



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 00959

(22) Data de depozit: 11.10.2010

(66) Prioritate internă:
30.07.2010 RO a 2010 00684

(41) Data publicării cererii:
28.12.2012 BOPI nr. 12/2012

(71) Solicitant:
• POP DE POPA IOAN, STR. CLUCERULUI
NR.37A, ET.2, AP.5, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• POP DE POPA DOINA,
STR. CLUCERULUI NR.37A, ET.2, AP.5,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• POP DE POPA IOAN, STR. CLUCERULUI
NR.37A, ET.2, AP.5, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• POP DE POPA DOINA,
STR. CLUCERULUI NR.37A, ET.2, AP.5,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

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

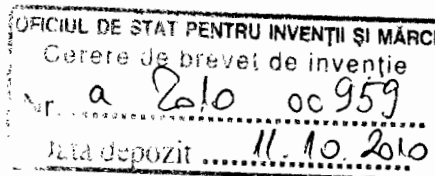
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a unui extract biologic, o compoziție pe baza acestuia și utilizarea compoziției pentru tratarea unor afecțiuni din patologia umană cu substrat genetic, produse prin mutații determinate de agenți mutageni. Metoda conform invenției constă din tratarea unui material biologic cu un volum egal de soluție fenolică cu cloroform în raport 1:1, până când amestecul are o valoare pH de 7,8...8, sub agitare continuă, după care emulsia omogenizată este supusă unor centrifugări succesive, cu separarea straturilor formate, iar întreaga cantitate cumulată de soluție apoasă este tratată cu 2 volume alcool etilic de concentrație 99%, după care rezultă, prin precipitare, un extract biologic de culoare albă, cu o lungime a catenei de 30 kb, care este introdus într-o soluție de fixare și conservare cu manitol izoionizant, într-un container steril frigorific, pentru stocare. Extractul biologic, conform invenției, are o greutate moleculară

de 5×10^6 , un grad de puritate de 1,93...1,98, este 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. Compoziția conform invenției este constituită din extractul biologic și excipienți acceptabili farmaceutic, pentru procesare ca pulbere, tablete sau soluție, și este utilizată pentru afecțiunile determinate de agenți mutageni sau în cele ale măduvei, având efect asupra leucopeniei și scăderii imunitare, care includ și pe cele datorate iradierii sau terapiei cu citostatice, sau efectului altor factori mutageni, de preferință în domeniile oftalmologie, dermatologie, hematologie, oncologie, transplantologie.

Revendicări: 8





Metodă de obținere a unui extract biologic, extract biologic, compoziție pe baza acestuia și utilizarea compoziției

Invenția se referă la o metodă de obținere a unui extract biologic, 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 documentația brevetului US 4908206 o metodă 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 5000Da și lipsită de resturi din degradarea proteinelor. De asemenea, din acest material se cunoaște utilizarea extractelor obținute ca ingrediente activi în preparate farmaceutice utilizate în tratamentul reducerii fluxului cerebral și în tratamentul acneei vulgaris.

Un alt material în temă este brevetul FR 2599972 care se referă la o metodă 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.

Metoda 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, Vandrely și Vandrely, 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 Hu și colab. (WO 00/73421 intitulată "Methods of isolation, cryopreservation, and therapeutic use of human amniotic epithelial cells," publicată decembrie 7, 2000) în care, dintr-o sursă constând din placentă se extrag celulele 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 membrane amniotice prin disecție,

iar celulele recuperate se diferențiază în țesuturi epiteliale cum ar fi epiteliul suprafeței corneei sau epiteliul vaginal.

Dezavantajul acestei metode este modul de lucru intensiv și obținerea cu randamente joase de celule stem.

O altă metodă de obținere a unui extract biologic este descrisă în brevetul 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 brevetul 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.

Cererea de brevet EP 140134 descrie o metodă de obținere a unui preparat dintr-un extract biologic activ din organe de animale și culturi celulare care conține substanțe biologic active cu masa 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. Metoda nu face referire la niciun organ embrionic. Extractele se utilizează pentru normalizarea propagării de fibroblaste.

Un alt document este brevetul DE 3524794 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 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.

