



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2006 00886**

(22) Data de depozit: **14.11.2006**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28.01.2011** BOPI nr. 1/2011

(41) Data publicării cererii:
30.09.2009 BOPI nr. 9/2009

(73) Titular:
• **VRĂBIESCU ALEXANDRU,**
INTRAREA ANASONULUI, NR. 2,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **VRĂBIESCU ALEXANDRU,**
INTRAREA ANASONULUI, NR. 2,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 6083505 A; RO 120756 B1

(54) **UTILIZAREA DERIVAȚILOR ETANOLAMINEI ȘI A
SĂRURILOR SAU ESTERILOR ACESTORA CA
ADJUVANȚI VACCINALI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un adjuvant vaccinal utilizat pentru creșterea eficienței vaccinurilor antivirale, antibacteriene și antiparazitare, atât la om, cât și la animale. Adjuvantul vaccinal, conform invenției, conține, ca substanță activă, derivați de etanolamină, săruri sau esterii acestora, acceptabili farmaceutic, în care derivații de etanolamină sunt, de preferință, derivat

N-alchilat sau un ester al acestuia, de preferință un ester al acidului ftalic sau aminoftalic, și sărurile etanolaminei și ale derivaților acestora sunt săruri de adiție acidă cu acizi anorganici, de preferință sare clorhidrat.

Revendicări: 6

Examinator: **biochimist EREMIA LAURA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 123168 B1

1 Invenția se referă la utilizarea derivaților etanolaminei și a sărurilor sau esterilor
acestora, ca adjuvant vaccinal, folosit pentru proprietățile sale în creșterea eficienței vaccinurilor
3 antivirale, antibacteriene și antiparazitare, la om și animale.

 Este cunoscut, din **RO 120756**, efectul derivaților, sărurilor sau esterilor etanolaminei
5 în tratamentul bolilor inflamatorii și degenerative.

US 6083505 descrie o compoziție de adjuvant imunogen/vaccin, care conține un
7 agent imunogen într-o cantitate eficientă terapeutic pentru stimularea unui răspuns imun, și
sub formă de adjuvant de vaccin, un derivat de amină, 1H-imidazo[4,5-c]chinolin-4-amina,
9 într-o cantitate eficientă pentru creșterea răspunsului imun a agentului imunogen.

 Utilizarea de adjuvanți vaccinali, capabili a amplifica răspunsul imun indus de vaci-
11 nuri și a le face astfel eficiente în prevenirea sau tratamentul bolilor infecțioase, constituie,
în ultimele decenii, un obiectiv de prim ordin al cercetărilor din domeniul imunologiei, ca
13 urmare a ineficienței vaccinurilor folosite în prevenirea sau combaterea mai multor boli infec-
țioase cu largă răspândire, ce amenință grav starea de sănătate a populației și care nu pot
15 fi controlate cu actualele mijloace terapeutice.

 Statisticile arată că anual se îmbolnăvesc și mor pe glob, zeci și sute de milioane de
17 persoane din cauza bolilor infecțioase, pe primul plan, fiind SIDA, malaria, tuberculoza și
gripa.

 De exemplu, în ceea ce privește îmbolnăvirile și decesele în întreaga lume, din
19 statisticile OMS, rezultă că: de malarie, se îmbolnăvesc anual peste 300 milioane de oameni
și mor mai mult de 1 milion; de gripă, se îmbolnăvesc anual 3...5 milioane de oameni și mor
21 250.000-500.000; de SIDA, sunt bolnave aproximativ 40 milioane de persoane, iar numărul
deceselor a ajuns la peste 20 milioane; aproape 2 miliarde de oameni au tuberculoză latentă,
23 iar, anual, se îmbolnăvesc 8 milioane și mor 2 milioane de oameni de această boală.

 Situația a devenit și mai critică odată cu identificarea, în ultimii 25 de ani, a cel puțin
25 alte 22 noi boli infecțioase, cauzate de: *Ebola virus*, *Legionella pneumophila*, HIV, *Hepatitis*
C, *Escherichia coli* O157:H7, *Human herpesvirus* tip 6, *Chlamydomphila pneumoniae*,
27 *Cytomegalovirus* sau alte virusuri, toate boli severe cu prognostic sever, pentru care nu au
putut fi realizate vaccinuri sau tratamente eficiente.
29

 O situație asemănătoare se constată la animale, unde gripa aviară, pseudopesta
31 aviară și pesta porcină provoacă imense pierderi de efective, cu consecințe grave pentru
hrana și sănătatea populației.

