



(11) **RO 125279 B1**

(51) Int.Cl.

A61K 9/16 ^(2006.01),

A61K 36/25 ^(2006.01),

A61P 31/00 ^(2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00863**

(22) Data de depozit: **26.10.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.12.2013** BOPI nr. **12/2013**

(41) Data publicării cererii:
30.03.2010 BOPI nr. **3/2010**

(73) Titular:
• **BIOTEHNOS S.A., STR.GORUNULUI
NR.3-5, OTOPENI, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **MÂNZATU LILIANA, STR.SANDU ALDEA
NR.49, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **ZGLIMBEA LENUȚA, STR.DREPTĂȚII
NR.8, BL.O 10, SC.1, ET.7, AP.48,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **OLARIU LAURA, BD.ION MIHALACHE
NR.42-52, BL.35, SC.B, ET.10, AP.79,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
FR 1531621; US 2006/0210660 A1

(54) **PROCEDEU DE PREPARARE A UNOR COMPLECȘI
BIOACTIVI DIN *HERBA HEDERA HELIX* ȘI PRODUS
MEDICAMENTOS PENTRU UTILIZAREA ÎN TERAPIA
ANTITUMORALĂ**



RO 125279 B1

1 Inventția se referă la un procedeu tehnologic aplicabil la nivel industrial prin care se
2 valorifică integral componentele triterpenice glicozidate din *herba Hedera helix*, ce presupune
3 extracția, separarea și purificarea substanțelor farmaceutic și cosmetic active.

4 Este cunoscut faptul că toate medicamentele antitumorale obținute prin sinteză
5 chimică sau biosinteză, indiferent de structura lor chimică și de modul de acțiune, prezintă
6 o multitudine de efecte adverse grave, care limitează utilizarea lor terapeutică, impunând
7 uneori întreruperea tratamentului citostatic în scopul protejării vieții pacientului.

8 Din aceste considerente, prezintă un deosebit interes terapeutic posibilitatea obținerii
9 unor noi medicamente antitumorale pe bază de compuși naturali de origine vegetală, care
10 să prezinte calități terapeutice (selectivitate, specificitate, inocuitate) superioare medicamen-
11 telor citostatice chimioterapice.

12 Nomenclatoarele de produse farmaceutice pe plan național și internațional conțin pe
13 lângă medicamentele citostatice de sinteză și un număr restrâns de produse antitumorale
de origine vegetală, cele mai utilizate fiind:

- 14 - ISCADOR, HELIXOR conținând lectine din *Viscum album*;
- 15 - VINBLASTIN - sulfat de vinblastină din *Vinca rosea*;
- 16 - VINCRISTIN - sulfat de vincristină din *Vinca rosea*;
- 17 - VINDESIN - sulfat de vindesină din *Vinca rosea*;
- 18 - TAXOL - paclitaxel din *Taxus species*.

19 Aceste produse sunt utilizate frecvent în clinicile de oncologie, deși prezintă unele
20 efecte adverse, care însă sunt de o gravitate inferioară citostaticelor chimioterapice.

21 Pe plan mondial, se efectuează intense cercetări fitochimice și farmacologice, în
22 scopul obținerii unor substanțe și produse bioactive vegetale cu activitate antitumorală care
23 să fie lipsite de efecte adverse și care să poată fi utilizate ca atare sau în administrare con-
24 comitentă cu citostaticele de sinteză, pentru a le potența activitatea și a le reduce toxicitatea
25 [1, 2, 3, 4, 5].

26 Din punct de vedere fitochimic, compușii bioactivi de origine vegetală cei mai studiați
27 în acest scop aparțin clasei triterpenoidelor oxigenate pentaciclice cu structură chimică tip
28 ursan și oleanan, în stare liberă sau glicozidată, sub formă de complex de saponine
triterpenice, denumite după numele agliconului triterpenic sau al plantei din care provin:

- 29 - oleanozide - aglicon acid oleanolic din *Calendula off.*;
- 30 - aralozide - aglicon acid oleanolic din *Aralia species*;
- 31 - ginsenzozide - aglicon acid oleanolic + protopanaxadiol + protopanaxatriol din *Panax*
32 *ginseng*;
- 33 - hederasaponine-aglicon acid oleanolic și hederagenina din *Hedera sp.*

34 Complexul de saponine triterpenice existent în planta *Hedera helix* (iederă) familia
35 *Araliaceae* are ca aglicon predominant hederagenina, alături de acidul oleanolic în cantități
36 mai reduse constituind componentele bioactive specifice ale acestei plante. Studiile analitice
37 de evaluare comparativă a componenței complexului de saponine triterpenice din *Hedera*
38 *helix* au condus la evidențierea calitativă și cantitativă a grupurilor structurale de compuși
39 triterpenici glicozidați cei mai importanți cantitativ fiind:
40

Denumirea saponinei triterpenice	Aglicon structural	Catena glucidică	
		C3	C28
α -Hederină	Hederagenina	arabinoză-ramnoză	-
β -Hederină	Acid oleanolic	arabinoză-ramnoză	-

Denumirea saponinei triterpenice	Aglicon structural	Catena glucidică		
		C3	C28	
Hederacozida B	Acid oleanolic	arabinoză-ramnoză	(glucoză) ₂ -ramnoză	3
Hederacozida C	Hederagenina	arabinoză-ramnoză	(glucoză) ₂ -ramnoză	5

În funcție de arealul geografic al plantei, perioada de recoltare, partea de plantă de pe care se colectează - frunze de pe ramuri înflorite, frunze tinere, frunze bătrâne, conținutul în principalele glicozide triterpenice variază [6], evidențiindu-se prezența și a altor saponine triterpenice în cantități mai mici: δ -Hederină, Hederasaponinele D, E, F, G, H, I, etc.

Extracțele hidroalcoolice din *Hedera helix* constituie componenta de bază a numeroase produse farmaceutice antitusive prevăzute în nomenclatoarele de medicamente din țările europene, [7] iar extracțele glicolice sunt utilizate la obținerea unor produse dermatocosmetice anticelulitice și antilipemice.

Datorită proprietăților deosebite ale preparatelor hidrosolubile de CuNa-clorofilă obținute din plante precum lucerna, iarba, urzica, alge, pelin, și anume: proprietăți tinctoriale, similaritate structurală cu hemoglobina, aplicațiile practice ale sărurilor solubile de clorofilă se regăsesc în industria cosmetică, alimentară și a suplimentelor nutritive [8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15].

În ultima perioadă, au apărut studii în revistele de specialitate despre efectele antioxidante și antimutagenice ale sărurilor solubile de clorofilă (16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24).

În continuare, sunt prezentate brevetele de invenție și cererile de brevet de invenție care prezintă procedee de obținere a unor produse bioactive aplicabile în terapeutică, pe bază de compuși triterpenici glicozidați cu structură de hederagenină, obținute din planta *Hedera helix*.