Se cunosc din brevet US 5486359 compoziții care cuprind celule stem mezenchimale (hMSC) derivate din măduvă pentru linii celulare mezenchimale.

Dezavantajul constă din problemele legate de necesitatea recoltării de măduvă sau de celule de periost de la un donator.

Din brevetul US 7468276 se cunoaște o metodă 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, brevetul se referă și la compoziții farmaceutice care cuprind celule stem de tip embrionic formulate ca soluții

11-10-2010

injectabile

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).

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. Colectivul de la Tg. Mureș, sub conducerea prof. dr. Ioan Pop de Popa a verificat ipoteza dr. Octavian Udriște privind vindecarea cancerului uman cutanat prin administrare de ADN uman, rezultatele fiind publicate în documentul menționat, ulterior, studiile în acest sens fiind sistate.

Brevetul RO 119509 se referă la o compoziție de concentrat proteic, embrionar, îmbogățit în peptide, utilizată ca supliment nutritiv, și la un procedeu de obținere a acesteia.

Soluțiile din tehnica în domeniu care prezintă administrarea preparatelor embrionare prezintă următoarele dezavantaje:

-forme 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-adminstrarea 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.

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.

Primul obiectiv al invenției este o metodă 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 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 $\frac{3}{4}$ din 14000×g, după care centrifugarea este oprită și se reia în același regim timp de 10 minute, 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 30kb, 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 6000×g în centrifuga cu răcire timp de 10 minute, 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 30kb, 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, avort până la 3 luni, cu indicație vitală sau inseminare artificială nedorită, donate de pacient în condiții legale sau celule stem extrase sau cultivate prin tehnici cunoscute în domeniu (placentă, cordon ombilical).

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

În cazul în care materialul biologic de concepție constă și din celule stem 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 reziduuul 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 30Kb,

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 vâzozitate 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.

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 30Kb, 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.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- 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;
- 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;
- produsul prin administrare are o bună tolerabilitate, lipsă de efecte secundare și prezintă efecte de vindecare definitive;
- stabilitate a medicamentului timp îndelungat privind proprietățile fizico-chimice și de comportament, depozitare și transport;
- procedeul folosește tehnici uzuale de laborator;
- substanța obținută nu conține germeni patogeni și nici ciuperci, este bine tolerată de culturi celulare umane in vitro, de organisme animale și de cel uman
- prin introducerea ADN înalt polimerizat în culturi celulare tumorale umane s-au observat modificări morfologice care indica evoluția spre normalizare a celulelor prin refacerea genotipului și cariotipului;
- proprietățile ADN utilizat ca agent terapeutic sunt funcție de gradul de polimerizare;
- metoda de producere a ADN-ului este rapidă (16-20 ore) față de zile sau luni ca în cazul celulelor stem;
- procesarea ADN-ului este posibilă cu tehnici clasice în pulbere liberă, încapsulată, tablete sau soluții de instilare sau injectare im, sau perfuzii.
- ADN înalt polimerizat biologic activ genom complet, exercită o acțiune de revalorificare, de normalizare atât asupra ansamblului metabolismelor deficitare cât și derivate ale organismului;

- acțiunea ADN-ului prin administrarea în organismul bolnav se realizează prin reînformarea la normal a ADN-ului modificat sub acțiunea factorilor mutageni
- 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 da reacții imunologice de rejectare a produsului;
- ADN-ul se reface rapid în țesuturile puțin diferențiate și în tumori;
- produsul final este germ free, este acid și mediul de păstrare este de asemenea bactericid;
- metoda se extinde la utilizarea în patologia umană a celulelor stem, dar care acționează prin ADN-ul mitocondrial și nuclear din structura lor.

Este cunoscut faptul că ADN-ul este o macromoleculă cu greutate moleculară de ordinul milioane (5x 10⁶). Această greutate variază 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.

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.

Micșorarea metabolismului ADN se constată în senescenta și procese tumorale, unde cantitatea variază puțin dar structura ADN este modificată (depolimerizarea moleculei în senescenta, și ADN anormal în tumori). Sub acțiunea tratamentului radioterapic și cariolic, razele X, citostaticele degradează ADN normal și tumoral depolimerizându-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).