 Demonstrativă în acest sens a fost epizootia de gripă aviară din 2005-2006, care a
33 cuprins numeroase țări din Asia și Europa. În absența unui vaccin contra gripei aviare, a fost
necesară sacrificarea a zeci de milioane de păsări, pentru a stăvili răspândirea epizootiei.
35 Totodată, a existat și pericolul producerii unei epidemii la oameni, după ce au avut loc mai
multe cazuri de trecere a virusului H5N1 de la pasăre la om.
37

 Totuși, după cum este cunoscut, folosirea vaccinării, în scopul prevenirii sau
39 combaterii bolilor infecțioase, a constituit una dintre marile reușite ale medicinei. Exemple
sunt: scăderea cu 90 până la 100% a mortalității și morbidității prin boli contagioase la copii,
41 eradicarea variolei și dispariția poliomielitei în Europa și America de Nord, reducerea
importantă a îmbolnăvirilor cu difterie, tetanos, tuse convulsivă, rujeolă, oreion, rubeolă,
43 *Haemophilus influenzae*, tip b.

 La animale, s-a reușit, de asemenea, diminuarea sau eradicarea unor boli infecțioase
45 cu largă răspândire.

 Aceste rezultate excepționale au generat speranța că vaccinarea ar putea constitui
47 mijlocul cel mai eficient și mai puțin costisitor de a preveni sau trata și alte boli infecțioase
care, prin frecvența și gravitatea acestora, amenință starea de sănătate și viața oamenilor
49 și a animalelor, și induc, totodată, o serie de consecințe cu efect negativ asupra dezvoltării
societății.

RO 123168 B1

Și totuși, speranța pusă în vaccinări a scăzut, pe măsură ce s-a constatat că în cazul multor altor boli infecțioase decât cele menționate mai sus, vaccinurile elaborate nu sunt eficiente sau au o eficiență redusă.	1 3
Cercetările au arătat că principala cauză a ineficienței vaccinurilor constă în imunogenicitatea scăzută a antigenelor folosite la prepararea vaccinurilor. Din această cauză, răspunsul imun umoral (anticorpi, citokine) și cel celular (limfocite T citotoxice/ citolitice, celule NK) sunt insuficient de puternice, pentru a putea opri răspândirea agenților patogeni în organism și a elimina celulele infectate.	5 7
Cel mai frecvent, este deficitar răspunsul imun mediat celular, considerat a fi cel mai important în protecția față de virusurile și bacteriile intracelulare, dar și față de infecțiile cu protozoare.	9 11
Pentru a remedia această situație, în ultimele două decenii, au fost efectuate cercetări intense și costisitoare, având ca scop producerea de vaccinuri cu imunogenicitate crescută. Astfel, cu ajutorul tehnologiilor moderne, au fost create vaccinuri pe bază de peptide sau de proteine subunit, vaccinuri biosintetice, recombinante și altele, în încercarea de a obține vaccinuri capabile să stimuleze o producție mai mare de limfocite T citolitice.	13 15
Totuși, rezultatele nu sunt încurajatoare. Astfel, vaccinurile pe bază de peptide nu reușesc, în general, să producă răspunsuri în celule T citolitice, suficient de puternice pentru a produce efecte terapeutice. Alte tipuri de vaccinuri, cum sunt proteinele subunit sau preparatele cu organisme inactivate, induc în general un răspuns celular cu limfocite T CD4 și nu cu limfocite T CD8, care sunt citolitice. În unele cazuri, imunogenicitatea s-a dovedit a fi mai redusă decât a celorlate vaccinuri.	17 19 21
Față de eficiența scăzută a celor mai multe vaccinuri, cercetătorii s-au gândit să folosească anumite substanțe chimice, care dețin proprietatea de a induce un răspuns imun umoral și celular mai puternic decât cel produs de vaccinuri, pentru ca, asociindu-le acestora, să le mărească eficiența. Principiul constă în provocarea unui răspuns imun puternic, fără specificitate patogenă, care să se transforme, apoi, datorită vaccinului, într-un răspuns antigen-specific cu mare eficacitate terapeutică.	23 25 27
Aceste substanțe au primit denumirea de „adjuvanți vaccinali” și reprezintă, astăzi, un grup numeros și foarte heterogen de substanțe, ca de exemplu, emulsii uleioase, endotoxine, colesterol, acizi grași, amine alifatiche, uleiuri parafinice și vegetale, săruri de aluminiu, monophosphoryl lipid A, ISCOMs, Syntex adjuvant formulations (SAFs), Oligodeoxynucleotide ș.a.	29 31 33
Dintre adjuvanții admiși a fi folosiți împreună cu vaccinurile, sărurile de aluminiu (aprobat de FDA, în SUA) sunt cel mai des folosite, pentru capacitatea acestora de a induce un răspuns bun în anticorpi și de a stimula producția de celule imune care prezintă antigenul. Au însă o capacitate redusă de a stimula răspunsul imun mediat celular.	35 37
Dintre adjuvanții aflați încă în studiu, fac parte cei din clasa deoxicitidil-deoxiguanozin oligodeoxi-nucleotidelor (CpG ODNs), care pot induce o mare varietate de citokine și pot activa celulele B, monocitele, celulele dendritice și celulele NK. Celulele T nu sunt, însă, activate direct de către CpG-ODNs, acestea neputându-se lega de suprafața celulei T.	39 41
Un alt adjuvant propus este Cholera holotoxin, mult folosit în cercetările pe animale de laborator și care se pare că stimulează atât imunitatea umorală, cât și imunitatea mediată celular. Nu poate fi folosit însă, la om, din cauza efectelor sale toxice, chiar și în doze mai mici de 5 μg.	43 45
Dintre produșii naturali, <i>gamma</i> -interferonul este folosit pentru a mări titrul anticorpilor și nivelul celulelor Thelper. Nu stimulează însă imunitatea mediată celular.	47

