorý in vitro inhibuje HIV infekciu, a je potenciálnym kandidátom na ošetrovanie a terapie zosilňujúce alebo stimulujúce imunitnú odozvu u ľudí i zvierat. Napriek tomu, že vyššie uvedený opis obsahuje mnohé špecifiká, nemožno ho chápať ako obmedzujúci rozsah vynálezu, ale iba ako poskytujúci ilustráciu preferovaného uskutočnenia vynálezu v súčasnej dobe. Rozsah vynálezu by mal byť určovaný pripojenými patentovými nárokmi a ich legálnymi ekvivalentmi.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kompozícia rastlinného extraktu na stimuláciu bunkou sprostredkovanej imunity, **vyznačujúca sa tým, že obsahuje extrakt áronu.**
2. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 1, **vyznačujúca sa tým, že obsahuje ďalej extrakt granátového jablka.**
3. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 1, **vyznačujúca sa tým, že obsahuje ďalej extrakt ibišteka.**
4. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 1, **vyznačujúca sa tým, že obsahuje ďalej extrakt čaju.**
5. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 2, **vyznačujúca sa tým, že obsahuje ďalej extrakt ibišteka.**
6. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 2, **vyznačujúca sa tým, že obsahuje ďalej extrakt čaju.**
7. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 5, **vyznačujúca sa tým, že obsahuje ďalej extrakt čaju.**
8. Kompozícia rastlinného extraktu na stimuláciu bunkou sprostredkovanej imunity, **vyznačujúca sa tým, že obsahuje extrakt granátového jablka.**

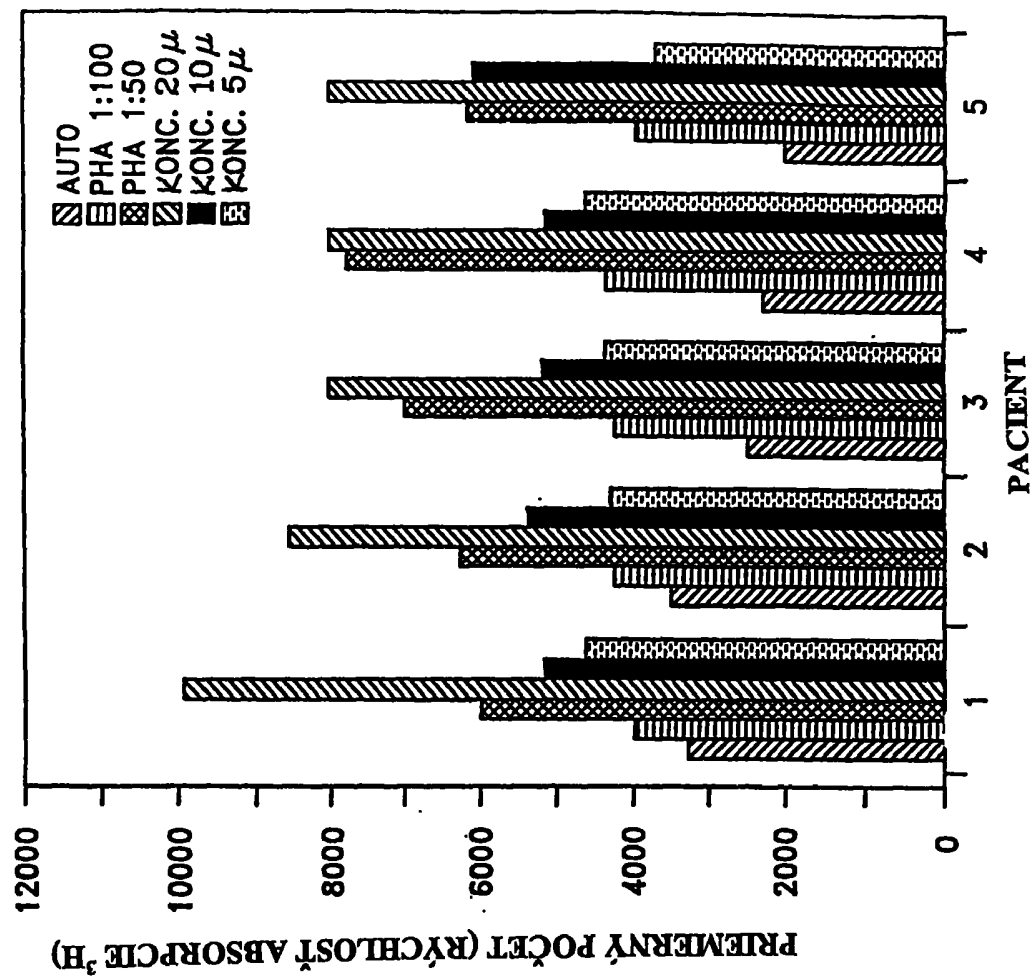
9. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 8, vyznačujúca sa tým, že obsahuje ďalej extrakt ibišteka.
10. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 8, vyznačujúca sa tým, že obsahuje ďalej extrakt čaju.
11. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 9, vyznačujúca sa tým, že obsahuje ďalej extrakt čaju.
12. Spôsob prípravy kompozície rastlinného extraktu na stimuláciu bunkou sprostredkovanánej imunity, vyznačujúci sa tým, že sa skladá z nasledujúcich krokov:
 - a) príprava extraktu áronu varením sušeného, jemne rozdrveného áronu vo vode; a
 - b) príprava extraktu granátového jablka varením sušeného, jemne rozdrveného granátového jablka vo vode; a
 - c) spojenie uvedeného extraktu áronu a uvedeného extraktu granátového jablka a varenie uvedených spojených extraktov áronu a granátového jablka.
13. Spôsob prípravy kompozície rastlinného extraktu podľa nároku 12, vyznačujúci sa tým, že sa ďalej skladá z nasledujúcich krokov:
 - a) príprava extraktu ibišteka varením sušeného, jemne rozdrveného ibišteka vo vode;
 - b) príprava extraktu čaju varením sušeného, jemne rozdrveného čaju vo vode; a
 - c) spojenie uvedeného extraktu ibišteka a uvedeného extraktu čaju s uvedenými spojenými extraktami áronu a granátového jablka a varenie uvedených spojených extraktov áronu, granátového jablka, ibišteka a čaju.