- Brevetul de invenție francez **FR 1.531.621/24.05.1967 (25)**, "**Procedeu de preparare a complexelor triterpenice din plante**", prezintă obținerea din tulpini de *Hedera helix* a patru complexe de saponine, trei sub forma unor lichide uleioase și a unei pudre galben brun ce au fost caracterizate prin cromatografia pe strat subțire evidențiindu-se prezența a 2-10 spoturi de saponine în fiecare probă. Procedeu de obținere prevede extracția materiei prime vegetale cu etanol 60% și prelucrarea extractului total obținut sub formă de pudră prin extracția succesivă cu etanol 96%, acetonă, eter de petrol, metanol, iar etapa de purificare se efectuează prin adsorbție pe cărbune activ în raport 1/4 extract/adsorbant și desorbția ulterioară cu diferiți solvenți: metanol, cloroform, acetat de etil, benzen, piridină. Produsele obținute ce sunt complexe de saponine nu sunt caracterizate analitic prin conținutul în substanță activă ci doar prin metode de evidențiere a spoturilor prin cromatografia pe strat subțire. Procedeu este laborios având multe etape de extracție și separare, utilizează diverși solvenți de extracție și purificare ușor inflamabili, cancerigeni (benzen, piridină, metanol, cloroform), neeconomic obținându-se randamente mici de extracție chiar și atunci când se obțin complexe - amestecuri de compuși triterpenici (din 100 kg plantă între 4 și 450 g extracțe lichide uleioase).

- Cererea de brevet de invenție **US 20060210660/21.09.2006/A1**, intitulată: „**Procedeu pentru prepararea unui extract din frunze de iederă**”, prezintă un procedeu de preparare a unui extract din frunze de iederă, constituit dintr-un amestec de 2 extracțe prelucrate separat în vederea îmbogățirii în hederacozida C și α-hederină. Extractul îmbogățit în

RO 125279 B1

1 α -hederină se obține prin fermentarea enzimatică a frunzelor de iederă cu apă, la 30°C, în
scopul convertirii hederacozidei C în α -hederină care se extrage cu alcool etilic 30%
3 extractele hidroalcoolice fiind prelucrate ca extract sicc sub formă de pulbere, cu un conținut
îmbogățit în α -hederină: minimum 5%, datorită convertirii în totalitate a hederacozidei C
5 existente în plantă. Extractul îmbogățit în hederacozida C se obține prin tratarea plantei cu
vapori de apă supraîncălziți la 120°C, în vederea inactivării enzimelor care convertesc
7 hederacozida C în α -hederină, după care se efectuează extracția cu alcool etilic 30%,
extractele hidroalcoolice tind prelucrate ca extract sicc cu un conținut îmbogățit în
9 hederacozida C: minimum 10%. În vederea utilizării în terapeutică se prepară un amestec
din cele 2 extracte sus-menționate, obținându-se un extract final special cu un conținut de
11 5...8%) hederacozidă C și 3...5% α -hederină. Referitor la activitatea farmacologică a acestor
2 extracte bioactive se menționează efectele lor spasmolitice, expectorante și antiobstructive
13 asupra căilor respiratorii, ceea ce justifică utilizarea lor în tratamentul tulburărilor respiratorii.

- Brevetul de invenție **GB 1106133/13.03.1968** [26] prezintă obținerea unor extracte
15 din *Hedera helix*: saponina, sapogenina și sarea de magneziu a sapogeninei, prin extracția
cu alcool etilic 70%, precipitarea complexului de saponine cu sulfat de amoniu, purificarea
17 cu alcool etilic 93% și metanol 98%, iar pentru îndepărtarea pigmentilor, rezinelor și a
uleiurilor se utilizează acetonă, acetatul de etil, metil etil cetonă, triclor etilenă, cloroform prin
19 dizolvarea extractelor concentrate de sapogenine sub formă de reziduu uscat, urmată de
filtrare, pentru îndepărtarea solvenților organici. În acest mod se obține saponina, sub forma
21 unei pudre amorfe, de culoare alb-crem, ușor solubilă în apă, metanol, etanol, dar insolubilă
în acetonă și acetat de etil, având punctul de topire între 195 și 200°C, iar sapogenina ca
23 pudră de culoare albă, insolubilă în apă la pH acid, solubilă în metanol, etanol izopropanol.
Saponina, sapogenina și sarea de magneziu obținute conform invenției sunt inhibitori ai
25 diviziunii și creșterii celulare neavând efect mitoclastic.

- Brevetul chinezesc **CN 200710034341/29.01.2007** [27] prezintă obținerea unui
27 preparat de Hederacozidă C de puritate 98,2%, determinată prin HPLC, prin extracția
hidroalcoolică 30...95% la reflux, obținerea extractului brut, dizolvarea acestuia în apă într-un
29 generator de ultrasunete și extracția ulterioară cu eter și acetat de etil pentru îndepărtarea
substanțelor balast, ce impurifică extractul. Extractul astfel obținut se extrage cu n-butanol,
31 și se continuă purificarea cu etanol 95%, acetat de etil (pentru dizolvarea părții insolubile)
metanol, și cromatografie pe colană folosind drept eluant amestec cloroform:metanol 65:35.
33 Procedul este neeconomic, nu se poate aplica la scară industrială, utilizând instalații
costisitoare (generator de ultrasunete, coloane cromatografice), amestecuri de solvenți greu
35 de recuperat și utilizat iar produsul obținut se obține cu randamente extrem de mici pentru
aplicații la nivelul industriei farmaceutice 0,21 g/100 g materie primă vegetală.

- Brevetul de invenție **GB 2051575/08.01.1980** [28], intitulat: „**Compoziții farmaceu-**
37 **tice conținând extracte de iederă agățătoare**”, prezintă obținerea unor compoziții farma-
ceutice pe bază de extracte de iederă (*Hedera helix*) care conțin: Hederasaponină C
39 (Hederacozidă C) 60...90% sau α -hederină. Procesul de obținere a extractelor prevede
extracția succesivă a plantei cu acetonă și metanol, urmată de precipitarea hederasaponinei
41 C din soluția metanolică prin tratare cu eter etilic. Rezultă hederasaponina C, cu un conținut
de 60%, care se purifică prin cromatografie pe coloană de Al₂O₃ eluată cu metanol, din care
43 se obține hederasaponina C purificată, cu un conținut de 90%. Se prezintă și transformarea
hederasaponinei C - 90% în α -hederină, prin alcalinizare cu NaOH sau KOH 2N, rezultând
45 α -hederina purificată. Se menționează posibilitatea utilizării extractelor de iederă, obținute
conform invenției și condiționate sub formă de tablete, soluție injectabilă, unguent, ca
47 medicamente cu activitate antifungică și antiparazitară, în terapeutică umană și veterinară.

