



MD 2700 C2 2005.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 2700⁽¹³⁾ C2
(51) Int. Cl.⁷: A 61 K 31/7028, 35/78;
C 07 J 71/00

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2004 0166 (22) Data depozit: 2004.07.01	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2005.02.28, BOPI nr. 2/2005
(71) Solicitant: CENTRUL NAȚIONAL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE MEDICINĂ PREVENTIVĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: SPĂNU Constantin, MD; CHINTEA Pavel, MD	
(73) Titular: CENTRUL NAȚIONAL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE MEDICINĂ PREVENTIVĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de obținere a 5α -furostan- $3\beta,22,26$ -triol-3-[O- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranozil]-26-O- β -D-glucopiranozid (pacoverinului)

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicină, în special la industria farmaceutică.

5
Esența invenției constă în aceea că procedeul de obținere a 5α -furostan- $3\beta,22,26$ -triol-3-[O- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranozil]-26-O- β -D-glucopiranozid (pacoverinului) include tratarea prin fierbere cu

2
n-butanol a semințelor de tomate cu evaporarea lui ulterioară, spălarea rezidului obținut cu o soluție de cloroform și acetonă luate în raport de 1:1, filtrarea, după care rezidul se spală pe filtru repetat cu acetonă și se usucă.

10
Revendicări: 1

MD 2700 C2 2005.02.28

MD 2700 C2 2005.02.28

3

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în special la industria farmaceutică.

5 Este cunoscut un procedeu de obținere a 5α -furostan- $3\beta,22,26$ -triol-3-[O- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranozil]-26-O- β -D-glucopiranozid (*pacoverinului*) 0,05 g din semințe de tomate, prin extragerea lor cu etanol de 70%, uscarea extractului și cromatografierea multiplă (de 5 ori) în coloană cu silicagel. Frațiile ce conțin tomatozidă se contopesc între ele și se evaporă rămânând sedimentul uscat [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că cromatografierea multiplă pe coloana cu silicagel este un proces îndelungat, scump și laborios.

10 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de procedee și simplificarea procedeuului de obținere a substanței biologice active a α -furostan- $3\beta,22,26$ -triol-3-[O- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranozil]-26-O- β -D-glucopiranozid (*pacoverinului*).

15 Rezultatul invenției constă în extinderea arsenalului de procedee și simplificarea procedeuului de obținere a substanței biologice active a α -furostan- $3\beta,22,26$ -triol-3-[O- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranozil]-26-O- β -D-glucopiranozid (*pacoverinului*).

Esența invenției constă în aceea că metoda de obținere a 5α -furostan- $3\beta,22,26$ -triol-3-[O- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranozil]-26-O- β -D-glucopiranozid (*pacoverinului*) include tratarea prin fierbere cu n-butanol a semințelor de tomate cu evaporarea lui ulterioară, spălarea rezidului obținut cu o soluție de cloroform și acetonă luate în raport de 1:1, filtrarea, după care reziduul se spală repetat pe filtru cu acetonă și se usucă.

Exemplu de realizare a procedeuului:

1 kg de semințe uscate de tomate se mărunțește și se extrage prin fierbere cu n-butanol (3 litri) de 3 ori, câte 5 ore. Extractul butanolic se unește cu fracția de tomatozidă și se distilează până la uscat.

25 Reziduul se spală cu cloroform + acetonă în proporție 1:1(200 ml), apoi numai cu acetonă (50 ml), se filtrează prin filtrul Shott și se usucă.

30 Produsul finit reprezintă 10,0 g sau 1% din greutatea uscată a produsului vegetal inițial. S-a constatat că cantitatea de tomatozidă în *pacoverinul* obținut este de 75%. *Pacoverinul* obținut conține rămășițe de glicozide spirostanolice, o substanță de tipul ligninei, glucozei și galactozei. Prezența ligninei în *Pacoverin* s-a confirmat prin analiza spectrală în raze (UV), în diapazonul spectral de 240...400 nm a soluțiilor alcoolice de *pacoverin*, tomatozidă și lignină. Glucoza și galactoza s-au identificat pe hârtie cromatografică în prezența martorilor de glucoză și galactoză.

