



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00959**

(22) Data de depozit: **11.10.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.10.2013** BOPI nr. **10/2013**

(66) Prioritate internă:

30.07.2010 RO a 2010 00684

(41) Data publicării cererii:

28.12.2012 BOPI nr. **12/2012**

(73) Titular:

• **POP DE POPA IOAN, STR.CLUCERULUI
NR.37 A, ET.2, AP.5, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **POP DE POPA DOINA SANDA,
STR.CLUCERULUI NR.37 A, ET.2, AP.5,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

• **POP DE POPA IOAN, STR.CLUCERULUI
NR.37 A, ET.2, AP.5, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **POP DE POPA DOINA SANDA,
STR.CLUCERULUI NR.37 A, ET.2, AP.5,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

**US 4908206; FR 2599972 A1;
WO 00/73421 A2**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI EXTRACT BIOLOGIC,
EXTRACT BIOLOGIC, COMPOZIȚIE PE BAZA ACESTUIA ȘI
UTILIZAREA COMPOZIȚIEI**



Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui extract biologic, la extract biologic, compoziție pe baza acestuia și utilizarea compoziției pentru tratarea unor afecțiuni din patologia umană cu substrat genetic, produse prin mutații determinate de agenți mutageni (biologici, chimici, fizici, metabolici).

Se cunoaște, din documentul **US 4908206**, un procedeu de obținere a unui extract de organe embrionare provenind de la un mamifer, extractul fiind lipsit de constituenți nepolari și prezentând o masă moleculară mare, metoda constând dintr-o primă etapă de extracție a organelor embrionare fin divizate efectuată cu un amestec de apă și un solvent miscibil cu apa care conține cel puțin 70% în volum solvent organic, prezintă o valoare pH în domeniul neutru, din care rezultă un extract care conține numai constituenți polari cu o masă moleculară de maximum 5000 Da și lipsită de resturi din degradarea proteinelor. De asemenea, din acest material se cunoaște utilizarea extractelor obținute ca ingrediente active în preparate farmaceutice utilizate în tratamentul reducerii fluxului cerebral și în tratamentul *acneei vulgaris*.

Un alt material în temă este **FR 2599972 A1**, care se referă la un procedeu de obținere a unor extracte din țesut embrionar de origine animală injectabile la om, în care organele sunt prelevate prin tehnici cunoscute pentru embrioni sau foetuși și placentă în prima perioadă de gestație și menținute în ser fiziologic conținând cel puțin un antibiotic corespunzător.

Procedeul prezintă dezavantajul apariției unor probleme de adaptare a organismului uman la administrarea extractului obținut, cum ar fi accidente alergice sau imunologice prin injectarea la om a țesuturilor de animale adulte.

De asemenea, se cunosc metode pentru extragerea ADN din sursă umană (**Davidson, Waymouth, Experientia, 1944, Vandrelly și Vandrelly, Experientia, 1949, Zamenhof, Shettley, Chargaff, Nature, 1950**), dar preparatele farmaceutice pe baza acestuia nu au fost aplicate în terapia vreunei boli.

O altă metodă din domeniu este descrisă de **WO 00/73421 A2**, în care, dintr-o sursă constând din placentă, se extrag celule epiteliale amniotice umane, care sunt izolate, cultivate și stocate prin criogenie, pentru utilizări ulterioare. Conform autorilor, placenta este recoltată imediat după delivrență și este separată de membrana amniotică prin disecție, iar dezavantajul acestei metode este modul de lucru intensiv și obținerea cu randamente joase de celule stem.

Un alt procedeu de obținere a unui extract biologic este descris în **DE 1467791**, în care se obține un extract de organe embrionare și placentă, prin trei faze de extracție, și anume: o primă fază de extracție într-un mediu neutru, care este efectuată într-o soluție tampon apoasă, o a doua fază de extracție efectuată într-un mediu bazic și o a treia etapă efectuată în mediu bazic, din care rezultă extracte care ulterior se combină. De asemenea, se descrie și utilizarea acestor produse de extracție drept componente active în cadrul unor compoziții farmaceutice. Metoda nu menționează activitatea farmaceutică a extractului obținut.

În **DICTIONNAIRE VIDAL, 1974, pag. 631, O.V.P., Paris, FR; "Extrait de coeur embryonnaire Mauchant"**, este descris un extract de organe embrionare de mamifer, extractul fiind complexat cu acid adenzin monofosforic, produsul final sub formă de complex enzimatic fiind un agent de control al funcției cardiace și al regenerării acesteia. Dezavantajul acestui material constă din lipsa precizărilor referitoare la procedeul de preparare a complexului de extract embrionic.