RO 125279 B1

- Cererea de brevet de invenție **US 20060057236/16.03.2006/A1** [29], intitulată: „**Proces pentru producerea unui extract din frunze de iederă**”, prezintă un procedeu de obținere a unui extract din frunze de *Hedera helix*, care conține α -hederină, care prevede fermentarea frunzelor de iederă, cu apă la 30°C, când hederacozida C este transformată enzimatic în α -hederină care este extrasă din plantă cu amestecuri hidroalcoolice (etanol) obținându-se un extract sicc, sub formă de pulbere. Se menționează că prin transformarea enzimatică totală a hederacozidei C din plantă în α -hederină, extractul sicc obținut conform invenției este îmbogățit în α -hederină de la 0,53% la 4,74% și poate fi condiționat sub formă de produse farmaceutice de uz intern și extern, aplicabile în tratamentul tulburărilor respiratorii, datorită efectelor bronhospasmodice ale α -hederinei. 1
- Brevetul de invenție **CN 1245693/01.03.2000** [31] prezintă o pulbere medicamentoasă destinată tratamentului diferitelor forme de leucemie, care conține ca material principal pulberea de iederă, alături de alte produse vegetale pulverizate, efectul terapeutic având o rată de vindecare de 96%, fără efecte adverse toxice. 3
- Brevetul de invenție **RU 2127605/20.03.1999** [32] prezintă o metodă de stimulare enzimatică în α -hederină care este extrasă din plantă cu amestecuri hidroalcoolice (etanol) obținându-se un extract sicc, sub formă de pulbere. Se menționează că prin transformarea enzimatică totală a hederacozidei C din plantă în α -hederină, extractul sicc obținut conform invenției este îmbogățit în α -hederină de la 0,53% la 4,74% și poate fi condiționat sub formă de produse farmaceutice de uz intern și extern, aplicabile în tratamentul tulburărilor respiratorii, datorită efectelor bronhospasmodice ale α -hederinei. 5
- Brevetul de invenție **CN 1245693/01.03.2000** [31] prezintă o pulbere medicamentoasă destinată tratamentului diferitelor forme de leucemie, care conține ca material principal pulberea de iederă, alături de alte produse vegetale pulverizate, efectul terapeutic având o rată de vindecare de 96%, fără efecte adverse toxice. 7
- Brevetul de invenție **RU 2127605/20.03.1999** [32] prezintă o metodă de stimulare a imunității celulare utilizând ca produs bioactiv adjuvant glicozidele triterpenice izolate din diferite organe ale plantelor din genul *Hedera*, metoda fiind aplicabilă la prepararea vaccinurilor. 9
- În ceea ce privește valorificarea plantei *Hedera helix* în terapeutică, din cunoștințele din stadiul tehnicii rezultă că nu s-au realizat din această plantă produse medicamentoase aplicabile în terapia antitumorală, în baza unei activități de influențare a evoluției tumorilor sau de contracarare a efectelor adverse ale medicamentelor citostatice. 11
- Prin larga incidență socială a maladiilor neoplazice și printr-o rată a mortalității în continuă creștere, șansele de atenuare a evoluției tumorale și de prelungire a vieții cu ajutorul citostaticelor chimioterapice sunt încă limitate, de unde și importanța terapeutică deosebită, acordată cu prioritate cercetărilor de obținere a unor noi medicamente anti-tumorale, cu inocuitate și eficacitate terapeutică superioară celor utilizate în etapa actuală în oncologie. 13
- Problema tehnică pe care își propune să o rezolve prezenta invenție constă în obținerea întregului complex triterpenic glicozilat din planta herba *Hedera Helix*. 15
- Procedeuul conform invenției rezolvă problema tehnică de obținere a întregului complex triterpenic glicozidat din *herba Hedera helix*. 17
- Soluția propusă conform invenției constă într-un procedeu de separare și purificare a întregului complex triterpenic glicozidat de tip hederagenină și acid oleanolic, din *herba Hedera helix*. 19
- Obiectivul principal al prezentei invenții constă în obținerea a 4 complecși bioactivi glicozidați, dintre care unul sub forma unui extract apos de CuNa-clorofilă, din planta *Hedera helix*. 21
- Un alt obiectiv al invenției constă într-un procedeu de preparare a complecșilor bioactivi glicozidați și a produselor medicamentoase care conțin complexul bioactiv glicozidat. 23
- Ca urmare, invenția se referă la un procedeu de obținere a unor complecși bioactivi din *herba Hedera helix*, utilizați în terapia antitumorală, în care, într-o primă etapă, *herba Hedera helix* uscată este supusă extracției prin percolare dinamică cu alcool etilic de concentrație 80% într-un raport 1:15, la temperatură ambiantă, timp de 12 h, urmată de concentrarea soluției extractive alcoolice, extractul concentrat se supune apoi extracției lichid-lichid cu acetat de etil în raport 1:3, din care rezultă un extract apos și o fază de acetat de etil, care în continuare se separă, se filtrează și se concentrează sub vid până la un raport 1:30, se suspendă sub agitare în acetonă, din care rezultă un prim complex bioactiv brut care 25
- 27
- 29
- 31
- 33
- 35
- 37
- 39
- 41
- 43
- 45
- 47

RO 125279 B1

1 se supune purificării prin dizolvare în alcool etilic 95% decolorare cu cărbune activ și
concentrare, care conduc la un filtrat acetonic, și un cristalizat care este purificat, rezultând
3 un prim complex bioactiv purificat, după care, într-o a doua etapă, extractul apos amintit se
supune unei separări lichid-lichid, din care rezultă o fază apoasă și o fază n-butanolică, care
5 în continuare se supune concentrării sub vid, rezultând un al doilea complex bioactiv brut,
care se suspendă în acetonă, iar precipitatul se separă prin filtrare și se purifică prin
7 dizolvare prin alcool etilic 70%, decolorare cu cărbune și concentrare, rezultând un al doilea
complex bioactiv purificat, în continuare, într-o a 3-a etapă, filtratul acetonic se concentrează
9 sub vid și se reunește cu faza apoasă din extracția lichid-lichid din etapa anterioară, se
concentrează și se condiționează în propilenglicol, din care rezultă un al treilea complex
11 bioactiv, și în final, filtratul acetonic de purificare din etapa 1 se concentrează și se suspendă
în soluția alcoolică la pH 8,5...12,5, se separă prin filtrare și se suspendă în soluție de sulfat
13 de cupru de concentrație 10% în mediul acid, urmată de solubilizarea Cu-clorofilei într-o
soluție apoasă de hidroxid de sodiu la pH 8,5...12,5, rezultând un extract apos de Cu Na-
15 clorofilă.

Într-o aplicare preferată a invenției, în procedeul definit mai sus, complexul bioactiv
17 purificat din etapa 1 este o pulbere albă cristalină, având un conținut de minimum 95%
saponine triterpenice monodesmozidice totale cu aglicon hederagenină, din care 70...80%
19 α -Hederină.

Într-o altă aplicare preferată a invenției, în procedeul definit mai sus, complexul
21 bioactiv purificat din etapa 2 este o pulbere alb-gălbuie, având un conținut de minimum 90%
saponine triterpenice bisdesmozidice totale cu aglicon hederagenină, din care 50...75%
23 Hederacozida C.

Într-o altă aplicare preferată a invenției, în procedeul definit mai sus, complexul
25 bioactiv bioactiv din etapa 3 este sub formă de extract lichid brun roșcat, având 1-3 g/100 ml
conținut de saponine bisdesmozidice cu aglicon acid oleanolic și 1,5 - 5 g/100 ml acizi poli-
27 fenolcarboxilici

Într-o altă aplicare preferată a invenției, în procedeul definit mai sus, extractul apos
29 de CuNa-clorofilă are 0,2...1 g/100 ml conținut în saponine monodesmozidice cu aglicon acid
oleanolic și 0,1...0,5 g /100ml extract clorofilă totală.

31 Invenția se referă de asemenea la un produs medicamentos, constituit din 1...2%
dintr-un complex bioactiv preparat prin procedeul de mai sus condiționat sub formă de soluție
33 injectabilă sau buvabilă, gel, cremă sau supozitoare.

Invenția se referă de asemenea la un produs medicamentos constituit din 100 mg
35 dintr-un complex bioactiv preparat prin procedeul definti mai sus, condiționat sub formă de
capsule.