RO 123168 B1

1 ISCOM este un complex de substanțe care favorizează răspunsul imun mediat celu-
lar, dar din cauza acțiunii hemolitice și a reacțiilor locale, este autorizat numai pentru
3 vaccinări veterinare.

În acest context, apare esențial faptul că în pofida amplelor și costisitoarelor cercetări
5 ce se întreprind în numeroase laboratoare din lume, de mai mulți ani, încă nu au fost găsite
soluții viabile, de adjuvanți capabili să facă eficiente vaccinurile antivirale, antibacteriene și
7 antiparazitare, astfel încât să poată fi folosite cu succes în prevenirea sau tratamentul bolilor
infecțioase.

În aceste condiții, obiectivul actual, major, în cercetările privind folosirea vaccinărilor
9 pentru prevenirea bolilor infecțioase, îl constituie identificarea de noi adjuvanți vaccinali,
capabili să includă un puternic răspuns imun, în special, în celule T citotoxice/citolitice.

Identificarea unor astfel de noi adjuvanți vaccinali este dorită de cercetători și în
13 vederea dezvoltării de vaccinuri terapeutice, capabile să combată o serie de boli severe, cum
sunt cancerul, tuberculoza, SIDA, hepatita, boala Alzheimer, boala vacii nebune (boala
15 Creutzfeldt-Jakob) și altele asemenea, pentru care tratamentele actuale se dovedesc prea
puțin eficiente.

Problema, pe care o rezolvă prezenta invenție, constă în utilizarea derivaților
17 etanolaminei și a sărurilor și a esterilor acestora, ca adjuvanți vaccinali, la prepararea unui
vaccin de uz uman și veterinar.

Utilizarea conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că noul
21 adjuvant vaccinal este capabil să inducă un puternic răspuns imun, atât umoral, cât mai ales
mediat celular, cu celule T citotoxice/citolitice.

Adjuvantul vaccinal, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- induce stimularea puternică a mitogenezei limfocitare, proliferarea și diferențierea
25 limfocitelor la nivelul țesuturilor limfoide (măduvă osoasă, timus, splină, ganglioni limfatici).
Studiul histopatologic mai arată că modificările induse de adjuvant sunt reversibile, acestea
27 reducându-se, treptat, după încetarea tratamentului, pentru a reveni la aspectul inițial după
5...8 săptămâni;

- induce o creștere semnificativă a numărului de limfocite circulante B (producătoare
29 de anticorpi) și T (citotoxice/citolitice) activate, capabile de a acționa nespecific față de pro-
vocările agenților patogeni infecțioși. Creșterea are loc treptat, în cursul a 2...4 săptămâni
31 de administrare a adjuvantului, și scade, de asemenea, treptat, în următoarele 4...7 săptă-
mâni după oprirea tratamentului, în funcție de doză și durata tratamentului cu adjuvantul
33 vaccinal, conform invenției;

- prezența unui mare număr de celule imune, activate în sânge, indusă de adjuvantul
35 vaccinal, conform invenției, constituie un teren favorabil, mult superior celui indus de adju-
vanții cunoscuți, pentru producerea unui răspuns antigen-specific umoral și celular mult mai
37 amplu și mai eficient decât cel produs de vaccinul singur;

- deține și alte proprietăți biologice importante, utile în combaterea proceselor
39 infecțioase, și anume antiinflamatoare și antioxidantă, descrise în **RO 120756**, proprietăți
exercitate prin blocarea sintezei și eliberării de anioni superoxizi de către neutrofilele și
41 monocitele aflate la locul inflamației, și prin intensificarea funcțiilor citotoxice și supresoare
ale limfocitelor. Aceste proprietăți fac posibilă blocarea și suprimarea procesului inflamator,
43 ceea ce concordă cu efectul produs de adjuvant, împreună cu vaccinul terapeutic și grăbește
procesul de vindecare. O altă proprietate biologică a etanolaminei, utilă în combaterea bolilor
45 infecțioase, este aceea de a crește activitatea citokinelor antiinflamatorii (**EP 0774252 A1**).
În alte cercetări, au fost descrise proprietăți antifungice pentru clorhidratul esterului acidului
47 aminoftalic cu dimetilaminoetanoiul (**RO 102816**) și pentru etanolamină, în infecțiile cu
49 *Trychophyton mentagrophytes* (*Chemical Abstracts*, Columbus, US, 1982, vol. 96, nr. 25);