14. Spôsob stimulácie bunkou sprostredkovanvej imunity in vitro, **vyznačujúci sa tým**, že zahŕňa kontakt buniek s účinným množstvom preparátu tvoreného v podstate z extraktu áronu, extraktu granátového jablka, extraktu ibišteka a extraktu čaju.
15. Spôsob stimulácie bunkou sprostredkovanvej imunity in vitro podľa nároku 14, **vyznačujúci sa tým**, že uvedené bunky zahŕňujú bunky od normálnych pacientov.
16. Spôsob stimulácie bunkou sprostredkovanvej imunity in vitro podľa nároku 14, **vyznačujúci sa tým**, že uvedené bunky zahŕňujú bunky od pacientov trpiacich leukémiou.
17. Spôsob stimulácie bunkou sprostredkovanvej imunity in vitro podľa nároku 14, **vyznačujúci sa tým**, že uvedené bunky zahŕňujú bunky od pacientov trpiacich obličkovým zlyhaním.
18. Spôsob stimulácie blastogenézy lymfocytov in vitro, **vyznačujúci sa tým**, že zahŕňa kontakt suspenzií lymfocytov s účinným množstvom preparátu tvoreného v podstate z extraktu áronu, extraktu granátového jablka, extraktu ibišteka a extraktu čaju.
19. Spôsob stimulácie bunkou sprostredkovanvej imunity in vitro podľa nároku 18, **vyznačujúci sa tým**, že uvedené suspenzie lymfocytov obsahujú lymfocyty od normálnych pacientov.
20. Spôsob stimulácie bunkou sprostredkovanvej imunity in vitro podľa nároku 18, **vyznačujúci sa tým**, že uvedené suspenzie lymfocytov obsahujú lymfocyty od pacientov trpiacich leukémiou.