37 Produsele fioterapeutice obținute conform invenției sunt:

- un complex bioactiv glicozidat sub formă de pulbere albă cristalizată purificată cu
39 un conținut în saponine triterpenice monodesmozidice totale cu aglicon hederagenină de
minimum 95%, din care α -hederina între 70 și 80%, denumit GSO-1;

41 - un complex bioactiv glicozidat sub formă de pulbere alb-galbui cristalizată purificată
cu un conținut în saponine triterpenice bisdesmozidice totale cu aglicon hederagenina de
43 minimum 90%, din care Hederacozida C între 50 și 75%, denumit GSO-2;

- un complex bioactiv glicozidat sub formă de extract lichid brun roșcat caracterizat
45 printr-un conținut de saponine bisdesmozidice cu aglicon acid oleanolic între 1 și 3 g/100 ml
și acizi polifenolcarboxilici între 1,5 și 5 g/100 ml condiționat într-un solvent acceptabil
47 cosmetic (propilenglicol, butilenglicol, glicerină), denumit GSO-3;

RO 125279 B1

- un extract apos de CuNa-clorofilă utilizabil în industria cosmetică, având un conținut în saponine monodesmozidice cu aglicon acid oleanolic între 0,2 și 1 g/100 ml și de clorofilă totală între 0,1 și 0,5 g /100 ml extract.	1
Invenția prezintă procedeele de condiționare ale compușilor triterpenici glicozidați sub formă de produse medicamentoase de uz uman și veterinar, evidențierea prin studii <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i> a activității antitumorale, antiangiogenice, hepatoprotectoare și produsele cosmetice, dezvoltate pe baza proprietăților tinctoriale, antibacteriene, antioxidante, antilipemice și anticelulitice.	3
Din datele prezentate cu privire la stadiul tehnicii în domeniul obținerii unor substanțe sau produse bioactive din planta <i>Hedera helix</i> , rezultă următoarele:	5
• comparativ cu stadiul tehnicii, elementele de noutate conform invenției sunt reprezentate de:	7
- procentele diferite de substanțe active din fiecare complex bioactiv;	9
- procedeul prezentat constă într-o anumită succesiune diferită a etapelor și parametrilor corespunzători fiecărei etape;	11
- produsele medicamentoase obținute conțin o proporție diferită a principiilor active folosite în afecțiunile tumorale;	13
• conform stadiului tehnicii, nu s-au realizat procedee de obținere în scop terapeutic a întregului complex triterpenic glicozidat având ca aglicon hederagenina și acidul oleanolic existent în planta <i>Hedera helix</i> ;	15
• procedeele prezentate mai sus sunt diferite față de prezenta invenție, având alte etape, solvenți și parametri;	17
• procedeele prezintă o serie de dezavantaje tehnologice, precum:	19
- sunt laborioase având multe etape de extracție și separare, utilizează diverși solvenți de extracție și purificare ușor inflamabili, cancerigeni (benzen, piridina, metanol, cloroform), sunt neeconomice obținându-se randamente mici de extracție pentru aplicații la nivelul industriei farmaceutice 0,21 g/100 g materie primă vegetală pentru produse purificate, iar pentru complexe - amestecuri de compuși triterpenici din 100 kg plantă între 4 și 450 g extracte lichide uleioase) [25];	21
- nu se pot aplica la scară industrială utilizând instalații costisitoare (generator de ultrasunete, coloane cromatografice, adsorbanti scumpi Al_2O_3), amestecuri de solvenți greu de recuperat și utilizat [27];	23
- utilizează solvenți foarte inflamabili și explozivi - eterul etilic - la obținerea hederacozidei C 60% prin precipitare din soluția metanolică, rezultând un mediu de precipitare constituit din eter etilic-metanol, dificil de distilat și separat la nivel industrial în vederea recuperării și refolosirii solvenților [28];	25
- presupun prelucrarea soluțiilor extractive primare sub formă de extracte sicc, cu un conținut scăzut în α -hederină (3...5%) și hederacozidă C (5...8%) [29, 30], ceea ce le scade șansa aplicării în terapeutică, condiționate ca medicamente, fiind utilizabile ca suplimente nutriționale;	27
- determină obținerea unor produse bioactive care conțin numai 1...2 hederasaponine, cu aglicon hederagenină (α -hederină și hederacozidă C), fără valorificarea tehnologică și terapeutică a hederacozidei B - cu aglicon de acid oleanolic [29, 30].	29
Referitor la valorificarea plantei <i>Hedera helix</i> în terapeutică, brevetele studiate și prezentate în cadrul stadiului tehnicii evidențiază următoarele:	31
- nu s-au realizat din această plantă produse medicamentoase aplicabile în terapia antitumorală, în baza unei activități de influențare a evoluției tumorilor sau de contracarare a efectelor adverse ale medicamentelor citostatice;	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 125279 B1

1 - documentele din stadiul tehnicii prezintă compoziții farmaceutice care conțin
2 proporții diferite față de prezenta invenție, ale principiilor active folosite: hederacozidă C de
3 puritate 60...90%, condiționată ca medicament cu activitate antifungică și antiparazitară [28];
4 extract sicc cu 4,74% α -hederină, condiționat sub formă de produse farmaceutice aplicabile
5 în tratamentul tulburărilor respiratorii [29]; extract sicc conținând 5...8% hederacozidă C și
6 3...5% α -hederină, aplicabil în terapia afecțiunilor respiratorii [30];

7 - majoritatea brevetelor de invenție redată în stadiul tehnicii referitoare la *Hedera helix*
8 prezintă utilizarea extractelor glicolice, hidroglicolice, și hidroalcoolice la condiționarea unor
9 produse farmaceutice și cosmetice sub forma de gel, crema, balsam, cu efecte antiinflama-
10 toare, antipruritice, antilipemice și anticelulitice [33, 41].

11 Conform procedurii propus se obțin 4 preparate diferite ce reprezintă intermediari
12 bioactivi pentru industria farmaceutică, cosmetică, alimentară și a suplimentelor nutritive,
13 astfel: materia primă vegetală *herba Hedera helix* uscată și măcinată se extrage cu alcool
14 etilic de uz farmaceutic cu o concentrație de 50...80%, urmată de concentrarea soluțiilor
15 extractive obținute și recuperarea solventului; extractul apos concentrat obținut este supus
16 unei prime etape de separare prin extracția lichid/lichid cu acetat de etil, moment în care
17 glicozidele monodesmozidice trec selectiv din faza apoasă în faza organică, din care se
18 separă după concentrarea sub vid, prin suspendare în acetonă și filtrare, sub forma unei
19 pulberi verzui cu un conținut în saponine triterpenice monodesmozidice totale cu aglicon
20 hederagenină cuprins între 50 și 60%, din care α -Hederină 30...40%, ce reprezintă
21 preparatul de GSO-1-brut.

22 Pentru purificare GSO-1-brut se supune unei recristalizări cu alcool etilic 95%,
23 obținându-se produsul final cu un conținut în saponine triterpenice monodesmozidice totale
24 cu aglicon hederagenină de minimum 95%, din care α -Hederină între 70 și 80% determinată
25 prin HPLC denumit GSO-1.