RO 123168 B1

- permite folosirea unor cantități mai mici de antigen decât în prezent, la prepararea vaccinurilor, ceea ce conduce la reducerea costurilor de producție și la creșterea capacităților de producție a vaccinurilor;	1
- adjuvantul conform invenției este foarte bine tolerat de către organism, nu produce efecte secundare și toxice, nu este carcinogen sau mutagen, nu creează obișnuință;	3
- la avantajele menționate mai sus, se adaugă și faptul că prepararea și condiționarea adjuvantului vaccinal, conform invenției, precum și procedeele de aplicare nu necesită costuri mari, ceea ce îl face accesibil și utilizabil pe scară largă.	5
Noul adjuvant vaccinal, conform invenției, conține etanolamină sau derivați ai acesteia, de preferință, derivații clorurați sau N-alchilați, precum și săruri sau esteri, acceptabili farmaceutic. Derivații N-alchilați sunt monoetilaminoetanolul și monometilaminoetanolul, de preferință, dietilaminoetanolul și dimetilaminoetanolul, sarea fiind o sare de adiție cu acizi anorganici sau organici, de preferință, sarea clorhidrat. Esterii sunt, de preferință, esteri ai acidului ftalic sau aminoftalic cu dietilaminoetanolul, sau esteri ai acidului fosfatidic cu etanolamină.	7
Datele din literatură atestă faptul că etanolamina din molecula compușilor sau derivaților menționați mai sus este principalul factor al stimulării proliferării celulare, datorită efectelor sale promitogene, descrise la nivelul diferitelor organe sau țesuturi.	9
Astfel, s-a arătat că administrarea de clorhidrat de etanolamină, la șobolanul cu hepatectomie parțială, intensifică proliferarea celulelor hepatice, fără administrarea altor factori de creștere (<i>Proc. Natl. Acad. Sci., USA</i> , vol. 94, pp. 7320...7325, iulie 1997).	11
Alte cercetări au demonstrat necesitatea prezenței etanolaminei, a fosfatidiletanolaminei sau glicerofosforiletanolaminei în mediul de cultură, ca factori stimulatori al creșterii și multiplicării celulelor hepatice (<i>Exp. Cell. Res.</i> , 1996, nov., 25; 229(1):20-6); (<i>J. Cell. Biochem.</i> , 2002; 84(2):249-63).	13
Etanolamina induce nu numai sinteza de ADN, dar și proliferarea hepatocitelor din cultură cu alți factori de creștere, fiind un factor de coreplicare ce promovează ciclul celular al celulelor mature spre faza G(2)/M în prezența factorilor de creștere (<i>J. Cell. Biochem.</i> , 2002; 84(2):249-63).	15
Rezultate asemănătoare au fost descrise și în cazul proliferării altor celule, ca de exemplu, al celulelor de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Mol. Biol. Cell.</i> , 2001, aprilie; 12 (4): 997-1007) al culturilor de fibroblaști (<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 1996, martie, 7 ; 220(1): 125-30) sau de keratocite umane, când este necesară prezența etanolaminei sau fosfoetanolaminei în mediul de cultură (<i>J. Cell. Physiol.</i> , 1982, feb; 110(2):219-29; <i>J. Cell. Physiol.</i> , 1982, feb.; 110(2):219-29). S-a mai constatat că fără etanolamină în mediul de cultură, scade cantitatea de fosfatidiletanolamină din lipidele membranare, este inhibată formarea rețelelor intercelulare și este oprită proliferarea celulară (<i>In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.</i> , 2001, nov-dec; 37(10):691-7).	17
În cazul celulelor hibridoma, efectul produs de etanolamină este egal cu cel al fosfoetanolaminei, dar în concentrație de 10 ori mai mare (<i>Proc. Natl. Acad. Sci., USA</i> . 1982, feb; 79(4): II 58-62).	19
Alți analogi ai etanolaminei, cum sunt de exemplu N-metil (MeEtn) și N,N-dimetil (Me ₂ Etn) au, de asemenea, efecte promitogene asupra proliferării celulare (<i>Eur. J. Biochem.</i> , 1998, apr. 1; 253(I):10-9).	21
În prezenta invenție, este valorificat efectul promitogen al etanolaminei și a analogilor acesteia, produs asupra celulelor imune, descris, pentru prima oară, în RO 120756 , prin folosirea acestora ca adjuvanți vaccinali, cu scopul de a amplifica răspunsul imun al vaccinurilor, îndeosebi al celor cu imunogenicitate scăzută. Efectul este descris în detaliu în cazul folosirii dietilaminoetanolului, clorhidrarului de dietilaminoetanol și al esterilor acidului ftalic sau aminoftalic al dietilaminoetanolului.	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49

RO 123168 B1

1 În esență, în prezenta invenție, se propune, pentru prima oară, folosirea etanolaminei
sau a derivaților acesteia ca adjuvanți vaccinali. Propunerea are la bază proprietatea acestor
3 substanțe de a stimula organele limfoide pentru a produce un puternic răspuns imun umoral
și celular, așa cum este redat în exemplele 1 și 2, care ilustrează efectul de intensă stimulare
5 a mitogenezei limfocitare la nivelul organelor limfoide și de proliferare a limfocitelor B și T
circulante.