EP 140134 A2 descrie un procedeu de obținere a unui preparat dintr-un extract biologic activ din organe de animale și culturi celulare, care conține substanțe biologice active cu masă moleculară de minimum 10000 daltoni, constând din dispersia în apă și încălzirea rapidă la o temperatură de 70...90°C, după care substanțele solide sunt recuperate și soluția este supusă la ultrafiltrare, pentru îndepărtarea substanțelor cu o masă moleculară mai mare de 10.000 daltoni. Nu se face referire la niciun organ embrionic. Extractele se utilizează pentru normalizarea propagării de fibroblaste.

RO 128006 B1

Un alt document este DE 3524794 A1 , care descrie un preparat farmaceutic conținând celule embrionare reproductibile vii de mamifer într-un mediu lichid sau solid inert. De asemenea, documentul descrie administrarea preparatelor la subiecți umani, care are drept consecință regăsirea la un număr de zile de la administrare a unor substanțe regeneratoare celulare care sunt capabile să regenereze celulele afectate din culturile celulare care conțin celule de mamifer.	1 3 5
Se cunosc din US 5486359 A compoziții care cuprind celule stem mezenchimale (hMSC), derivate din măduvă, pentru linii celulare mezenchimale.	7
Dezavantajul constă din problemele legate de necesitatea recoltării de măduvă sau de celule de periost de la un donator.	9
Din US 7468276 B2 se cunoaște un procedeu de extragere și obținere a unor celule stem de tip embrionic, care includ dar nu se limitează la celule stem multipotente și pluripotente provenite din placentă umană. De asemenea, documentul se referă și la compoziții farmaceutice care cuprind celule stem de tip embrionic formulate ca soluții injectabile	11 13
De asemenea, se cunosc preparate de ADN sub formă de pulbere utilizate în terapia unor neoplazii umane, după extirparea chirurgicală a tumorii, dar ADN-ul provine din alte surse decât cea umană (Mercier R., La Presse medicale, 1964).	15 17
Un alt preparat de ADN uman este cunoscut din Revista medicală Târgu Mureș, anul XI, nr 1, ianuarie-martie 1965 , preparatul fiind extras printr-o metodă cunoscută în tehnică pentru obținerea ADN din ficat de șobolan. Extragerea s-a efectuat din organe umane și izolate, și alte surse care oferă informații genetice adecvate. Substanța obținută este descrisă din punct de vedere macroscopic sub aspectul unui fuior de vată.	19 21
Extractul a fost aplicat la 160 pacienți având diverse afecțiuni în domeniul oftalmologic în numeroase cazuri cu <i>restitutio ad integrum</i> .	23
RO 119509 B1 se referă la o compoziție de concentrat proteic, embrionar, îmbogățit în peptide, utilizată ca supliment nutritiv, și la un procedeu de obținere a acesteia.	25
Soluțiile din tehnica în domeniu care prezintă administrarea preparatelor embrionare prezintă următoarele dezavantaje:	27
- formele injectabile (intramusculare, intradermice și subcutanate), pe lângă faptul că sunt dificil de aplicat pe termen lung, prezintă riscul major al dezvoltării unor reacții alergice (inclusiv șoc anafilactic). Din acest motiv, tratamentele cu extracte embrionare injectabile se realizează sub strictă supraveghere medicală și cu perioade foarte lungi de pauză, administrarea orală a preparatelor embrionare, care este mult mai convenabilă din punct de vedere practic, este complicată de existența: (i) enzimelor digestive, respectiv, a proteazelor, care hidrolizează peptidele și (ii) a barierei intestinale, care nu permite decât absorbția unei părți nesemnificative din peptidele embrionare. De asemenea, metodele prezentate din stadiul tehnicii prezintă dezavantajele unor tehnici de realizare și stocare laborioase, echipamente speciale, un cost ridicat al tratamentului.	29 31 33 35 37
Problema tehnică pe care o rezolvă invențiile revendicate din grupul de invenții constă din creșterea eficienței tratamentelor afecțiunilor cu substrat genetic, produse, prin mutații determinate de agenți mutageni (biologici, chimici, fizici, metabolici) în condițiile tratamentului cu extracte biologice.	39 41
Primul obiectiv al invenției este un procedeu de obținere a unui extract biologic care constă din aceea că se prelevează și se conservă într-un container steril frigorific un material biologic de concepție, după care materialul biologic este triturat și introdus într-o eprubetă sterilă de centrifugă în care este adăugat un volum egal de soluție fenolică cu cloroform în raport de 1:1, și corectarea valorii pH până când amestecul are o valoare pH de 7,8...8, moment în care	43 45 47