26 A doua etapă constă în obținerea preparatului GSO-2 din extractul apos rezidual ce
27 este supus extracției lichid/lichid cu n-butanol, concentrare sub vid și suspendare în acetonă,
28 moment în care hederasaponinele precipită sub formă de pulbere nisipoasă separabilă prin
29 filtrare. Se obține astfel un preparat brut de GSO-2 cu un conținut în saponine triterpenice
30 bisdesmozidice totale cu aglicon hederagenină de 50...60%, din care Hederacozida C între
31 30 și 40%.

32 Pentru purificarea preparatului brut de GSO-2, tehnologia conform invenției propune
33 în mod diferit față de datele din literatură [27; 28] dizolvarea preparatului brut de
34 hederacozida C în alcool etilic 60-70%, decolorarea cu cărbune, concentrarea extractului
35 până la faza apoasă ce se supune extracției lichid/lichid cu n-butanol, urmată de cristalizarea
36 din faza organică. Se obține astfel preparatul purificat de GSO-2 cu un conținut în saponine
37 triterpenice bisdesmozidice totale cu aglicon hederagenină de minimum 90%, din care
38 Hederacozida C între 50 și 75%, determinată prin HPLC.

39 Pentru obținerea extractului bioactiv lichid caracterizat în compuși glicozidați
40 bisdesmozidici cu aglicon acid oleanolic, filtratul acetonic obținut după separarea preparatului
41 brut de GSO-2 se concentrază sub vid pentru recuperarea solventului, se reunește cu extractul
42 apos remanent (de la extracția hederacozidei C cu n-butanol) bogat în compuși polifenolici
43 și se condiționează într-un solvent cosmetic acceptabil (butilenglicol, glicerină, propilenglicol)
44 rezultând preparatul GSO-3 cu un conținut în saponine bisdesmozidice cu aglicon acid oleanolic
45 cuprins între 1 și 3 g/100 ml și acizi polifenolcarboxilici cuprins între 1,5 și 5 g/100 ml, denumit
46 GSO-3.

47 Pentru obținerea extractului de CuNa-clorofilă hidrosolubilă, extractul acetonic rezidual -
48 ce conține glicozidele triterpenice monodesmozidice ale acidului oleanolic precum și complexul
49 pigmentilor clorofilieni obținut după separarea preparatului GSO-1 brut - se concentrează,

RO 125279 B1

se alcalinizează, se suspendă în soluția de sulfat de cupru în mediu acid, urmată de solubilizarea în mediu alcalin a Cu-clorofilei obținute în soluție de NaOH, moment în care se formează sarea solubilă în apă a pigmentilor clorofilieni, sub forma unei soluții apoase de culoare verde intens, stabilă în timp, caracterizată printr-un conținut în saponine monodesmozidice cu aglicon acid oleanolic între 0,2 și 1 g/100 ml și de clorofilă totală între 0,1 și 0,5 g/100 ml extract.	1
Avantajele invenției în raport cu stadiul tehnicii sunt următoarele:	7
- prezintă un procedeu tehnologic, aplicabil la nivel industrial, de valorificare integrală a potențialului triterpenic glicozidat al materiei prime vegetale <i>herba Hedera helix</i> prin obținerea a 4 preparate și anume:	9
- complexul bioactiv glicozidat sub formă de pulbere albă cristalizată purificată cu un conținut în saponine triterpenice monodesmozidice totale cu aglicon hederagenină de minimum 95%, din care α -Hederina între 70 și 80%, denumit GSO-1;	11
- complexul bioactiv glicozidat sub formă de pulbere alb-gălbuie cristalizată purificată cu un conținut în saponine triterpenice bisdesmozidice totale cu aglicon hederagenină de minimum 90%, din care Hederacozida C între 50 și 75%, denumit GSO-2;	13
- complexul bioactiv glicozidat sub forma unui extract lichid brun-roșcat, caracterizat printr-un conținut de saponine bisdesmozidice cu aglicon acid oleanolic între 1 și 3 g/100 ml și acizi polifenolcarboxilici între 1,5 și 5 g/100 ml, denumit GSO-3, condiționat într-un solvent acceptabil cosmetic (propilenglicol, butilenglicol, glicerină);	15
- extract apos de CuNa-clorofilă, utilizabil în industria cosmetică, având un conținut în saponine monodesmozidice cu aglicon acid oleanolic între 0,2 și 1 g/100 ml și de clorofilă totală între 0,1 și 0,5 g/100 ml extract.	17
- spre deosebire de procedeele menționate la stadiul tehnicii, care prezintă obținerea unor extracte sicc cu un conținut scăzut de α -Hederină și Hederacozidă C de 3...5%, respectiv, de 5...8% [29; 30], procedeul conform invenției conduce la obținerea complexelor bioactive glicozidate cu un conținut în saponine triterpenice monodesmozidice și bisdesmozidice totale cu aglicon hederagenina de minimum 90...95%, din care α -Hederină de 70...80% și, respectiv, Hederacozidă C între 50 și 70%.	19
- valorificarea judicioasă ecologică a întregului potențial al materiei prime vegetale <i>Hedera helix</i> ; prin aplicarea acestui procedeu, prin același flux tehnologic după extracția primară hidroalcoolică, se realizează două etape de extracție lichid/lichid cu două tipuri de solvenți diferiți; astfel din extractul primar se separă cu amestecul apă:acetat de etil mai întâi compușii triterpenici glicozidați monodesmozidici și apoi prin extracție lichid/lichid apă:n-butanol compușii triterpenici glicozidici bisdesmozidici;	21
- utilizarea metodei de separare lichid/lichid în tehnologia de separare a componentelor triterpenice în locul procedeelelor cromatografice pe coloane cu oxid de aluminiu [28] costisitoare reprezintă un mare avantaj economic, executându-se simplu, după o metodologie nelaborioasă, cu o aparatură ușor accesibilă și într-un interval de timp scurt;	23
- prin aplicarea acestui procedeu conform prezentei invenții, etapa de purificare a α -Hederinei și hederacozidei C utilizează solvenți netoxici, ușor de manipulat la nivel industrial	25
- alcool etilic de concentrație 50% și 96%, n-butanol cu punct de fierbere ridicat și ușor de recuperat pentru a fi reutilizați;	27
- utilizarea acetatului de etil în prima etapă a extracției lichid/lichid este un avantaj, deoarece datorită selectivității sale, conduce la separarea într-o singură etapă, cu randamente cuprinse între 80 și 90% a componentelor triterpenice monodesmozidice;	29
- tehnologia recuperează solvenții utilizați și valorifică filtratele separate în etapele de purificare, prin obținerea complexului bioactiv glicozidat, caracterizat printr-un conținut de saponine bisdesmozidice cu aglicon acid oleanolic între 1 și 3 g/100 ml și acizi polifenolcarboxilici	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49

RO 125279 B1

1 între 1,5 și 5 g/100 ml, denumit GSO-3, și a extractului apos de CuNa-clorofilă, având un conținut
în saponine monodesmozidice cu aglicon acid oleanolic între 0,2 și 1 g/100 ml și de clorofilă
3 totală între 0,1 și 0,5 g/100 ml extract.