7 Datorită etanolaminei sau a derivaților acesteia, se obține o stare de activare a sis-
temului imun, deosebit de favorabilă declanșării de către antigenul din vaccinul administrat,
9 împreună cu adjuvantul conform invenției, a unui puternic răspuns imun umoral și celular,
capabil a acționa cu succes în prevenirea sau tratamentul bolii infecțioase pentru care se
11 administrează vaccinul.

13 Adjuvantul vaccinal, conform invenției, se folosește împreună cu un vaccin specific
acelor agenți infecțioși a căror acțiune patogenă urmează a fi prevenită sau combătută, și
anume: virusuri, bacterii, paraziții.

15 Modul de administrare a adjuvantului vaccinal constă în administrarea zilnică, timp
de câteva săptămâni, până la obținerea unei puternice stimulări imune, după care se admi-
17 nistrează, în paralel, vaccinul a cărui eficiență trebuie mărită.

19 De menționat este faptul că, dată fiind diversitatea virulenței agenților patogeni, a
căilor de pătrundere în organism, a structurilor și a mecanismelor imune, precum și a reac-
21 tivității proprii fiecărei specii, este necesară identificarea, descrierea și standardizarea proce-
deelor de aplicare a adjuvantului, împreună cu vaccinul, în fiecare boală infecțioasă și pentru
fiecare specie, în parte. În principal, se stabilesc doza și durata de administrare a adjuvan-
23 tului, precum și doza și momentul optim de administrare a vaccinului.

25 În ceea ce privește modul de administrare a adjuvantului vaccinal, conform invenției,
la om, se recomandă administrarea zilnică a acestuia, timp de 15-60 zile, în doze de
15...300 mg/kg corp. Administrarea vaccinului se face, în una sau mai multe reprize, conform
27 indicațiilor proprii de utilizare, după 15...50 zile de la începerea aplicării adjuvantului.

29 În ceea ce privește căile de administrare a adjuvantului vaccinal, conform invenției,
se prevede aplicarea acestuia pe mucoase (nazală, orală, căi respiratorii, intestinală, geni-
tală, rectală) sau pe piele, precum și prin injecții intramusculare, intravenoase, subcutanate.

31 Administrarea adjuvantului, în asociere cu vaccinul, la nivelul mucoasei, este
preferată, întrucât produce o amplificare a răspunsului imun, la însăși locul de pătrundere
33 a celor mai mulți agenți patogeni, acționându-se astfel mai eficient în prevenirea infecției.

35 Administrarea parenterală a adjuvantului, în asociere cu un vaccin, este folosită mai
ales la persoanele cu deficiențe imune care se manifestă și la vârstnici. Administrarea
parenterală are ca scop producerea unei stimulări cât mai puternice a celulelor imune din
37 organele limfoide, sistemul circulator, țesuturi și mucoase, pentru a le pregăti să răspundă
numeroaselor provocări venite din mediul înconjurător și totodată pentru a favoriza răspunsul
39 imun antigen-specific, indus de vaccinuri.

41 La animale, administrarea adjuvantului, conform invenției, se face, de preferință, pe
cale orală (în hrană) sau parenterală, de obicei, prin injecții intramusculare, în doze de
30...300 mg/kg corp și, respectiv, 15...200 mg/kg corp.

43 Adjuvantul vaccinal, conform invenției, este formulat sub formă de: soluții nazale,
orale sau pentru aerosoli și spray, tablete, capsule sau granule, soluții injectabile, capsule
45 moi, loțiuni, sirop, pulbere, plasture adeziv, supozitoare, gel, cremă, unguent.

47 Soluțiile pentru administrarea la nivelul mucoasei se pot prepara prin dizolvarea
adjuvantului vaccinal în apă distilată, tamponarea și condiționarea cu aditivi farmaceutici
obișnuiți, ambalarea în recipiente specifice formei de administrare.