35 Acțiunea antivirală a *Pacoverinului* extrasă prin metoda elaborată de noi a fost aplicată *in vitro* utilizând cultura de celule Hep-2, tulpina de Herpes simplex virus (*HSV 1*) și mostre de *Pacoverin* în concentrație de 0,2; 0,1; 0,05 și 0,025%. Cultivarea celulelor, titrarea virusului, infectarea celulelor, depistarea efectului citopatic și evaluarea acțiunii antivirale s-a efectuat conform metodei tradiționale. Efectul citopatic cauzat de virus era evaluat ca pozitiv doar în cazul a nu mai puțin de 50% de monostrat celular supus degenerării specifice. Evaluarea efectului citoprotector (ECP) al virusului s-a efectuat prin depistarea probelor martor, reeșind în special de la absența oricăror schimbări citomorfologice sau degenerative în monostratul de cultură Hep - 2 în prezența și absența *Pacoverinului* în mediul de menținere; prezența virusului infecțios în cultura de celule infectate cu material viral nediluat și în diluții de la 10^1 până la 10^6 . Cantitatea de virus în doze cu efect citoprotector (ECP₅₀) s-a determinat prin metoda probiților, folosind în acest scop table standard speciale. După diferența în titrul virușilor reproduși în absența și prezența *pacoverinului* în mediul de menținere s-a apreciat gradul de activitate a *pacoverinului* exprimat prin valoarea indicelui de neutralizare a activității infecțioase a virusului herptic (tab. 1).

45 Activitatea antivirală a *pacoverinului* obținut prin metoda propusă de noi a fost apreciată și *in vivo*, utilizând șoareci albi cu greutatea de 18...20 g, soluție de „*Pacoverin*” preparată în ser fiziologic în concentrație de 0,1% și lipsită de efect cito- și fitotoxic. Totodată s-a utilizat și suspensie de virus, preparată din creierul șoarecilor albi pieriți în urma inoculărilor cu herpes virus (*HSV*) 1 în diluții de 1:1,6; 1:2,5; 1:4,0; 1:6,5; 1:10,0; 1:100,0; 1:1000,0; 10000,0 și 100000,0 în ser fiziologic. Infectarea animalelor cu amestec de virus + ser fiziologic și virus + „*Pacoverin*”, supravegherea lor în scopul determinării și evaluării titrului virusului herptic în prezența și absența *pacoverinului* a fost efectuată conform metodelor tradiționale. Dterminarea valorii dozei letale (DL₅₀) a fost efectuată după metoda (Rida-Mencea).

55

MD 2700 C2 2005.02.28

4

Tabelul 1

Determinarea și evaluarea activității antivirale a pacoverinului
prin metoda revendicată

5

Substanțele biologice examinate		Titrul virusului herpetic exprimat în:		Indicele de neutralizare a activității infecțioase a virusului herpetic	
Variante	Amestec	LgECP _{50/ml}	LgDL _{50/0,03ml}	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
1.	HSV 1+ser fiziologic (<i>in vitro</i>)	5,2 ± 0,2	-	3,2	-
2.	HSV 1+ser Pacoverin (<i>in vitro</i>)	2,0 ± 0,2	-		
3.	HSV 1+ser fiziologic (<i>in vitro</i>)	-	4,0	-	3,1
4.	HSV 1+ser Pacoverin (<i>in vitro</i>)	-	0,9		

10 Gradul activității antivirale *in vivo* de asemenea a fost exprimat prin valoarea indicelui de neutralizare a activității infecțioase a HSV 1 (tab.1). În urma suprapunerii datelor privind activitatea pacoverinului, obținute prin metoda revendicată cu indicii analogici de referință, unde Pacoverinul a fost extras prin metoda tradițională, nu a fost depistată o diferență statistică veridică între acești indici (tab. 2).

Tabelul 2

15 Activitatea antivirală comparativă a pacoverinului obținut prin diferite procedee tehnologice

Substanțele biologice examinate	Indicele de neutralizare a activității infecțioase a virusului herpetic HSV 1, exprimat în g	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Tomatozidă extrasă prin metoda tradițională	3,14	3,00
Tomatozidă extrasă prin metoda revendicată	3,20	3,10
P	>0,5	>0,5

20 Acțiunea interferonogenă a pacoverinului obținut prin metoda modificată a fost apreciată și evaluată pe șoareci albi cu masa de 18...20 g. Au fost utilizate 2 loturi de animale: lotul experimental și lotul martor (câte 25 animale în lot). Animalele din lotul experimental, zilnic, pe parcursul a 15 zile au primit *per os* câte 1,0 mg (0,1ml) Pacoverin, iar din lotul martor – câte 1,0 mg Placebo. La intervale de 1, 3, 5, 10 și 15 zile de la grupul de animale (în număr de 5) din loturile experimentale și martor a fost colectat sânge pentru depistarea și evaluarea interferonului în ser și capacitatea leucocitelor de a induce α și γ interferoni *in vitro*. În calitate de virus indicator a fost utilizat virusul stomatitei (VSV) – 100 UCP_{50/0,01ml}. Ca unitate de activitate a interferonului a fost fixată valoarea inversă a diluției maxime care inhibă destrucția monostratului celular inoculat cu VSV în proporție de 50%. În calitate de produs antiviral de referință s-a folosit interferonul uman leucocitar în titru 1×10^6 UI/fiolă. Acțiunea interferonogenă a pacoverinului obținut prin metoda modificată, propusă de noi este reprezentată în tabelul 3.