- produsele fitoterapice, obținute conform prezentei invenții, prezintă efecte farmacologice-
5 diferite față de cele prezentate în stadiul tehnicii: activitate antitumorală de inhibare și încetinire
a evoluției canceroase, cu precădere a tumorilor mamare, dar și pentru cele localizate în bazinul
7 abdominal inferior: ovar, col uterin și prostată, având totodată activitate antioxidantă,
hepatoprotectoare și imunoprotectoare de contracarare a efectelor adverse imunosupresoare
9 și hepatotoxice survenite în timpul și după tratamentul agresiv cu citostatice, fiind aplicabile
în terapeutila umană și veterinară;

11 - comparativ cu bioprodusele realizate conform unor procedee menționate [7, 28, 29],
la care s-au evidențiat efectele antitusive, antifungice și antiparazitare ale hederasaponinei
13 C și α -hederinei, la preparatele fitoterapice conform invenției, s-au demonstrat prin studii
preclinice, *in vitro* și *in vivo*, efectuate pe model de stimulare mitogenică a limfocitelor normale,
15 cât și pe linii tumorale standardizate specifice, prezența unei activități antitumorale (în special,
în tumori mamare, dar și în tumori cervicale și ale prostatei), evidențiată prin:

- 17 - inhibarea fazei de sinteză a ADN din secvențialitatea ciclului celular;
- inhibarea proliferării celulelor tumorale;
- 19 - inducerea fenomenului apoptozei timpurii/târzii;
- activitate antiangiogenetică prin care se reduce/inhibă irigarea tumorii;
- 21 - efect profilactic privind toxicitatea și difuzia tumorală sistemică.

În contextul evoluției tumorale și independent de aceasta, preparatele conform invenției
23 prezintă și alte calități farmacotoxicologice de interes terapeutic:

- toxicitate redusă și absența efectelor adverse, ceea ce le conferă un raport efica-
25 citate/toxicitate superior altor medicamente antitumorale existente, care prezintă un grad ridicat
de toxicitate, exprimat printr-un indice terapeutic mic, deoarece dozele terapeutice sunt foarte
27 apropiate de dozele toxice;

- potențial antioxidant și hepatoprotector relevant în terapeutila oncologică și umană,
29 pentru contracararea efectelor adverse imunosupresoare și hepatotoxice induse de tratamente
antineoplazice;

- selectivitatea efectului citotoxic, care contribuie la menținerea funcționalității normale
a principalelor organe vitale, la reglarea parametrilor fiziologici în cadrul terapiliilor asociate
33 cu citostatice.

În baza acestor efecte farmacologice, preparatele fitoterapice, obținute conform invenției,
35 au fost condiționate sub formă de noi produse medicamentoase și cosmetice, de uz uman
și/sau veterinar precum: capsule, soluții injectabile, buvabile și de uz extern, gel, cremă,
37 supozitoare, destinate unor noi aplicații terapeutice, față de cele cunoscute în prezent.

Procedeul conform invenției constă în valorificarea integrală la nivel industrial a
39 componentelor triterpenice glicozidate din materia primă vegetală, *herba Hedera helix* în stare
uscată și măcinată, care se extrage cu soluție hidroetanolică de 50...80%, la temperatura
41 de 18...25°C, timp de 12...18 h.

Soluția extractivă obținută se supune operației de concentrare sub vid la 40°C, prin
43 obținerea unui extract concentrat apos ce este supus extracției lichid/lichid în două etape
succesive, astfel:

45 - pentru obținerea GSO-1 brut, în prima etapă, extractul apos concentrat se extrage
cu acetat de etil în raport 1:1 - 1:4 extract apos:acetat de etil, faza organică se colectează
47 și se prelucrează în continuare prin, concentrare sub vid în raport 1/30 pentru recuperarea
acetatului de etil și suspendarea în acetonă a extractului concentrat obținut, moment în care

RO 125279 B1

glicozidele monodesmozidice precipită și se separă prin filtrare sub formă de pulbere verzuie cu un conținut în saponine triterpenice monodesmozidice totale cu aglicon hederagenină de 50...60%, din care α -hederina 30...40% ce reprezintă preparatul de GSO-1-brut;	1
- pentru purificarea preparatului brut de GSO-1, acesta se supune unei recristalizări cu alcool etilic 95%, prin dizolvare, decolorare cu cărbune și concentrare, obținându-se produsul final sub forma unei pulberi albe cristaline, cu un conținut în saponine triterpenice monodesmozidice totale cu aglicon hederagenina de minimum 95%, din care α -hederina între 70 și 80%;	3
- extractul apos remanent se supune etapei a doua de separare lichid/lichid cu n-butanol în raport 1:1...1:3 extract apos : n-butanol pentru separarea hederacozidelor bisdesmozidice în faza organică, după care se prelucrează în continuare prin concentrare sub vid pentru recuperarea butanolului, suspendarea în acetonă a extractului concentrat obținut, moment în care hederasaponinele precipită și se separă prin filtrare sub formă de pulbere nisipoasă de culoare galben-cafenie cu un conținut în saponine triterpenice bisdesmozidice totale cu aglicon hederagenina de 50...60%, din care Hederacozida C între 30 și 40%, obținând astfel preparatul GSO-2 brut;	5
- pentru purificarea preparatului GSO-2 brut, tehnologia conform invenției propune dizolvarea acestuia în alcool etilic 60...70% în raport 1/100, decolorarea cu cărbune, concentrarea extractului până la faza apoasă, extracția lichid/lichid cu n-butanol în raport 1:3, urmată de concentrare și cristalizarea din faza organică. Se obține astfel preparatul purificat de GSO-2 sub forma unei pulberi alb-gălbuie cristaline, cu un conținut în saponine triterpenice bisdesmozidice totale cu aglicon hederagenina de minimum 90%, din care Hederacozida C între 50 și 75%;	7
- pentru obținerea complexului bioactiv lichid, caracterizat în compuși glicozidați bisdesmozidici cu aglicon acid oleanolic, filtratul acetonic obținut după separarea prin filtrare a GSO-2 brut se concentrază sub vid pentru recuperarea solventului, se reunește cu extractul apos remanent (de la extracția hederacozidelor cu n-butanol), bogat în compuși polifenolici, se concentrează și se obține astfel GSO-3 cu un conținut de saponine bisdesmozidice cu aglicon acid oleanolic cuprins între 1 și 3 g/100 ml și acizi polifenolcarboxilici între 1,5 și 5 g/100 ml, ce se condiționează într-un solvent cosmetic acceptabil (butilenglicol, glicerină, propilenglicol);	9
- filtratul acetonic clorofilian, obținut după separarea GSO-1 brut, se concentrează, se alcalinizează la $pH=8,5...12,5$, se suspendă în soluția de sulfat de cupru 10%, în mediu acid la $pH=2...4,5$, timp de minimum 30 min, la temperatura ambiantă, urmată de solubilizarea Cu-clorofilei obținute în mediu alcalin în soluție de NaOH la $pH= 8,5...12,5$, moment în care se formează sarea solubilă în apă a pigmentilor clorofilieni, sub forma unei soluții apoase de culoare verde intens, stabilă în timp, având un conținut în saponine monodesmozidice cu aglicon acid oleanolic între 0,2 și 1 g/100 ml și de clorofilă totală între 0,1 și 0,5 g /100 ml extract.	11
În continuare, sunt descrise 10 exemple de realizare a invenției, care se referă la procedeul de obținere a produselor fitoterapice din planta <i>Hedera helix</i> , la testele efectuate în vederea evidențierii activității specifice și evaluării aplicațiilor în terapeutică, precum și produsele medicamentoase și cosmetice condiționate.	13
Exemplul 1. Procedeul de obținere a preparatelor fitoterapice din planta <i>Hedera helix</i>	15
30 kg materie primă vegetală <i>herba Hedera helix</i> uscată și măcinată se introduc în vasul de extracție tip percolator de inox de capacitate 300 L, se extrage prin percolare dinamică cu alcool etilic de uz farmaceutic cu o concentrație 80%, în raport 1:15 materie primă vegetală : solvent, la temperatura ambiantă, timp de 12 h, urmată de concentrarea soluției extractive obținute cu recuperarea solventului.	17