amestecul este supus unei agitări până la obținerea unei omogenizări a emulsiei, după care emulsia este supusă unei centrifugări timp de 1 minut la temperatura camerei la o rotație de maximum 3/4 din 14000xg, după care centrifugarea este oprită și se reia în același regim timp de 10 min, această ultimă operație fiind urmată de alte 2 centrifugări consecutive, rezultând, după o ultimă operație, o stratificare a conținutului constând dintr-un supernatant apos, sub care este situat un strat intermediar, care sub el delimitează un sediment care conține componente organice și resturi de ADN, stratul superior este colectat prin pipetare, având un conținut de ADN cu lungimea moleculei de 30 kb, iar componentele din stratul intermediar și stratul inferior sunt puse din nou în contact cu soluția fenolică cu cloroform în raport 1:1 și centrifugate, iar supernatantul apos obținut se amestecă cu soluțiile apoase anterioare, apoi amestecul este supus unei centrifugări timp de 10 min rezultând din nou o soluție apoasă clară care se pipetează și se amestecă cu primele soluții clare, întreaga cantitate cumulată de soluție apoasă se centrifughează la o rotație de 6000xg în centrifuga cu răcire timp de 10 min, obținându-se din nou un mediu apos transparent, care în final este tratat cu 2 volume alcool etilic având o concentrație de 99%, după care rezultă prin precipitare un produs de culoare albă, constând din ADN pur cu o lungime a catenei de 30 kb, cu o puritate de 1,93...1,98, după care ADN-ul pur alb este introdus într-o soluție de fixare și conservare cu Manitol izoionizant într-un container steril frigorific pentru stocare.

Conform invenției, materialul biologic de concepție constă dintr-un produs de concepție umană, rezultat din întreruperi de sarcină voluntare licite, avort până la 3 luni, cu indicație vitală sau inseminare artificială nedorită, donate de pacient în condiții legale.

Produsul de concepție *in vivo* este reprezentat prin oul fecundat de spermatozoid din care se dezvoltă prin mai multe faze anatomofiziologic placenta, embrionul și anexele.

În cazul în care materialul biologic de concepție constă și din celule extrase sau cultivate prin tehnici cunoscute în domeniu, după parcurgerea centrifugării cu răcire, rezultă un reziduu constând din resturi de proteine degradate și o soluție apoasă care conține ADN, din care reziduul este extras și conservat pentru cercetare într-un container steril, iar soluția apoasă (conținând ADN) urmează a fi tratată în vederea obținerii ADN-ului.

Un alt obiectiv al invenției este un extract biologic constituit din ADN înalt polimerizat sub formă de genom complet, cu o lungime a catenei de minimum 30 Kb, activ, având o greutate moleculară de 5×10^6 , un grad de puritate de 1,93...1,98, insolubil în apă pură, instabil în acizi diluați sau alcalii, o vâscozitate stabilă la modificarea temperaturii, lipsit de reacții imunologice la pacienții tratați de noi, germeni, fungi sau virusuri, bine tolerat de culturi celulare umane *in vitro*, de organisme animale și de cel uman.

Un alt obiectiv este un extract biologic constituit dintr-o componentă constând din reziduul rezultat după centrifugarea cu răcire, utilizat pentru studierea structurii sale și o componentă constând din ADN înalt polimerizat sub formă de genom complet.

Un alt obiectiv al invenției este o compoziție constituită din extractul biologic constituit din ADN înalt polimerizat sub formă de genom complet cu o lungime a catenei de minimum 30 Kb, activ, având o greutate moleculară de 5×10^6 , un grad de puritate de 1,93...1,98 și excipienți acceptabili farmaceutic (manitol, NaCl etc.) pentru procesare ca pulbere, tablete sau soluție, în vederea utilizării în patologia umană.

Un alt obiectiv al invenției este utilizarea compoziției pentru afecțiunile măduvei, de preferință, având efect asupra leucopeniei și scăderea imunitară, care includ și pe cele datorate iradierii sau citostaticelor în timp de pace sau război atomic, sau efectului altor factori mutageni fizici, chimici sau biologici și metabolici, produsul acționând ca o microproteză biologică, plombând zonele de intron mutate și apoi eliminate prin episcopie, după tehnica Genetic Surgery.

