



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00647**

(22) Data de depozit: **15/10/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2021 BOPI nr. **3/2021**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ"**,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **ENCIU ANA-MARIA**, STR. PLUGARILOR NR. 1, BL. 94, SC. A, AP. 15, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• **TANASE CRISTIANA**, CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P 34, SC.1, AP.30, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CODRICI ELENA**, STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII NR. 4, BL. PM 51, SC. 3, ET. 7, AP. 117, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **POPESCU IONELA DANIELA**, BD. THEODOR PALLADY, NR.4, BL.M2, SC.A, AP.28, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **MIHAI SIMONA**, BD. CAMIL RESSU NR. 76, BL. S1B-S1C, SC. B, AP. 34, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

• **ALBULESCU LUCIAN**, STR. ROȘIA MONTANĂ NR. 6, BL. 07, SC. C, ET. 2, AP. 125, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **DUDĂU MARIA**, STR.NOVACI, NR.4, BL.S9, SC.2, AP.60, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CODOREAN ELEONORA**, ALEEA HAIDUCULUI NR.1, BL.A 3, SC.1, ET.8, AP.33, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **ALBULESCU RADU NICOLAE AUREL**, STR. ROȘIA MONTANĂ NR. 6, BL. 07, SC.C, ET. 2, AP. 125, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **POP SEVINCI**, STR.POIANA, NR.4, AP.12, SIBIU, SB, RO;
• **BOBICĂ ADRIAN**, STR.EDY ENDRE, NR.12, AP.1, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **ȚÂRCOMNICU ANA-ISABELA**, STR.TURDA, NR.127, BL.2, SC.D, ET.5, AP.167, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CUCOLEA ELENA IULIA**, STR.CETĂȚII, NR.1350, SAT VÂNĂTORI, NT, RO;
• **COSTACHE ALEXANDRU TEODOR**, STR. COZLA, NR.8D, BL.A30, SC.A, ET.3, AP.10, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PRODUS DERIVAT DIN ULEIUL DE SEMINȚE DE CĂȚINĂ
CU EFECT REGENERATIV PE KERATINOCITELE NORMALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs derivat din uleiul de semințe de cătină cu efect regenerativ pe keratinocitele normale. Produsul, conform invenției, constă într-un preparat în formă solidă, liofilizat și resuspendat în soluție de etanol absolut, rezultând o fracție pură din uleiul de cătină sub forma unui lichid incolor, limpede, fără depuneri, cu miros de etanol, stabil în faza lichidă

la temperatura camerei și la refrigerare la temperaturi între 0 și -10°C, cu efect de stimulare a proliferării celulare la o concentrație de 40 μM.

Revendicări: 2
Figuri: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).

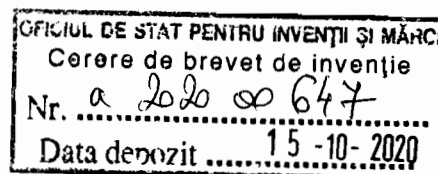


RO 134813 A0

Titlu cerere brevet: "Produs derivat din uleiul de semințe de cătină cu efect regenerativ pe keratinocitele normale"

Descriere

Stadiul cunoașterii:



Cătină [numită în prezent *Elaeagnus rhamnoides* (L.); fost nume *Hippophae rhamnoides* (L.)] este o plantă medicinală și aromatică unică, exploatată ca remediu natural. Familia *Elaeagnaceae* cuprinde 6 specii și 12 subspecii, dintre care *Hippophae rhamnoides*, cunoscută în mod obișnuit ca cătină, nisip sau afine, este o plantă unică, în prezent fiind domesticită în mai multe părți ale lumii (1). Crește în mod natural în climă temperată, având o distribuție largă în Asia și Europa (2). De asemenea, este cultivat în scopuri medicinale, în special în Europa de Nord, precum și în China și Rusia (3). Numele său (grecesc: hipopotami - cal și phao - strălucitor) este derivat din observațiile timpurii că caii hrăniți cu cătină ar deveni mai puternici și cu un strat mai strălucitor. Ulterior s-a descoperit că este înzestrat cu proprietăți curative pentru bolile gastro-intestinale, hepatita, tulburările cutanate și astmul și ca modalitate de prevenire a reumatismului (3).