RO 125279 B1

1 *Obținerea preparatului GSO-1*

3 Extractul concentrat obținut în cantitate de 50 L se supune extracției lichid/lichid, cu
150 L acetat de etil. Faza de acetat de etil separată se filtrează și se concentrează sub vid,
până la un raport 1/30 se suspendă sub agitare în 10 L acetonă cand are loc precipitarea α -
5 hederinei ce se separă prin filtrare sub vid și uscare la 65°C. Pulberea obținută în cantitate
700 g de culoare verde ce reprezintă preparatul GSO-1 brut are un conținut în saponine
7 triterpenice monodesmozidice totale cu aglicon hederagenina de 50%, din care 35% α -hederina.

9 Pentru obținerea unei substanțe cu o puritate avansată produsul brut de GSO-1 se
supune unei operații de purificare prin dizolvare în 40 L alcool etilic 95% decolorare utilizând
cărbune activ și concentrare cu recuperarea solventului și cristalizare, după filtrare și uscare
11 se obțin 200 pulbere albă cristalină cu un conținut în saponine triterpenice monodesmozidice
totale cu aglicon hederagenina de 95%, din care α -hederina de 75%, ce reprezintă preparatul
13 fitoterapeutic GSO-1.

15 *Obținerea preparatului GSO-2*

17 Extractul apos remanent se supune etapei a doua de separare lichid/lichid cu 75 L
n-butanol pentru separarea hederacozidelor bisdesmozidice în faza organică. Faza n-butanolică
în cantitate de 75 L se colectează și se prelucrează în continuare prin concentrare sub vid,
19 pentru recuperarea butanolului, suspendarea extractului concentrat obținut în 60 L acetonă,
moment în care hederacozida C precipită și se separă prin filtrare. Se obține astfel preparatul
brut de GSO-2 în cantitate de 1,2 kg sub formă de pulbere nisipoasă de culoare galben cafenie,
21 cu un conținut în saponine triterpenice bisdesmozidice totale cu aglicon hederagenina de 58%,
din care Hederacozida C de 32%. Pentru obținerea unei substanțe cu o puritate avansată,
23 produsul brut GSO-2, 1,2 kg se dizolvă în 120 L alcool etilic 70%, se decolorează cu cărbune
activ, iar după concentrarea extractului până la faza apoasă, acesta este supus extracției
25 lichid/lichid cu 12 L n-butanol, urmată de concentrare sub vid și cristalizarea din faza organică.
Se obține astfel preparatul purificat de GSO-2 în cantitate de 440 g, sub forma unei pulberi
27 alb-gălbui cu un conținut în saponine triterpenice bisdesmozidice totale cu aglicon hederagenina
de 90%, din care Hederacozida C de 65%, ce reprezintă preparatul fitoterapeutic GSO-2.

29 *Obținerea extractului bioactiv lichid GSO-3*

31 Pentru obținerea extractului bioactiv lichid caracterizat în compuși glicozidați
bisdesmozidici cu aglicon acid oleanolic, filtratul acetonic obținut după separarea preparatului
brut GSO-2 în cantitate de 60 L se concentrează sub vid, pentru recuperarea solventului, se
33 reunește cu extractul apos remanent 50 L (de la extracția hederacozidei C cu n-butanol) bogat
în compuși polifenolici și se condiționează prin concentrare în 5 L propilenglicol. Se obține
35 astfel extractul bioactiv lichid standardizat în compuși triterpenici glicozidați bisdesmozidici
cu aglicon acid oleanolic de 1,2 g/100 ml și acizi polifenolcarboxilici de 1,7 g/100 ml.

37 *Obținerea preparatului de CuNa-clorofilă*

39 Filtratul acetonic -10 L- obținut după separarea prin filtrare a pulberii de GSO-1 brut,
ce conține compuși triterpenici glicozidați monodesmozidici cu aglicon acid oleanolic și complexul
de pigmenti clorofilieni, se concentrează până la un raport 1/20, se suspendă în 25 L soluție
41 apoasă alcalină la $pH=8,5...12,5$, se separă prin filtrare după care se suspendă în 10 L soluția
de sulfat de cupru 10%, în mediu acid la $pH=2...4,5$ timp de minimum 30 minute, la temperatura
43 ambiantă, urmată de solubilizarea Cu-clorofilei obținute într-o soluție apoasă alcalină, de NaOH
la $pH= 8,5...12,5$, moment în care se formează sarea de sodiu solubilă în apă a pigmentilor
45 clorofilieni, condiționată sub forma unei soluții apoase de culoare verde intens, stabilă în timp,
în cantitate de 15 L, standardizată în saponine monodesmozidice cu aglicon acid oleanolic
47 de 0,42 g/100 ml și de 0,35 g clorofilă totală/100 ml extract.

RO 125279 B1

În baza rezultatelor testelor *in vitro* și *in vivo* aplicate, preparatele fitoterapice din planta *Hedera helix*, obținute conform invenției, se pot condiționa sub formă de produse medicamentoase de uz intern și extern, destinate tratamentului unor tumori benigne și maligne, cu precădere terapiei neoplaziei mamare, pentru uz uman și veterinar. 1 3

Produsele medicamentoase, condiționate conform invenției, sunt administrabile pe cale parenterală, orală sau topică, timp de 1...12 luni, în funcție de evoluția bolii, exemplele de formulare prezentate în continuare neexcluzând posibilitatea realizării altor formule de condiționare, având în vedere diversitatea și multitudinea excipienților cunoscuți și utilizați în prezent în industria farmaceutică. 5 7 9

Teste in vitro și in vivo privind activitatea antitumorală a preparatului fitoterapic cu GSO1 și GSO2 11

Progresele deosebite înregistrate în ultimul deceniu în domeniul biochimiei și biologiei moleculare au influențat în mod determinant cercetările farmacologice efectuate în scopul aprofundării unor procese fiziologice care au loc în organismul uman, precum și evidențierii transformărilor biochimice, histologice și enzimatică, care au loc în diferite condiții patologice. În acest domeniu se menționează ca predominantă amploarea cercetărilor *in vitro*, în sisteme acelulare și celulare, care preced testele *in vivo*, completând rezultatele acestora cu noi date experimentale, care elucidează noi mecanisme de acțiune ale unor hormoni și enzime sau aprofundează biotransformările survenite în cursul metabolizării unor noi medicamente. 13 15 17 19