RO 123168 B1

Tabletele, capsulele sau granulele se pot prepara prin amestecul adjuvantului vaccinal cu aditivi farmaceutici obișnuiți, cum sunt lactoza, amidonul, celuloza cristalină, talcul și alții asemănători.	1 3
Soluțiile injectabile se pot prepara prin dizolvarea adjuvantului vaccinal în ser fiziologic, în formă acceptabilă farmaceutic și înfiolarea în condiții sterile.	5
Capsulele moi se pot prepara prin amestecul adjuvantului vaccinal cu uleiuri vegetale, emulsii uleioase sau altele asemănătoare, după care sunt umplute capsulele moi cu produsul obținut.	7
Siropul se poate obține prin dizolvarea adjuvantului vaccinal într-o soluție apoasă, conținând zahăr, D-sorbitol, carboximetilceluloză și altele asemenea, după care se adaugă un conservant, cum este metilparahidroxibenzoat sau alții asemenea.	9 11
Gelul se poate prepara cu carboximetilceluloză sau alt produs asemănător, majorat în apă distilată fierbinte. Se adaugă circa 5 ml de glicerină. Se majorează timp de 15...20 min, după care se adaugă adjuvantul vaccinal în stare lichidă.	13
Crema se prepară prin amestecul adjuvantului vaccinal cu mirisat de izopropil, stearat de glicol, glicerol cetearil, propilenglicol, conservanții <i>p</i> -hidroxibenzoat de metil și <i>p</i> -hidroxibenzoat de <i>n</i> -propil și apă purificată.	15 17
În continuare, sunt prezentate patru exemple privind proprietățile imunostimulatoare ale adjuvantului vaccinal, conform invenției, exemple care au rolul de a ilustra invenția și nu de a o limita.	19
Exemplul 1. Au fost efectuate investigații histopatologice ale organelor limfoide la două specii de animale, în vederea evidențierii efectelor produse la acest nivel de adjuvantul vaccinal, conform invenției.	21 23
a. Iepuri masculi Chinchilla, în greutate de 2000 g, au fost injectați i.m. zilnic, timp de 3...5 săptămâni, cu 15 mg/kg adjuvant conform invenției, ca substanță activă, și anume clorhidrat de dietilaminoetanol, formulată sub formă de soluție în ser fiziologic, de concentrație 6%, după care au fost sacrificați: un grup după 3 săptămâni și altul după 5 săptămâni de administrare, iar ultimele două grupuri, după 4 și 7 săptămâni de la terminarea administrării adjuvantului. Au fost examinate histopatologic: măduva osoasă, timusul, splina și ganglionul limfatic popliteal.	25 27 29
<i>Rezultate</i>	31
Comparativ cu martorii, la iepuri injectați cu adjuvant, examenul histopatologic a pus în evidență următoarele:	33
- la nivelul măduvei osoase, a avut loc o hiperplazie celulară cu numeroși limfoblaști. După 4 și 7 săptămâni de la oprirea administrării adjuvantului, numărul de elemente blastice se reduc treptat, revenind la normal;	35
- la nivelul timusului, în zona cortico-medulară, se constată o hiperplazie corticală, cu numeroși blaști în corticală și mitoze în medulară. După 7 săptămâni de la oprirea injecțiilor, se observă o moderată hiperplazie în corticală, în general, un aspect apropiat de cel găsit la martori;	37 39
- la nivelul splinei, are loc o hiperplazie a foliculilor limfoizi, cu mari centri germinativi. După 4 săptămâni de la oprirea injecțiilor, se menține o marcată hiperplazie cu centri germinativi, iar după 7 săptămâni, nu se mai observă decât o slabă hiperplazie a pulpei albe și o îngroșare a ariei marginale;	41 43
- la nivelul ganglionilor limfatici, se constată o marcată hiperplazie foliculară și paracorticală, numeroși centri germinativi și imunoblaști intra și perifolicular, a căror prezență scade treptat după oprirea tratamentului.	45 47

RO 123168 B1

1 b. Șobolani Wistar masculi, în greutate de 200 g, au fost injectați i.m. zilnic cu adjuvant conform invenției, 15 mg/kg corp, timp de 5 săptămâni, după care au fost sacrificați,
3 pentru examenul histopatologic al timusului și splinei.

Rezultatele au arătat următoarele, în comparație cu martorii:

5 - la nivelul timusului, după 5 săptămâni de administrare a adjuvantului, se observă o marcată hiperplazie corticală și numeroși blaști;

7 - la nivelul splinei, are loc o hiperplazie a foliculilor limfoizi, cu centri germinativi și hiperplazie a ariei marginale. Hiperplazia se menține și după 8 săptămâni de la oprirea administrării adjuvantului, dar cu mai puțini centri germinativi.

9 În concluzie, la ambele specii de animale, administrarea adjuvantului a condus la o puternică stimulare a țesuturilor limfoide examinate, caracterizată prin hiperplazie celulară, creșterea numărului și dimensiunilor foliculilor limfoizi și a centrilor germinativi, creșterea numărului de blaști și de mitoze.

15 Aceste modificări sunt prezente într-o mai mică măsură după 4 și 7...8 săptămâni de la oprirea administrării adjuvantului, ceea ce arată că efectul stimulator asupra structurilor limfoide este de lungă durată, dar tranzitoriu, fără efecte secundare.

17 **Exemplul 2.** Au fost efectuate investigații hematologice și de citometrie în flux, în vederea evidențierii efectelor produse de adjuvantul vaccinal, conform invenției, asupra elementelor figurate ale sângelui. În acest scop, iepuri masculi Chinchilla, în greutate de 2000 g, au fost injectați i.m. zilnic, timp de 5 săptămâni, cu 15 mg/kg adjuvant vaccinal, conform invenției, ca substanță activă, formulat ca în exemplul 1.