Aproape fiecare parte a plantei (rădăcini, scoarță, frunze și fructe, cunoscute și sub numele de fructe de pădure) este exploatată în scopuri medicinale, datorită conținutului ridicat de substanțe chimice bioactive(3). Până în prezent, există multe date privind compoziția biochimică a fiecărei părți a plantei, metodele de extragere și îmbogățire a componentelor active și efectele biologice. Distribuția geografică, sezonul de recoltare și metoda de extracție pot modifica compoziția produselor dorite. O astfel de investigație atentă a condus la concluzia că cea mai valoroasă parte a cătinei este fructul. Poate cel mai cunoscut produs final al cătinei este uleiul, care poate fi extras din toată boabele, separat de suc sau extras din semințe. În funcție de originea și metoda de extracție (4), uleiul de cătină poate prezenta variații în compoziția biochimică, dar este apreciat în unanimitate pentru proprietățile sale antioxidante și antiinflamatorii. Constanța rapoartelor despre proprietățile benefice ale uleiului de cătină a determinat analiza detaliată a compușilor cu proprietăți bioactive, cunoscute acum ca fiind fenoli, flavonoizi și carotenoizi, precum și vitaminele liposolubile și precursorii acestora.

Deși sunt compuși bioactivi importanți în cătină, acizii grași (FA) au fost mai puțin cercetați în ceea ce privește efectele biologice. Uleiul de cătină este îmbogățit în FA saturată și nesaturată și are o concentrație neobișnuit de mare de acid palmitoleic, cu beneficii dovedite asupra sănătății pielii. Efectele de protecție ale cătinei FA asupra sistemului cardiovascular au fost, de asemenea, frecvent abordate în studii preclinice și clinice. Se știe mai puțin despre implicația acizilor grași în regenerarea celulară sau dacă acestea ar putea fi chiar implicate în tumorigeneză. În ceea ce privește efectele asupra pielii, dintre acizii grași, acidul palmitoleic este considerat a avea un efect regenerativ.

Prezentarea invenției:

Invenția se referă la un produs separat din uleiul de semințe de cătină cu efecte regenerative pe celulele keratinocite normale. Extragerea a fost realizată cu fluide supracritice (CO₂), iar caracterizarea atât cantitativă cât și calitativă prin cromatografia de înaltă performanță cuplată cu un detector MS/MS. Preparatul astfel realizat este apoi adus în formă solidă prin liofilizare și resuspendat în soluție de concentrație cunoscută cu etanol absolut. Se obține astfel lichid incolor, limpede, fără depuneri, elemente particulare sau suspensii vizibile, cu miros de etanol. Faza lichidă se păstrează atât la temperatura camerei cât și la refrigerare la temperaturi între 0 și -10°C. Produsul a fost supus unor teste de biocompatibilitate in vitro, utilizând modele în culturi celulare. S-au evaluat citotoxicitatea, proliferarea celulară, aderarea celulară și comportamentul în timp real pe timp mai îndelungat. Testele au demonstrat absența citotoxicității, o capacitate moderată de a promova proliferarea celulară, capacitatea de a stimula migrarea și de a induce repararea tisulară.

Problema tehnică

Metodele de separare ale compușilor bioactivi sunt variate și sunt ele însele sursă de variabilitate în rezultatele pe care le produc. Pentru constanța rezultatelor este nevoie de stabilirea unor parametri exacti.

În plus, unii compuși activi nu pot fi separați ca și compuși puri, ei fiind în amestec cu una sau mai multe componente. Un amestec face însă dificilă stabilirea cauzalității între un efect benefic și un compus. Din acest motiv, stabilirea unor condiții specifice de separare și caracterizarea produsul separat sunt puncte-cheie de care depinde obținerea unui produs specific.

Avantajul prezentei invenții

Prezenta invenție duce la obținerea unui produs specific, în urma aplicării un set de parametri care permit obținerea unei fracții pure din uleiul de cătină, fracție care poate fi caracterizată prin anumiți parametri fizico-chimici, ca de exemplu timpul de eluție în coloana de cromatografie.

Figuri

Figura. 1 Cromatograma probei injectate în coloana de cromatografie lichidă. Se observă separarea mai multor peakuri, la intervale specifice de timp.