RO 128006 B1

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:	1
- atât sursa de extragere, cât și locul și sfera de recoltare, asigură obținerea facilă a unui ADN uman biologic activ în formula de genom complet;	3
- utilizarea ADN-ului biologic activ obținut, sub formă de medicament, în tratarea patologiei umane, în care ADN-ul este element final cheie în efectul terapeutic obținut;	5
- produsul prin administrare are o bună tolerabilitate, lipsă de efecte secundare și prezintă efecte de vindecare definitive, în unele afecțiuni tratate de noi;	7
- stabilitate a medicamentului timp îndelungat privind proprietățile fizico-chimice și de comportament, depozitare și transport;	9
- procedeul folosește tehnici uzuale de laborator;	
- substanța obținută nu conține germeni patogeni și nici ciuperci, este bine tolerată de culturi celulare umane <i>in vitro</i> ;	11
- prin introducerea ADN înalt polimerizat în culturi celulare tumorale umane, s-au observat modificări morfologice care indică faptul că produsul ar fi activ (dar lipsește proba timpului);	13
- proprietățile ADN-ului utilizat ca agent terapeutic sunt în funcție de gradul de polimerizare;	15
- metoda de producere a ADN-ului este rapidă (2...4 h) față de zile sau luni ca în cazul altor metode;	17
- procesarea ADN-ului este posibilă cu tehnici clasice în pulbere liberă, încapsulată, tablete sau soluții de instilare sau injectare i.m. sau perfuzii;	19
- ADN înalt polimerizat biologic activ genom complet, exercită o acțiune de revalorificare, de normalizare atât asupra ansamblului metabolismelor deficitare cât și derivate ale organismului;	21
- acțiunea ADN-ului prin administrarea în organismul bolnav se realizează prin reinforțarea la normal a ADN-ului modificat sub acțiunea factorilor mutageni;	23
- ADN-ul obținut conform invenției, ca atare fiind un acid, nu are încărcătură nocivă și de agresiune imună a caroseriei celulelor stem ca atare, nu dă reacții imunologice de rejectare a produsului;	25
- ADN-ul se reface rapid în țesuturile puțin diferențiate și în tumori;	27
- produsul final este "germ free", este acid și mediul de păstrare este de asemenea bactericid;	29
- metoda se extinde la utilizarea în patologia umană a celulelor stem, dar care acționează prin ADN-ul mitocondrial și nuclear din structura lor;	31
- utilizarea procedeului nostru face pozitiv raportul cost/eficiență, comparat cu alte procedee.	33
Este cunoscut faptul că ADN-ul este o macromoleculă cu greutate moleculară de ordinul milioane (5x10 ⁶). Această greutate variază în funcție de specia biologică care a constituit sursa de extracție, de metoda de extracție folosită, de metoda de determinare a greutății moleculare. ADN-ul este practic insolubil în apa pură, din cauza mărimii enorme a moleculelor și a încărcăturii electronegative din apă. De aceea, ADN se dizolvă în soluție salină apoasă, la care pentru eliminarea efectelor falsificante ale ionilor bivalenți și inhibarea unor activanți nucleazici, se adaugă un agent chelator, de preferință, citrat de sodiu. Structura elicoidală este instabilă în acizi diluați sau alcalii. Ea este de asemenea distrusă prin căldură la un pH neutru. Gradul înalt de polimerizare al ADN-ului are influență directă asupra proprietăților acestuia.	35
ADN reprezintă componenta de bază specifică a aparatului genetic, materialul genetic care asigură ereditatea, variabilitatea și determinismul caracterelor, ordinea succesiunii nucleotidelor reprezentând un „COD”, mesajul ADN, a programului de activitate a întregii vieți celulare. Cantitatea intranucleară de ADN este constantă pentru o specie dată, variațiile ei traducând fenomene fiziopatologice importante.	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49

Micșorarea metabolismului ADN se constată în senescența și procese tumorale, unde cantitatea variază puțin, dar structura ADN este modificată (depimerizarea moleculei în senescența, și ADN anormal în tumori). Sub acțiunea tratamentului radioterapie și cariolitic, razele X, citostaticele degradează ADN normal și tumoral, depimerizându-l și jonează sinteza proteică, acțiunea în ansamblu fiind eficientă, în măsura în care ADN-ul tumoral este mai fragil. În ajunare și regim hipoproteic, cantitatea de ADN scade în organele active, vitale, ca suprarenale, pancreas, organe limfatice, creier, cord și altele. Numeroase substanțe terapeutice influențează negativ metabolismul ADN, printre care derivații salicilați, uretanici, fenilbutazonele, sulfamidele, acidul folic, antibioticele, care acționează prin competiție datorită similitudinii stereochemice sau prin blocaj enzimatic. Alterările structurii unei molecule de ADN, antrenează obligatoriu malformația enzimei (a proteinei funcționale) care depinde de această moleculă. Această enzimă își pierde valoarea sa funcțională, ceea ce antrenează o alterare a metabolismului pe care îl controlează și ca urmare o perturbare clinică dată (boală).

Extractul biologic, conform invenției, constând din ADN înalt polimerizat biologic activ genom complet, exercită o acțiune de revalorificare, de normalizare atât asupra ansamblului metabolismelor deficitare cât și derivate ale organismului, iar acțiunea ADN-ului prin administrarea în organismul bolnav realizează reinformarea la normal a ADN-ului modificat sub acțiunea factorilor mutageni.

Datorită faptului că ADN-ul ca atare este un acid, nu are încărcătură nocivă și de agresiune imună ca și celulele stem ca atare, extractul biologic, conform invenției, nu dă reacții imunologice de rejectare a produsului.