Se prezintă în continuare o paralelă între extractul biologic constând din ADN înalt polimerizat cu genom complet utilizat în cadrul compoziției conform invenției și celulele stem atât embrionare cât și adulte.

Extractul biologic, conform invenției, constând din ADN înalt polimerizat biologic activ genom complet, exercita 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 reînformarea 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 da reacții imunologice de rejectare a produsului.

În cazul celulelor embrionare chiar STEM a căror evoluție mitotică poate fi imprevizibilă, putând evolua până la mimarea mitozelor din cancer, acestea pot transmite HIV/SIDA LUES, TBC.

Din contră, în metoda de preparare a extractului biologic conținând ADN, conform invenției, aceste celule (HIV/SIDA LUES), chiar prezente sunt distruse, produsul final fiind germ free (selectare donatori, utilizarea în procesul tehnologic a ultrafiltrării, centrifugarea, alcoolizarea finală, etc.,)

Ca tehnică de producere, metoda de obținere a ADN-ului este rapidă (16-20 ore) 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.

Metoda, 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 aplică 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 măsura 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 haotica determinată de numărul mare administrat imitând diviziunea canceroasă.

Celulele STEM adulte ca sursă preluate din cordonul ombilical prin complexe masuri de inginerie genetică reprezintă o greșă (auto, homo, sau xeno greșă 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 vis a vis de pacientul în așteptare. Administrarea lor poate transmite uneori, în lipsa unor masuri 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.

O problemă deosebită în unele cercuri o reprezintă problema etica morală religioasă, în care oamenii de știință practicând aceste cercetări au un punct diferit de vedere.

În unele țări ca: Ungaria, Norvegia, Irlanda, Italia, cercetările asupra embrionilor sunt interzise. Alte țări ca: Spania, Suedia, Finlanda, Statele Unite ale Americii, au autorizat cercetările asupra embrionilor înregistrând cele mai revoluționare rezultate, inclusiv numeroase premii Nobel. Oamenii de știință spun că este de neconceput să oprești aceste cercetări atâta timp cât ele sunt în slujba salvării de vieți, în virtutea unor concepții imaginare, fără fundament real. ADN-ul este un produs de laborator depersonalizat juridic.

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 14000×g, după care centrifugarea este oprită și se reia în același regim timp de 10 minute, 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 30kb, 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 6000×g în centrifuga cu răcire timp de 10 minute, 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 30kb, 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 30Kb, 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, funghi sau virusuri, bine tolerat de culturi celulare umane in vitro, de organisme animale și de cel uman.

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 care se emit buletinele de constatare corespunzătoare. După îndeplinirea condițiilor fizice chimice și de comportament, produsul se procesează sub formă de pulbere, tablete, solutii 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 14000×g, după care centrifugarea este oprită și se reia în același regim timp de 10 minute, 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 30kb, 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 6000×g 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 30kb, 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 30Kb, 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. Reziduuul colectat este constituit din resturi de proteine degradate.

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 ore la pacienți cu afecțiuni dermatologice și oftalmologice.

Dozele variază în funcție de starea afecțiunii de la $\frac{1}{4}$ mg sau 1 mg ADN pe unitate de produs.

a) -în oftalmologie la peste 140 pacienți s-au tratat cheratite herpetice cu rezultate evidente, arsuri corneene fizice, chimice, plăgi, degenerescențe maculare, conjunctivite ca și măsura de regenerare corneeană și în cheratoplastii.

b).- în dermatologie, pentru reîntinerirea pielii, în tratamentul unor forme de carcinoame și epitelioame cutanate s-a obținut epitelizare la 6 cazuri de pacienți afectați, cu vindecare confirmată de examen electronomicroscopic.

2.- S-a efectuat si un studiu comparativ privind efectul ADN-ului pur versus reziduu post a 2-a centrifugare.

Daca la numeroși bolnavi cu combustii termice corneene rezultatele aplicării ADN-ului pur au fost spectaculare prin epitelizare si vindecari durabile, nu același lucru s-a observat la 2 martori prin aplicare doar de reziduu post centrifugare din care s-a extras ADN-ul.