Figura 1. Evaluarea proliferării celulare a fracțiilor purificate de partener și a acizilor grași comerciali corespunzători. 10 000 de celule au fost tratate în triplicat cu soluțiile prezentate în figură, la concentrațiile menționate, timp de 24, 48, 72h. Fiecare bară reprezintă media triplicatelor, corectată cu valoarea fundalului și raportată la media controlului. Pentru fiecare situație experimentală sunt prezentate trei valori, reprezentând, în ordine, mediile

valorilor obținute la 24, 48 și respectiv 72h. Pentru fracții sunt prezentate doar datele de la 24 și 48h.

Figura 3. Măsurarea în timp real a impedanței electrice a keratinocitelor normale tratate cu fracția purificată din uleiul de semințe de cătină

Se dau în continuare câteva exemple de aplicare a invenției

Exemplul 1

Modalitatea de obținere a produsului depinde de parametri specifici

Echipament

Pentru separarea acizilor grași din din Uleiul de catina a fost utilizat un sistem cromatografic compus din Cromatograful de lichide de inalta presiune PerkinElmer Flexar FX15 cuplat cu un detector PDA, acizii fiind separati pe o coloana semipreparativa Cosmosil 5C18-AR-2 cu o lungime de 150mm si un diametru interior de 20mm. Colectorul model Gilson FC 203B a permis colectarea individuala a fracțiilor eluate.

Parametrii metodei cromatografice:

Faza mobila: 95% Acetonitril si 5% H₂O

Debit pompa: 6ml/min

Detector: 208nm

Volumul de injectie: 400 uL

Timpul de achiziție al probelor a fost de 25 minute.

Compusii au fost separați din proba utilizând Colectorul de fracții conectat la tubulatura de ieșire din sistemul HPLC

Prepararea probei pt injectie și colectarea fracțiilor

150 mg de proba a fost diluata in 1 ml de etanol din care s-au injectat 400 ul in sistemul cromatografic. Peakurile care se observa in intervalul 4-7,5 (fig.1) nu prezinta un real interes ele ar putea fi diversi compusi care nu interactioneaza cu colona sau au un timp de retentie indelungat si elueaza din injectia precedent. Peak-urile colectate au fost cele identificate ca fiind Acidul Linolenic , Acidul Linoleic si Palmitoleic care au un timp de retentie foarte apropiat ceea ce face dificila separarea acestora cu metoda utilizata, astfel cele doua elueaza impreuna si formeaza un singur peak, urmate de Acidul Oleic si Acidul Palmitic. Acidul Oleic in urma analizei LC-MS a fost detectat in concentrații mari însă acesta prezintă o absorbantă mică la 208nm pe detectorul PDA, datorită lipsei cromoforilor ceea ce face dificilă detectarea

lui în forma sa naturală; pentru o mai bună detecție acesta poate fi derivatizat, însă acest procedeu îi schimbă structura chimică.

Exemplul 2

Produsul poate fi folosit pentru stimularea proliferării celulelor normale

Fracțiile separate prin cromatografie în fază lichidă de înaltă performanță (HPLC) au fost testate prin metoda MTS pe fibroblaste standardizate NIH 3T3 (standard ISO 10993) pentru evaluarea toxicității și a proliferării celulare. Aceste rezultate au fost comparate cu efectul standardelor analitice corespunzătoare de acizi grași (fig.2). Se observă ca fracția de interes (F4) exercită toxicitate mai mică decât standardul de acid gras corespunzător (PA). Din aceste rezultate s-a selectat o concentrație non-toxică, cu efect pe proliferarea celulară comparabil cu controlul (celule netrate), care a fost mai departe testată pe keratinocite normale (linie standardizată ATCC – NHEK). Aceste celule reprezintă populația majoritară a epidermei normale umane. Din monitorizarea proliferării celulare în timp real prin folosirea platformei xCELLigence se remarcă stimularea proliferării de către fracția purificată (F4) la o concentrație de 40μM (fig.3).

Bibliografie

1. Bal LM, Meda V, Naik SN, Satya S. Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmoceuticals. Food Res Int [Internet]. 2011 Aug;44(7):1718–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911001591>
2. Olas B, Skalski B, Ulanowska K. The Anticancer Activity of Sea Buckthorn [Elaeagnus rhamnoides (L.) A. Nelson]. Front Pharmacol [Internet]. 2018 Mar 15;9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00232/full>
3. Olas B. Sea buckthorn as a source of important bioactive compounds in cardiovascular diseases. Food Chem Toxicol [Internet]. 2016 Nov;97:199–204. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691516303234>
4. Kumar R, Kumar GP, Chaurasia O, Bala Singh S. Phytochemical and Pharmacological Profile of Seabuckthorn Oil: A Review. Res J Med Plant [Internet]. 2011 May 1;5(5):491–9. Available from: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=rjmp.2011.491.499>