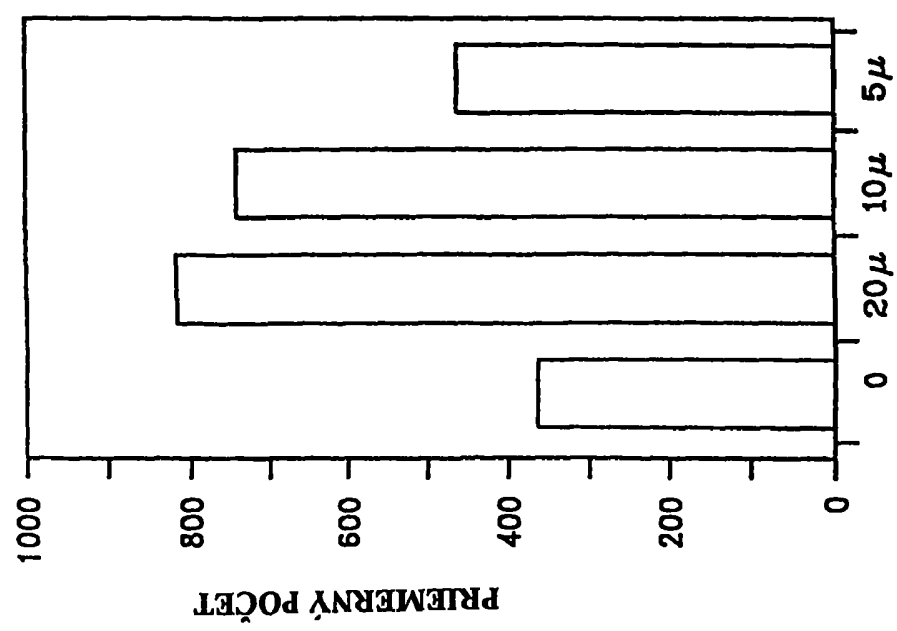
21. Spôsob stimulácie bunkou sprostredkovanvej imunity in vitro podľa nároku 18, **vyznačujúci sa tým**, že uvedené suspenzie lymfocytov obsahujú lymfocyty od pacientov trpiacich obličkovým zlyhaním .
22. Spôsob stimulácie produkcie cytokínov in vitro, **vyznačujúci sa tým**, že zahrňuje kontakt periférnych mononukleárnych krviniek s účinným množstvom preparátu tvoreného v podstate z extraktu áronu, extraktu granátového jablka, extraktu ibišteka a extraktu čaju.
23. Spôsob stimulácie bunkou sprostredkovanvej imunity in vitro podľa nároku 22, **vyznačujúci sa tým**, že uvedené periférne mononukleárne krvinky sú získané od normálnych pacientov.
24. Spôsob stimulácie bunkou sprostredkovanvej imunity in vitro podľa nároku 22, **vyznačujúci sa tým**, že uvedené periférne mononukleárne krvinky sú získané od pacientov trpiacich leukémiou.
25. Spôsob stimulácie bunkou sprostredkovanvej imunity in vitro podľa nároku 22, **vyznačujúci sa tým**, že uvedené periférne mononukleárne krvinky sú získané od pacientov trpiacich obličkovým zlyhaním.
26. Spôsob inhibície HIV infekcie in vitro, **vyznačujúci sa tým**, že zahrňuje kontakt buniek s účinným množstvom preparátu tvoreného v podstate z extraktu áronu, extraktu granátového jablka, extraktu ibišteka a extraktu čaju.
27. Spôsob inhibície väzby gp120 na MT-4 bunky in vitro, **vyznačujúci sa tým**, že zahrňuje kontakt MT-4 buniek s účinným množstvom preparátu tvoreného v podstate z extraktu áronu, extraktu granátového jablka, extraktu ibišteka a extraktu čaju.

28. Kompozícia rastlinného extraktu na stimuláciu bunkou sprostredkovanvej imunity, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje zmes vodného extraktu áronu, vodného extraktu granátového jablka, vodného extraktu ibišteka a vodného extraktu čaju.
29. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 28, **vyznačujúca sa tým**, že uvedená kompozícia obsahuje ďalej najmenej jeden cytokín
30. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 29, **vyznačujúca sa tým**, že uvedený cytokín je interleukín.
31. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 29, **vyznačujúca sa tým**, že uvedený cytokín je interferón.
32. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 28, **vyznačujúca sa tým**, že uvedená kompozícia obsahuje ďalej najmenej jeden faktor nekrózy tumoru.
33. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 28, **vyznačujúca sa tým**, že uvedená kompozícia obsahuje ďalej najmenej jeden imunoglobulín.
34. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 28, **vyznačujúca sa tým**, že uvedená kompozícia obsahuje ďalej polysacharid.
35. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 28, **vyznačujúca sa tým**, že uvedená kompozícia obsahuje ďalej proteíny.
36. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 28, **vyznačujúca sa tým**, že uvedená kompozícia obsahuje ďalej RNA.