Ca tehnică de producere, metoda de obținere a ADN-ului este rapidă (16...20 h) în comparație cu zile sau luni ca în cazul celulelor stem (izolate din celule fertilizate *in vitro*, culturi de celule, din placenta, cordon ombilical), iar dotările în aparatură și personal sunt speciale și scumpe.

Procedeeul, conform invenției, din care se obține extractul biologic constând din ADN, implică tehnici clasice, compoziția pe baza extractului constituit din ADN putând fi procesat în pulbere liberă, încapsulată, tablete sau soluții de instilare sau injectare i.m., sau perfuzii după tehnicile uzuale.

Compoziția pe bază de ADN, conform invenției, se poate aplica în numeroase afecțiuni, cum ar fi infarctul de miocard, diabetul, în boli degenerative de îmbătrânire ca Parkinson sau Alzheimer, boli traumatice medulare hemiplegii, boli psihice, sau mai exact boli genetice de diverse tipuri, defecte ale genelor din ADN ca de exemplu hipertensiunea arterială în care este perturbată gena *czp 11 b1* sau *czp 11 b2*.

Apariția acum 20 ani a celulelor stem reprezintă un mare progres în cercetarea aplicativă medicală, trebuind a fi înțeleasă doar ca o etapă intermediară a efectelor aplicării lor. Ele reprezintă o formă în rolul și acțiunea lor ca celule nediferențiate care au posibilitatea de a se transforma mimetic în orice fel de țesut al organismului omenesc, dar numai sub acțiunea ADN-ului. Aceste celule încep să-și demonstreze unele calități corectoare introduse cu scop terapeutic în patologia umană, însă în aceeași măsură folosirea lor ridică unele probleme de diverse feluri încă incomplet cercetate și elucidate. Celulele stem pot apărea în două ipostaze, ca și celule embrionare sau celule mature, adulte, fiecare având calitățile lor, dar în aceeași măsură defectele lor.

Deși celulele stem embrionare sunt mai active, sunt pluripotente și din punct de vedere mitotic, și al diviziunii mult asemănătoare cu celulele din mitoza cancerului, nu se cunoaște dacă ele nu depășesc limitele normalului odată introduse în organism, evoluând spre multiplicare haotică, determinată de numărul mare administrat, imitând diviziunea canceroasă.

Celulele stem adulte ca sursă, preluate din cordonul ombilical prin complexe măsuri de inginerie genetică, reprezintă o grefă (auto, homo sau xeno grefă) și nicidecum un transplant cum greșit se etichetează în literatură (diferența esențială de tehnologie și implicații procedurale, vezi: **prof. dr. Pop de Popa, „Implantologia în chirurgia cardiovasculară”, Rev. Hipocrat, nov-dec 2010**). Acestea sunt supuse legilor imunologice, mergând uneori în cazul homogrefelor sau xenogrefelor până la reject (exceptând cazul autogrefelor), metoda fiind astfel compromisă.

Celulele din cordonul ombilical și placentă sunt celule adulte care și ele se supun legilor biologice de supraviețuire. având capacitate limitată de transformare mimetică tisulară. Ele se dezvoltă până la maturitate în luni de zile, până a putea să fie administrate și eficiente terapeutic, făcând adesea inoperantă procedura vizavi de pacientul în așteptare. Administrarea lor poate transmite uneori, în lipsa unor măsuri preliminare, afecțiuni ca HIV/SIDA etc., prin masa celulară a transportorului.

Putem afirma faptul că celulele stem nu acționează prin ele însele, fiind doar vectori, iar ceea ce le caracterizează efectul reparator este ADN-ul mitocondrial și nuclear din structura lor.

În prezent, utilizarea celulelor stem este limitată la doar două afecțiuni, leucemiile și limfoamele maligne, cu rezultate bune prin utilizarea de celule stem medulare.