23 S-a constatat o creștere importantă a numărului de limfocite circulante, cu 62,4% față de nivelul inițial. În ceea ce privește subpopulațiile limfocitare, se constată creșteri de 41,0% pentru limfocitele B, de 38,0% pentru limfocitele T, iar dintre acestea, limfocitele Th au crescut cu 10,7% și limfocitele Tc+Ts, cu 57,8% (tabelul de mai jos).

Tabel

27 *Modificări ale celulelor seriei albe sanguine la iepuri, după administrarea de adjuvant conform invenției*

Celule din seria albă sanguină	Înainte de tratament		După tratamentul cu adjuvant		Modificări produse
	%	Nr/litru de sânge	%	Nr/litru de sânge	
Leucocite *)	-	7,940 x 10 ⁹	-	9,687 x 10 ⁹	+22,0
Limfocite *)	50,5	4,019 x 10 ⁹	67,0	6,527 x 10 ⁹	+62,4
Limfocite B**)	4,0	0,164 x 10 ⁹	3,5	0,231 x 10 ⁹	+41,0
Limfocite T **)	73,0	2,933 x 10 ⁹	62,1	4,053 x 10 ⁹	+38,0
Limfocite Th**)	30,6	1,230 x 10 ⁹	20,9	1,364 x 10 ⁹	+10,7
Limfocite Tc+Ts***)	-	1,703 x 10 ⁹	-	2,688 x 10 ⁹	+57,8

41 *) determinare hematologică; **) = determinare prin citometric în flux; ***) = valoare dedusă din limfocitele 1-Th.

43 Datele de mai sus pun în evidență capacitatea adjuvantului vaccinal, conform invenției, de a induce creșteri importante ale numărului de celule limfocitare, îndeosebi limfocite Tc+Ts, în sângele periferic, constituind un adevărat baraj de apărare în calea agenților patogeni. Se obține astfel o stimulare importantă a imunității mediate celular, pregătită să inducă un puternic răspuns imun celular specific față de antigenul din vaccin.

RO 123168 B1

Exemplul 3. După cum este cunoscut, gripa este rezultatul infectării cu unul dintre cele 3 tipuri de bază ale virusului ce face parte din familia *Orthomyxoviridae*. Epidemiile variază în severitate, în funcție de subtipul de virus implicat. Vârșnicii prezintă cel mai mare risc de a face complicații din cauza gripei.

Deși, într-un caz de gripă, este solicitat un puternic răspuns imun contra tulpinei ce a provocat-o, viteza cu care se poate schimba această tulpină și, deci antigenul, mărește posibilitatea producerii unei noi infecții. De aceea, imunizarea cu vaccinul antigripal s-a dovedit a fi de un ajutor moderat în reducerea extinderii și severității unei noi epidemii și face necesară o schimbare periodică a tulpinilor ce stau la baza preparării vaccinurilor.

Utilizarea adjuvantului vaccinal, conform invenției, face să crească răspunsul imun în celule T citotoxice specifice antigenului din vaccinul antigripal, făcându-l astfel mult mai eficient decât actualele vaccinuri antigripale. Totodată, datorită reactivității încrucișate pe care o manifestă celulele T citotoxice în recunoașterea diferitelor subtipuri de viruși ai gripei A, răspunsul imun celular specific, indus de adjuvant + vaccin, poate avea eficacitate și asupra altor subtipuri de virus, măbind astfel sfera de acțiune a vaccinului, spre deosebire de răspunsul imun umoral, indus de actualele vaccinuri antigripale, care este strict specific fiecărui subtip de virus și deci cu eficacitate mai restrânsă.

Un alt efect al folosirii adjuvantului conform invenției este acela că poate preveni scăderea limfocitelor T din sânge, în special, a celulelor CD8 cu proprietăți citolitice, indusă de virus în faza acută a gripei. Prin aceasta, cresc capacitățile sistemului imun al gazdei de a combate virusul.

În ceea ce privește aplicațiile în domeniul veterinar, trebuie amintit că gripa este o infecție zoonotică, care infectează, de asemenea, porcii, păsările, caii și focile. Pandemia din 1918, care a provocat decesul a milioane de oameni, se crede că a provenit de la porci.

Pentru prevenirea îmbolnăvirii subiecților umani cu virusul gripei A, se procedează astfel:

- se administrează adjuvantul vaccinal, conform invenției, ca substanță activă, și anume diesterul [2-(dietilamino)-etil] al acidului italic diclorhidrat, sub formă de gel, cu carboximetilceluloză, la nivelul mucoasei nazale, câte 0,5 ml în fiecare nară, de 3 ori pe zi, timp de 30 zile. Cu acelaș scop, adjuvantul pot fi administrat sub formă de aerosoli sau pe cale orală sau parenterală;

- în ziua a 20-a, se administrează, la nivelul mucoasei nazale sau intramuscular, vaccinul antigripal conținând virusul gripei A, atenuat sau inactivat.