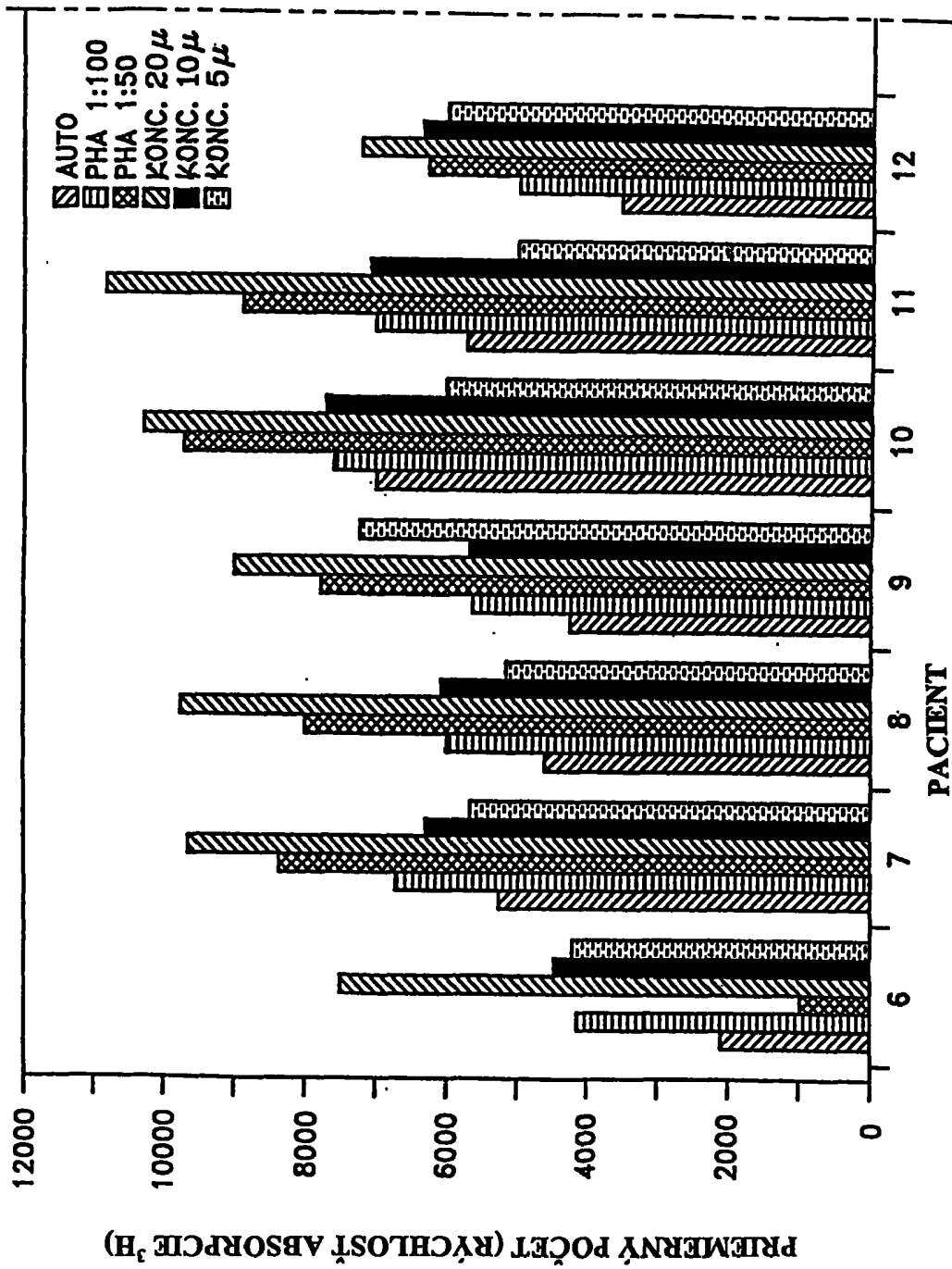
37. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 28, vyznačujúca sa tým, že uvedená kompozícia obsahuje ďalej DNA.
38. Kompozícia rastlinného extraktu podľa nároku 28, vyznačujúca sa tým, že uvedená kompozícia obsahuje približne rovnaké podiely uvedených vodných extraktov.



Obr. 2



Obr. 1



Obr. 3a