30

MD 2700 C2 2005.02.28

5

Tabelul 3

Statutul interferogen la animalele de laborator după administrarea *per os* a pacoverinului

Loturile studiate	Tipul de interferon	Titrul interferonului UI/ml (zile)				
		1	3	5	10	15
Lotul experimental (nr.=25)	Sumar în ser	128	256	512	512	512
	α	64	128	128	256	256
	γ	32	64	128	128	128
Lotul martor (nr.=25)	Sumar în ser	4	4	4	4	4
	α	16	32	32	32	32
	γ	16	16	16	16	16

- 5 Datele prezentate în tabel confirmă faptul că Pacoverinul obținut prin noua variantă posedă o acțiune interferonogenă semnificativă, confirmată prin sporirea inducției de α și γ interferonul de 4...8 ori comparativ cu indicii analogici din lotul martor. Comparând rezultatele nominalizate cu datele analogice obținute în experiențele precedente [1.3], constatăm absența unei diferențe statistice autentice între capacitatea diferitor variante de Pacoverin obținut prin diferite procedee tehnologice la capitolul acțiune interferonogenă.

Tabelul 4

Acțiunea interferonogenică comparativă a pacoverinului obținută prin diferite procedee tehnologice

Loturile studiate	Tipul de interferon și concentrația lui	Pacoverin obținut prin metoda:		P
		Tradițională	revendicată	
Lotul experimental	Sumar în ser	512	512	>0,5
	α	256	256	>0,5
	γ	128	128	>0,5
Lotul martor	Sumar în ser	>8	4	>0,5
	α	32	32	>0,5
	γ	16	16	>0,5

- 15 Extrapolând rezultatele activității antivirale (*in vitro*, *in vivo*) și interferonogene a pacoverinului extras prin metoda revendicată față de datele precedente putem conchide, că Pacoverinul obținut prin metoda propusă poate fi de asemenea utilizat cu succes în fabricarea remediilor medicamentoase, utilizate ulterior în profilaxia și tratamentul infecțiilor virale, în special a hepatitelor de geneză virală, infecției cu herpes, gripei, paragripei etc.

25

MD 2700 C2 2005.02.28

6

(57) Revendicare:

5 Procedeu de obținere a 5α -furostan- $3\beta,22,26$ -triol-3-[O- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranozil]-26-O- β -D-glucopiranozid (*pacoverinului*) care include tratarea prin fierbere cu n-butanol a semințelor de tomate cu evaporarea lui ulterioară, spălarea rezidului obținut cu o soluție de cloroform și acetonă luate în raport de 1:1, filtrarea, după care reziduul se spală repetat pe filtru cu acetonă și se usucă.

10

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 385 C2 1996.01.31

Șef Secție:	CEBAN Aurelia
Examinator:	IUSTIN Viorel
Redactor:	UNGUREANU Mihail

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2004 0166	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2004.07.01	(86) Cerere internațională PCT:
(51) ⁷ : C 07 J 71/00	
Alți indici de clasificare:	
(54) Titlul : Procedeu de obținere a 5 α -furostan-3 β ,22,26-triol-3-[O- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranozil(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranozil]-26-O- β -D-glucopiranozid (pacoverinei)	
(71) Solicitantul : CENTRUL NAȚIONAL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE MEDICINĂ PREVENTIVĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
Termeni caracteristici :	
a) limba română: tomatozid, glicozide steroidiene	
b) limba engleză: stomatocide, steroid glzcoside	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.- 7)	
Int. Cl. ⁷ Au fost consultate cererile și brevetele MD, EA, SU în perioada 1994-2004, 1995-2004, 1971-9991, conform clasei C 07 J 71/00	
II. Literatura tehnico-științifică consultată adăugător la minim de documentație (autori, titluri, editura, țara și data publicării)	
III. Baze de date electronice consultate (denumirea BD și termen de documentare)	
Bazele de date consultate pentru documentare	
1 Bazele de date internaționale (Internet)	
■ BD FIPS (RU)	
■ Oficiul European de Brevete (ep. espacenet.com)	
■ SUA (www.uspto.gov)	
■ Romania (www.osim.ro)	
2. CD-rom (Rusia, SUA)	

IV. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A A &	SU 1135164 SU 1314642 A1 1983.03.03 MD 385	1 1 1
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în rubrica IV		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data depozit, dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
E - document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat de unul singur
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate sau poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă divulgare		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2004.12.04
Examinatorul		IUSTIN Viorel