Rezultatele aplicării reziduiului au fost slabe sau chiar lipsă, asociate cu roseata, disconfort dureri si lipsa de epitelizare. Aceasta reprezinta încă o dovada că extragând ADN-ul din materialul biologic, ramane o magma inertă. Celula STEM conținând ADN este un simplu transportor-vector al substanței active care este de fapt AND-ul.

Se poate concluziona că în cazul aplicării ADN-ul provenit din materialul biologic conform Exemplului 1 sau din celule STEM, sunt evitate complicațiile imunologice datorate reziduiului testat provenit din procesarea celulelor stem. Prin urmare, acțiunea ADN-ului indiferent de sursa din care este obținut, prin administrarea în organismul bolnav, realizează reinformarea 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, care indica normalizarea celulelor prin refacerea genotipului și cariotipului.

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.

În concepția noastră, ADN-ul este un element peren, dovadă că în 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 YALE care deschide lacătul cutiei cu misterele vieții organismului uman, utilizându-l apoi ca element de regenerare organică corectoare a unor boli.

În prezent se desfășoară cercetări în următoarele aplicații ale compoziției care conține ADN înalt polimerizat, biologic activ în forma de genom complet, conform invenției:

- boala de iradiere (terapeutică sau accidentală pe front sau unități nucleare, sindromul Golfului, unde folosim administrarea preventivă nu numai curativă știind că factorii mutageni fizici dezorganizează sau distrug ADN-ul producând blocaj medular al măduvei hematoformatoare și sistemul neural de relație și neurovegetativ;
- hematologie, leucemii, boala Hodkin, limfoame maligne, blocaje medulare tulburări de coagulare hemofilie, leucopenii, trombocitopenii;
- cardiologie, în boli cu substrat genetic HTA, sau infarct miocardic, boli congenitale, implicații vasculare generative ASC, displidemiile, boala Down;
- endocrinologie, afecțiuni cu caracter genetic, autoimun, influențând homeostazia endocrină a tiroidei, suprarenalei hipofize sistemului cromafin sferei genitale;
- diabet zaharat de tip 1-2 sindromul metabolic, obezitatea, dislipidemii;
- neurologie: boli degenerative Alzheimer, Parkinson, traumatisme medulare hemiplegii scleroza multiplă, leziuni cerebrale;
- oncologie cu toate formele cunoscute de cancere viscerale (cerebral endocrine, pulmonare genitale renale, gastrointestinale hepatice) osoase tegumentare etc, infecțioase : tratament HIV/SIDA, viroze-herpes;
- transplantologia care prin aplicarea terapiei cu ADN conduce la creșterea toleranței și a gradului de compatibilitate a organelor transplantate sau a grefelor.

Metodă de obținere a unui extract biologic, extract biologic, compoziție pe baza acestuia și utilizarea compoziției

Revendicări

1. Metodă de obținere a unui extract biologic **caracterizată 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 minut la temperatura camerei la o rotație de maximum $\frac{3}{4}$ din 14000×g, după care centrifugarea este oprită și se reia în același regim timp de 10 minute, 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 30kb, 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 6000×g în centrifuga cu răcire timp de 10 minute, 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 30kb, 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. Metodă conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că materialul biologic de concepție 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**

3. Metodă conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** materialul biologic de concepție constă și din celule stem extrase prin tehnici cunoscute în domeniu.
4. Metodă conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** materialul biologic de concepție constă și din celule stem extrase prin tehnici cunoscute în domeniu, din care, după parcurgerea centrifugării la o rotație de $6000 \times g$ în centrifuga cu răcire timp de 10 minute rezultă un reziduu și o soluție apoasă care conține ADN, reziduuul 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 30Kb, 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 vâcozitate 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 reziduuul 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 că** este constituită din extractul biologic definit la revendicarea 5 și excipienți acceptabili farmaceutic pentru procesare ca pulbere, tablete sau soluție în vederea utilizării în patologia umană.
8. Utilizarea compoziției definite la revendicarea 7 pentru afecțiunile măduvei, de preferință având efect asupra leucopeniei și scăderea imunitară care includ și pe cele datorate iradierii sau terapiei cu citostatice în timp de pace sau război nuclear sau efectului altor factori mutageni fizici, chimici sau biologici și metabolici.