Se dau, în continuare, 2 exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Se prelevează și se conservă într-un container steril un material biologic care constă dintr-un produs de concepție umană, rezultat din întreruperi de sarcină voluntare, avort până la 3 luni, cu indicație vitală sau inseminare artificială nedorită, donate de pacient în condiții legale, după care materialul biologic este triturat și introdus într-o eprubetă sterilă de centrifugă, în care este adăugat un volum egal de soluție fenolică cu cloroform în raport de 1:1, până când amestecul are o valoare pH de 7,8...8, moment în care amestecul este supus unei agitări până la obținerea unei omogenizări a emulsiei, după care emulsia este supusă unei centrifugări timp de 1 minut la temperatura camerei la o rotație de maximum 14000xg, după care centrifugarea este oprită și se reia în același regim timp de 10 min, această ultimă operație fiind reluată de alte 2 centrifugări consecutive, rezultând după o ultimă operație o stratificare a conținutului constând dintr-un supernatant apos, sub care este situat un strat intermediar, care sub el delimitează un sediment care conține componente organice și resturi de ADN, stratul superior este colectat prin pipetare, având un conținut de ADN cu lungimea moleculei de 30 kb, iar componentele din stratul intermediar și stratul inferior sunt puse din nou în contact cu soluția fenolică cu cloroform în raport 1:1 și centrifugate, iar supernatantul apos obținut se amestecă cu soluțiile apoase anterioare, apoi amestecul este supus unei centrifugări timp de 10 min rezultând din nou o soluție apoasă clară care se pipetează și se amestecă cu prima soluție clară, întreaga cantitate cumulată de soluție apoasă se centrifughează la o rotație de 6000xg în centrifuga cu răcire timp de 10 min, obținându-se din nou un mediu apos transparent, care în final este tratat cu 2 volume alcool etilic având o concentrație de 99%, după care rezultă prin precipitare un produs de culoare albă, constând din ADN pur cu o lungime a catenei de 30 kb, cu o puritate de 1,93...1,98, după care ADN-ul pur alb este introdus într-o soluție de fixare și conservare într-un container steril cu azot lichid pentru stocare.

Produsul rezultat este ADN înalt polimerizat sub formă de genom complet, cu o lungime a catenei de minimum 30 Kb, activ, având o greutate moleculară de 5×10^6 , un grad de puritate de 1,98, insolubil în apă pură, instabil în acizi diluați sau alcalii, o viscozitate stabilă la modificarea temperaturii, lipsit de reacții imunologice, germeni, fungi sau virusuri, bine tolerat de culturi celulare umane in vitro, de organisme animale și de cel uman.

În prezent, realizăm extragerea ADN prin metoda automată rapidă.

În continuare, se efectuează testele standard cunoscute în domeniu pentru determinarea gradului de sterilitate (microbi, paraziți, virusuri), se testează toleranța pe animale de laborator, prin administrare per os sau parenteral. După îndeplinirea condițiilor fizice chimice și de toleranță, produsul se procesează sub formă de pulbere, tablete, soluții de instilat și de injectat intramuscular sau perfuzii după metode cunoscute în tehnica din domeniu.

Exemplul 2. Acest exemplu prezintă o comparație ADN versus celule STEM.

Se prelevează și se conservă într-un container steril frigorific un material biologic care constă din celule stem extrase sau cultivate prin tehnici cunoscute în domeniu, după care materialul biologic este triturat și introdus într-o eprubetă sterilă de centrifugă în care este adăugat un volum egal de soluție fenolică cu cloroform în raport de 1:1, până când amestecul are o valoare pH de 7,8...8, moment în care amestecul este supus unei agitări până la obținerea unei omogenizări a emulsiei, după care emulsia este supusă unei centrifugări timp de 1 minut la temperatura camerei la o rotație de maximum 14000xg, după care centrifugarea este oprită și se reia în același regim timp de 10 min, această ultimă operație fiind reluată de alte 2 centrifugări consecutive, rezultând după o ultimă operație o stratificare a conținutului constând dintr-un supernatant apos, sub care este situat un strat intermediar, care sub el delimitează un sediment care conține componente organice și resturi de ADN, stratul superior este colectat prin pipetare având un conținut de ADN cu lungimea moleculei de 30 kb, iar componentele din stratul intermediar și stratul inferior sunt puse din nou în contact cu soluția fenolică cu cloroform în raport 1:1 și centrifugate, iar supernatantul apos obținut se amestecă cu soluțiile apoase anterioare, apoi amestecul este supus unei centrifugări timp de 10 min, rezultând din nou o soluție apoasă clară care se pipetează și se amestecă cu prima soluție clară, întreaga cantitate cumulată de soluție apoasă se centrifughează la o rotație de 6000xg în centrifuga cu răcire timp de 10 minute, obținându-se din nou un mediu apos transparent, și un reziduu care se extrage și se stochează într-un container steril, urmând să fie supus analizei și unor cercetări pentru utilizare în teste clinice. Ca și la exemplul 1, mediul apos este tratat cu 2 volume alcool etilic având o concentrație de 99%, după care rezultă prin precipitare un produs de culoare albă, constând din ADN pur cu o lungime a catenei de 30 kb, cu o puritate de 1,93...1,98, după care ADN-ul pur alb este introdus într-o soluție de fixare și conservare într-un container steril cu azot lichid pentru stocare.

Produsul rezultat este ADN, cu o lungime a catenei de minimum 30 Kb, activ, având o greutate moleculară de 5×10^6 , un grad de puritate de 1,93, insolubil în apă pură, instabil în acizi diluați sau alcalii, o vâscozitate stabilă la modificarea temperaturii. Reziduu colectat este constituit din resturi de proteine degradate oligoelemente ce urmează a fi studiate. Produsul testat este inactiv terapeutic, dar cu efecte secundare din punct de vedere imunologic.