Titlu cerere brevet: "Produs derivat din uleiul de semințe de cătină cu efect regenerativ pe keratinocitele normale"

Revendicări

1. Un produs obținut din uleiul de semințe de cătină prin extracție cu fluide supercritice, separat prin HPLC, care este adus în formă solidă prin liofilizare și resuspendat în soluție de concentrație cunoscută cu etanol absolut, caracterizat prin aceea că se colectează în anumite condiții prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) într-un interval specific de timp și prin aceea că este necesară o anumită concentrație pentru a exercita un efect biologic favorabil asupra celulelor normale ale pielii
2. Produsul resuspendat în soluție este un lichid caracterizat prin aceea că este incolor, limpede, fără depuneri, elemente particulare sau suspensii vizibile, și prin aceea că are miros de etanol și prin aceea că rămâne în fază lichidă atât la temperatura camerei cât și la refrigerare la temperaturi între 0 și -10°C.



Fig.1

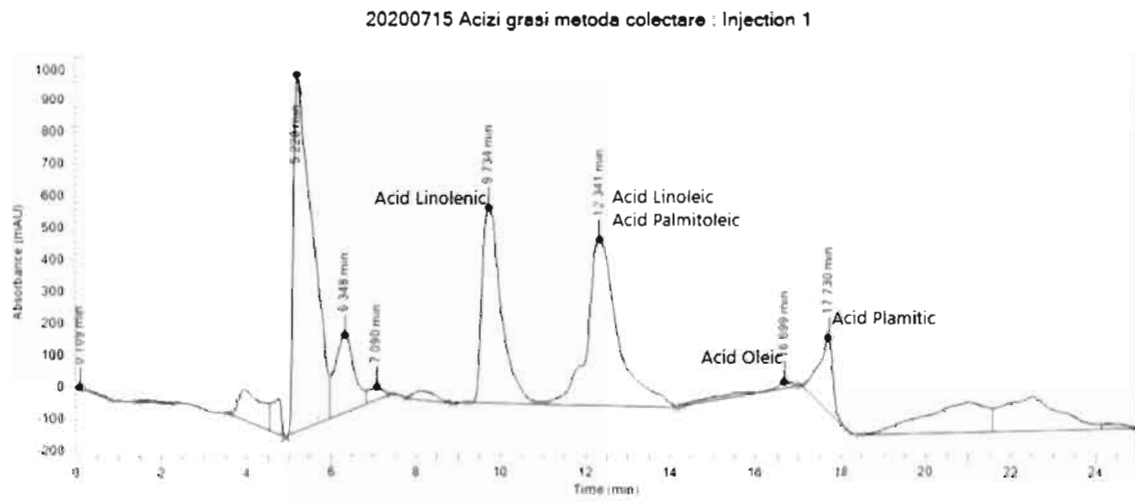
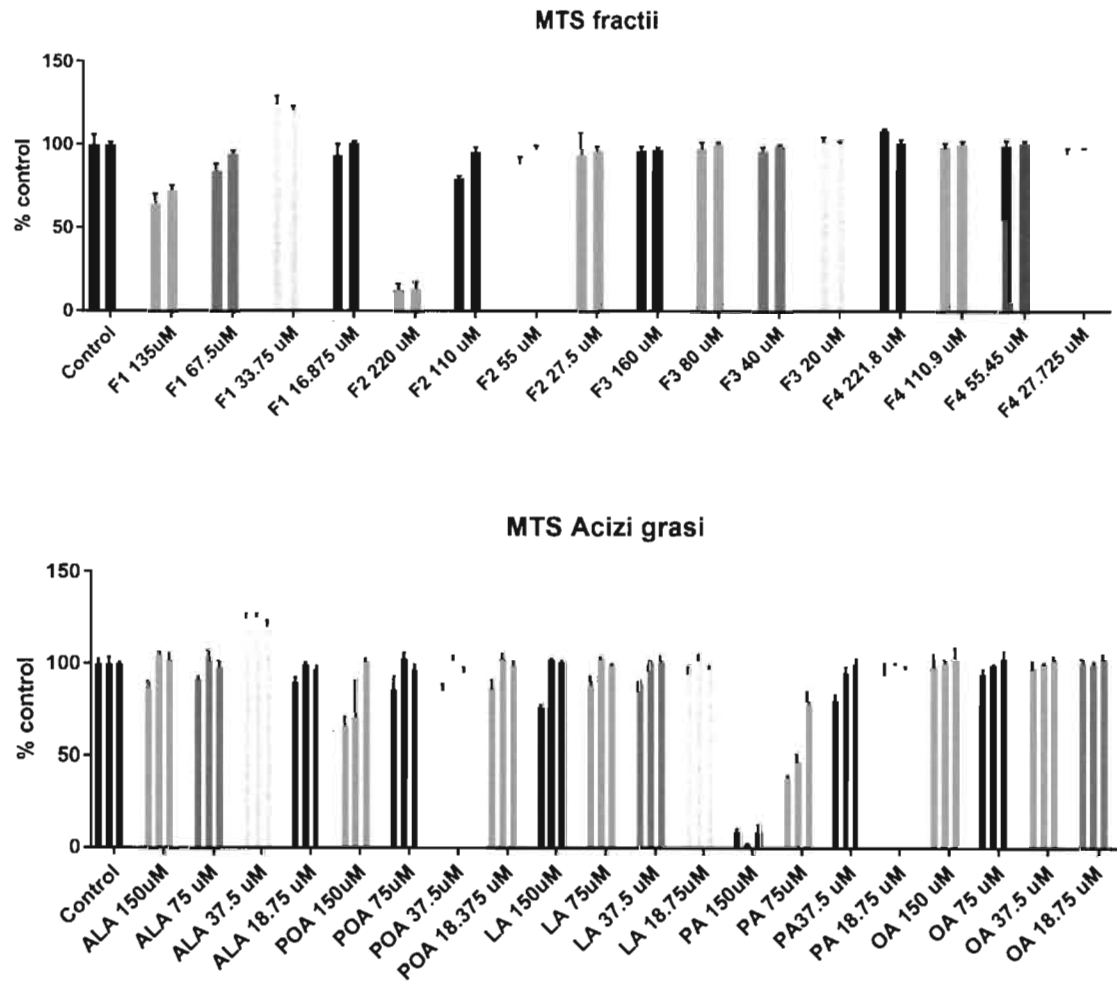
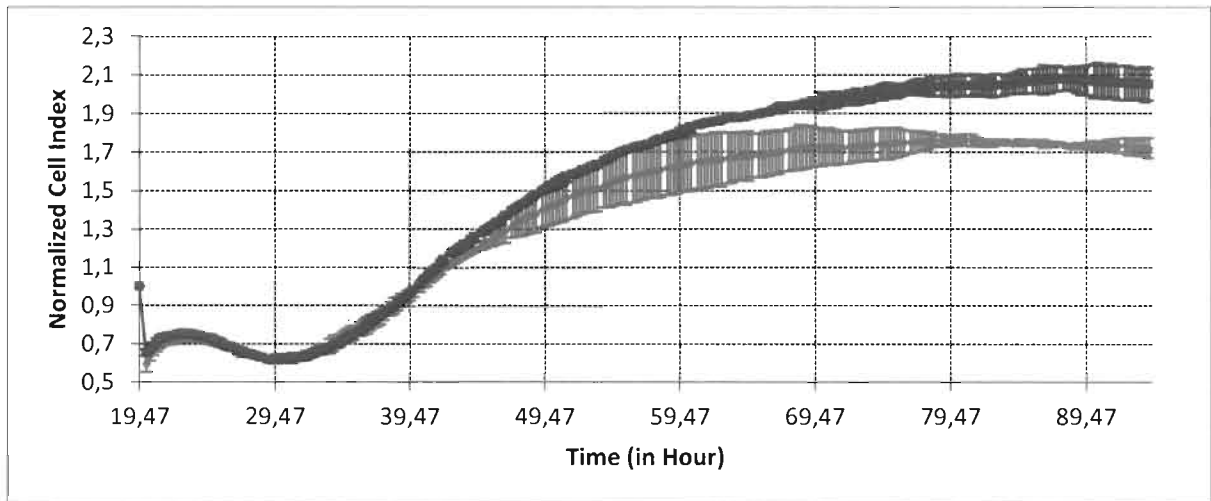
*Analeas*

Figura 2



Signature

Figura 3

*hvhalsu*