Rezultate

- Prin aplicarea vaccinului antigripal, administrat în asociere cu adjuvantul conform invenției, se obține o eficacitate a vaccinării de aproape 100%, față de aproximativ 80% rată la persoanele tinere și adulte și aproximativ 50...60% la persoanele vârstnice sau la persoanele cu boli cronice, după administrarea vaccinului antigripal fără adjuvant.

- Datorită faptului că celulele T citotoxice, a căror proliferare este stimulată de adjuvant, prezintă plasticitate și heterogenitate în recunoașterea diferitelor subtipuri de virus gripal A, protecția pe care o oferă este mult mai largă, ceea ce poate fi de mare ajutor în cazul unei epidemii cu alte subtipuri decât cele anticipate în momentul preparării vaccinului antigripal.

Exemplul 4. În acest exemplu, s-a aplicat o schemă asemănătoare de administrare a adjuvantului plus un vaccin specific în boli infecțioase la animale.

Astfel, pentru a preveni îmbolnăvirea cu pestă porcină, adjuvantul vaccinal este administrat pe cale orală, în hrană, zilnic, sub formă de granule, în doză de 45 mg/kg corp, obținută din amestecul a 76,5 g adjuvant conform invenției, ca substanță activă, și anume esterul 4-nitro 1,2-dietilaminoetilfталat clorhidrat, sub formă de pulbere, în amestec cu talc 14 g, carboximetilceluloză 6 g și citrat de sodiu 3,5 g, sau pe cale parenterală, în injecții i.m.,

RO 123168 B1

1 în doză de 15 mg/kg corp, din soluția obținută din 5 g adjuvant conform invenției, ca sub-
3 stanță activă, și anume esterul 4-nitro 1,2-dietilaminoetilfitalat clorhidrat, dizolvat în 100 ml
ser fiziologic, împreună cu benzoat de sodiu 4,8 g. După 30 de zile, se administrează vac-
5 cinul antipestă porcină. Se folosesc vaccinuri cu virus inactivat sau vaccinuri subunit.

7 Rezultatele obținute indică o bună imunizare a porcilor contra pestei porcine, cu o
durată asemănătoare imunizării induse de virusul viu atenuat, interzis de a fi folosit în țările
europene.

9 Prin asocierea adjuvantului conform invenției, cu vaccinul inactivat sau cu vaccinul
subunit, este prevenită îmbolnăvirea animalelor sau aplicarea de măsuri de eutanasiere,
11 pentru a împiedica răspândirea epizootiei, cu consecințele economice dăunătoare
cunoscute.

13 Infecția cu pesta porcină poate fi folosită ca un bun exemplu, pentru a evidenția
efectele produse de asocierea adjuvantului vaccinal, conform invenției, la vaccin, întrucât
15 prin proprietățile adjuvantului de a stimula structurile limfoide, expansiunea clonală a celu-
lelor B și T, și creșterea numărului de limfocite circulante, pot fi contracarate leziunile pe care
17 le induce virusul, încă din prima săptămână de boală, la nivelul organelor și țesuturilor imune,
și anume: atrofia măduvei osoase, cu moartea celulelor hematopoietice, apoptoza limfo-
19 citelor și megakariocitelor, distrugerea progresivă a țesuturilor limfoide din măduva osoasă,
timus și splină, leucopenie cu distrugerea subpopulațiilor de limfocite T CD4 și CD8.

RO 123168 B1

Revendicări

- | | |
|---|----|
| | 1 |
| 1. Utilizare a derivaților etanolaminei și a sărurilor sau esterilor acestora, acceptabili farmaceutic, ca adjuvanți vaccinali, la prepararea unui vaccin de uz uman și veterinar. | 3 |
| 2. Utilizare conform revendicării 1, caracterizată prin aceea că derivatul de etanolamină este un derivat N-alchilat sau un ester al acestuia. | 5 |
| 3. Utilizare conform revendicării 2, caracterizată prin aceea că derivatul N-alchilat al etanolaminei este, de preferință, dietilaminoetanol și dimetilaminoetanol. | 7 |
| 4. Utilizare conform revendicărilor 2 și 3, caracterizată prin aceea că esterul derivatului N-alchilat al etanolaminei este un ester al acidului ftalic sau aminoftalic. | 9 |
| 5. Utilizare conform revendicării 1, caracterizată prin aceea că derivații sunt esteri ai acidului fosfatidic cu etanolamină. | 11 |
| 6. Utilizare conform revendicării 1, caracterizată prin aceea că sărurile etanolaminei și a derivaților acesteia sunt săruri de adiție acidă cu acizi anorganici, de preferință, sarea clorhidrat. | 13 |
| | 15 |



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