În continuare, se efectuează testele standard cunoscute în domeniu pentru determinarea gradului de sterilitate (microbi, paraziți, virusuri), toleranța (pe animale de laborator) și se emit buletinele de constatare corespunzătoare.

Teste clinice

Se dau în continuare rezultatele aplicării extractului biologic, conform invenției, constând din ADN înalt polimerizat sub formă de genom complet, având caracteristicile din exemplul 1, prin aplicare zilnică prin instilații, timp de 14 zile, cu perioade de observații din 8 în 8 h, la pacienți cu afecțiuni dermatologice și oftalmologice. Dozele variază în funcție de starea afecțiunii de la ¼ mg sau 1 mg ADN pe unitate de produs.

a) În oftalmologie, 140 pacienți cu diverse boli din care s-au tratat 80 pacienți cu chera-tite herpetice cu rezultate bune evidente, iar restul cu arsuri corneene fizice, chimice, plăgi, degenerescente maculare, conjunctivite ca și măsură de regenerare corneeană.

b). În dermatologie, pentru reîntinerirea pielii, în tratamentul unor forme de carcinoame și epiteliome cutanate, s-a obținut epitelizare la 6 cazuri de pacienți afectați, cu vindecare confirmată de examen electronomicroscopic.	1
S-a efectuat și un studiu comparativ privind efectul ADN-ului pur versus reziduu post a 2-a centrifugare.	3
Dacă la numeroși bolnavi cu combustii termice corneene, rezultatele aplicării ADN-ului pur au fost spectaculare prin epitelizare și vindecări durabile.	5
Rezultatele aplicării reziduuului au fost mai slabe sau chiar lipsă, asociate cu roșeață, disconfort dureri și lipsă de epitelizare. Aceasta reprezintă încă o dovadă că extragând ADN-ul din materialul biologic, rămâne o magmă inertă. Celula stem conținând ADN este un simplu transportor-vector al substanței active care este de fapt ADN-ul.	7
Se poate concluziona că în cazul aplicării ADN-ului provenit din materialul biologic conform exemplului 1 sau din celule stem, sunt evitate complicațiile imunologice datorate reziduuului testat provenit din procesarea celulelor stem. Prin urmare, acțiunea ADN-ului, indiferent de sursa din care este obținut, prin administrarea în organismul bolnav, realizează reînfrumusețirea la normal a ADN-ului modificat sub acțiunea factorilor mutageni, deci, ADN-ul constituie elementul final cheie în efectul terapeutic obținut. Această afirmație se bazează pe rezultatele cercetărilor noastre, prin introducerea ADN înalt polimerizat în culturi celulare tumorale umane, unde au fost observate modificări morfologice la nivel de celulă.	9
De asemenea se poate afirma faptul că ADN-ul participă în mod nemijlocit activ în structurarea și corectarea materialului viu, proteic, specific, fără a se consuma cantitativ în procesul de reacție, rămânând integru în final gata de a interveni într-un nou proces de sinteză.	11
În concepția noastră, ADN-ul este un element peren, dovadă că îl găsim prezent chiar și în fosile preistorice, fără a fi alterat de timp, putându-se a fi identificat prin mijloace specifice. ADN-ul reprezintă cheia care deschide lacătul cutiei cu misterele vieții organismului uman, utilizându-l apoi ca element de regenerare organică corectoare a unor boli.	13
În prezent, se desfășoară cercetări în următoarele aplicații ale compoziției care conține ADN înalt polimerizat, biologic activ, în forma de genom complet, conform invenției:	15
- boala de iradiere (terapeutică sau accidentală pe front sau unități nucleare, posibilitatea unui tratament preventiv în boala de iradiere, unde folosim administrarea preventivă nu numai curativă, știind că factorii mutageni fizici dezorganizează sau distrug ADN-ul, producând blocaj medular al măduvei hematopoietice și sistemul neural de relație și neurovegetativ;	17
- hematologie, leucemii, boala Hodgkin, limfoame maligne, blocaje medulare tulburări de coagulare hemofilie, leucopenii, trombocitopenii;	19
- cardiologie, în boli cu substrat genetic HTA, sau infarct miocardic, boli congenitale, implicații vasculare generative ASC, displaziile, boala Down;	21
- endocrinologie, afecțiuni cu caracter genetic, autoimun, influențând homeostazia endocrină a tiroidei, suprarenalei hipofize sistemului cromatin sferei genitale;	23
- diabet zaharat de tip 1-2 sindromul metabolic, obezitatea, dislipidemia;	25
- neurologie: boli degenerative Alzheimer, Parkinson, traumatisme medulare hemiplegii, scleroza multiplă, leziuni cerebrale;	27
- oncologie cu toate formele cunoscute de cancere viscerale (cerebral endocrine, pulmonare genitale renale, gastrointestinale hepatice) osoase tegumentare etc, infecțioase: tratament HIV/SIDA, viroze-herpes;	29
- transplantologia care prin aplicarea terapiei cu ADN conduce la creșterea toleranței și a gradului de compatibilitate a organelor transplantate sau a grevelor.	31

Revendicări

1. Procedeu de obținere a unui extract biologic, **caracterizat prin aceea că** se prelevează și se conservă într-un container steril frigorific un material biologic de concepție, după care materialul biologic este triturat și introdus într-o eprubetă sterilă de centrifugă în care este adăugat un volum egal de soluție fenolică cu cloroform în raport de 1:1, până când amestecul are o valoare pH de 7,8...8, moment în care amestecul este supus unei agitări până la obținerea unei omogenizări a emulsiei, după care emulsia este supusă unei centrifugări timp de 1 min la temperatura camerei la o rotație de maximum 14000xg, după care centrifugarea este oprită și se reia în același regim timp de 10 min, această ultimă operație fiind urmată de alte 2 centrifugări consecutive, rezultând, după o ultimă operație, o stratificare a conținutului constând dintr-un supernatant apos, sub care este situat un strat intermediar, care sub el delimitează un sediment care conține componente organice și resturi de ADN, stratul superior este colectat prin pipetare, având un conținut de ADN cu lungimea moleculei de 30 kb, iar componentele din stratul intermediar și stratul inferior sunt puse din nou în contact cu soluția fenolică cu cloroform în raport 1:1 și centrifugate, iar supernatantul apos obținut se amestecă cu soluțiile apoase anterioare, apoi amestecul este supus unei centrifugări timp de 10 min, rezultând din nou o soluție apoasă clară, care se pipetează și se amestecă cu primele soluții clare, întreaga cantitate cumulată de soluție apoasă se centrifughează la o rotație de 6000xg în centrifuga cu răcire, timp de 10 min, obținându-se din nou un mediu apos transparent, care în final este tratat cu 2 volume alcool etilic având o concentrație de 99%, după care rezultă prin precipitare un produs de culoare albă, constând din ADN pur cu o lungime a catenei de 30 kb, cu o puritate de 1,93...1,98, după care ADN-ul pur alb este introdus într-o soluție de fixare și conservare cu manitol izoionizant într-un container steril frigorific pentru stocare.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** materialul biologic de concepție constă dintr-un produs de concepție umană, rezultat din întreruperi de sarcină voluntare, având până la 3 luni, cu indicație vitală sau inseminare artificială nedorită, donate de pacient în condiții legale.

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** materialul biologic de concepție constă din celule stem extrase prin tehnici cunoscute în domeniu.

4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** materialul biologic de concepție constă din celule stem extrase prin tehnici cunoscute în domeniu, din care, după parcurgerea centrifugării la o rotație de 6000xg în centrifuga cu răcire timp de 10 min, rezultă un reziduu și o soluție apoasă care conține ADN, reziduu fiind extras și conservat într-un container steril pentru cercetare, iar soluția apoasă conținând ADN urmează a fi tratată în vederea obținerii ADN-ului procesat.

5. Extract biologic, obținut conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** este constituit din ADN înalt polimerizat sub formă de genom complet, cu o lungime a catenei de minimum 30 Kb, activ, având o greutate moleculară de 5×10^6 , un grad de puritate de 1,93...1,98, insolubil în apă pură, instabil în acizi diluați sau alcalii, o viscozitate stabilă la modificarea temperaturii, lipsit de reacții imunologice, germeni, fungi sau virusuri, bine tolerat de culturi celulare umane *in vitro*, de organisme animale și de cel uman.

6. Extract biologic, obținut conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că** este constituit dintr-o componentă constând din reziduu rezultat după centrifugarea cu răcire și o componentă constând din ADN înalt polimerizat sub formă de genom complet.

7. Compoziție pe baza extractului definit la revendicarea 5, **caracterizată prin aceea** 1
că este constituită din extractul biologic definit la revendicarea 5 și excipienți acceptabili 3
farmaceutic pentru procesare ca pulbere, tablete sau soluție în vederea utilizării în patologia 3
umană.
8. Utilizare a compoziției definite la revendicarea 7, pentru afecțiuni ale măduvei, de 5
preferință, având efect asupra leucopeniei și scăderea imunitară, care includ și pe cele datorate 7
iradierii sau terapiei cu citostatice în timp de pace sau război nuclear, sau efectului altor factori 7
mutageni fizici, chimici sau biologici și metabolici.