Pentru testarea *in vitro* a complexelor bioactive au fost utilizate celule normale (limfocite umane normale, nestimulate și stimulate mitogenic) și celule tumorale relevante în patologia neoplazică ținta pentru determinarea citotoxicității și a acțiunii specifice (HeLa - celule aderente de tip epitelial de carcinom cervical, Hep-2 - celule aderente de tip epitelial de carcinom cervical (derivat de HeLa), MCF-7 - celule aderente de tip epitelial de adenocarcinom de sân, DU 145 - celule aderente de tip epitelial de carcinom de prostată). 21 23 25

1. Activitatea antitumorală

În cadrul screening-ului farmacologic preliminar de investigare a activității antitumorale a preparatelor fitoterapice s-au efectuat studii experimentale *in vitro*, privind citotoxicitatea și acțiunea specifică exercitată asupra unor parametri relevanți în statusul proliferativ celular privind inducerea apoptozei timpurii și târzii, secvențialitatea ciclului celular și proliferarea celulară. S-a investigat influența biocomplexelor în procesul de angiogeneză, ca mecanism alternativ de blocare a progresiei tumorale. În aceeași ordine de idei, s-a experimentat modelul *in vitro* de inducere a stimulării mitogenice a limfocitelor separate din sânge periferic uman pentru extrapolarea fenomenelor *in vivo*, mimând un răspuns imun policlonal mediat de limfocitele T. 27 29 31 33 35

În continuare se prezintă rezultatul testărilor referitoare la profilul toxic și de acțiune specifică a complexelor bioactive GSO1 (complexul bioactiv glicozidat sub formă de pulbere albă cristalizată purificată cu un conținut în saponine triterpenice monodesmozidice totale cu aglicon hederagenina de minimum 95% standardizat în α -hederina de 70...80%) și GSO2 (complexul bioactiv glicozidat sub formă de pulbere alb-crem cristalizată purificată cu un conținut în saponine triterpenice bisdesmozidice totale cu aglicon hederagenina de minimum 90%, standardizat în Hederacozida C de 60...75%). Datele experimentale au fost raportate după caz, la martori de cultură și solvent. 37 39 41 43

1. Activitatea asupra statusului citotoxic și activitate metabolică - realizate prin teste standardizate de determinare a reducerii MTS (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-H-tetrazoliu) și LDH (lactat dehidrogenaza) utilizând tehnica ELISA. S-au urmărit efectele biocomplexelor asupra viabilității și multiplicării celulare (valorile testului 45 47

RO 125279 B1

1 MTS) corelate cu activitatea asupra potențialului citotoxic, exprimat prin valorile obținute în
 2 testul LDH. Se demonstrează astfel acțiunea citotoxică și/sau citostatică a complexelor
 3 bioactive.

5 *Tabelul 1*

6 *Efectul citotoxic/citostatic exercitat de biocomplexul GSO1 asupra celulelor tumorale*
 7 *standardizate. S-a determinat IC₅₀ - semnificație statistică p<0,05 prin algoritmul*
 8 *"one-way ANOVA"*

Linia celulară/ Substanța	MCF7		HeLa		Hep	
	MTS IC ₅₀ (μM)	LDH IC ₅₀ (μM)	MTS IC ₅₀ (μM)	LDH IC ₅₀ (μM)	MTS IC ₅₀ (μM)	LDH IC ₅₀ (μM)
MC	18,8±0,075	19,6±0,201	18,2±0,086	17,6±0,193	9,2±0,126	10,6±0,279
MS	16,5±0,145	17,4±0,089	16,9±0,106	15,9±0,073	8,4±0,084	9,5±0,203
GSO1	14,7±0,057	14,5±0,142	12,3±0,312	12,7±0,105	5,1±0,135	6,8±0,079
α-hederina etalon	16,2±0,137	20,2±0,069	14,7±0,157	18,3±0,099	8,6±0,163	11,7±0,109

19 MC = martor celular

20 MS = martor de solvent

21
 22 Din analiza datelor prezentate în tabelul 1, se evidențiază faptul că biocomplexul GSO1
 23 exercită asupra celulelor tumorale mamare (MCF) și cervicale (He și HeLa) acțiune citotoxică
 24 moderată și efect citostatic semnificativ prin scăderea valorii MTS IC₅₀ și LDH IC₅₀, indicând
 25 scăderea ușoară a viabilității celulare și inhibarea multiplicării celulare. Se remarcă acțiunea
 26 citotoxică a substanței etalon comparativ cu GSO1 și MS, prin scăderea valorii MTS IC₅₀ și
 27 creșterea valorii LDH IC₅₀, indicând scăderea viabilității și multiplicării celulare prin creșterea
 28 eliberării LDH.

29 Produsul GSO1 are efect citostatic, statistic semnificativ, în intervale de concentrații
 30 specifice fiecărei linii celulare testate comparativ cu acțiunea pregnant citotoxică a substanței
 31 etalon (puritate >95% HPLC).

32 *Tabelul 2*

33 *Efectul citotoxic/citostatic exercitat de biocomplexul GSO2 asupra celulelor tumorale*
 34 *standardizate. S-a determinat IC₅₀ - semnificație statistică p<0,05 prin algoritmul*
 35 *"one-way ANOVA"*

Linia celulară	DU 145	
	MTS IC ₅₀ (μM)	LDH IC ₅₀ (μM)
MC	19,3±0,096	19,7±0,153
GSO2	16,2±0,209 ^{***}	16,7±0,359 ^{***}
Hederacozida C etalon	17,3±0,072	20,9±0,173

36 MC = martor celular

37 Diferențele statistic semnificative ale indicelui de proliferare (P < 0,05) sunt indicate prin:

38 *** - extrem de semnificativ

39 P < 0,001

RO 125279 B1

** - foarte semnificativ	0,001 < P < 0,01	1
* - semnificativ	0,01 < P < 0,05	
ns - nesemnificativ	P > 0,05	3
a - vs MC		

Datele experimentale indică în cazul complexului GSO2 (puritate >60% HPLC) un efect citostatic moderat statistic semnificativ superior acțiunii substanței etalon (de puritate >95% HPLC) asupra celulelor derivate din cancer de prostată. 5

În concluzie, biocomplexele testate obținute în cadrul Biotehnos prezintă un profil citotoxic redus și efecte citostatice statistic semnificative superioare acțiunii substanțelor etalon. 7

2. *Activitatea asupra apoptozei* - evaluată pe baza evidențierii translocării fosfatidil-serinei, 11

eveniment timpuriu al inducerii apoptozei simultan cu fragmentarea nucleară și permeabilizarea membranei plasmatică caracteristice apoptozei târzii (dublă marcarea fluorescentă cu Anexina -FITC, respectiv, iodura de propidium). 13

RO 125279 B1

Tabelul 3

Efectul exercitat de biocomplexul GSO1 asupra inducerii procesele apoptice versus necrotice în celule tumorale cervicale. S-a determinat IC_{50} - semnificație statistică $p \leq 0,05$ prin algoritmul "one-way ANOVA"

Compus testat (μM)	Linie celulară Hep 2			Linie celulară HeLa		
	% celule vii	% apoptozei	% necroza	% celule vii	% apoptoza	% necroza
MS	93,3±0,374	1 ±0,195	5,6±0,097	81,6±0,642	14,9±0,187	3,5±0,043
GSO1 [8 μM]	63,1±0,815 ^{**a, **b}	30,9±0,426 ^{***a}	6±0,383	38,5±0,226 ^{***a, ***b}	60,7±0,543 ^{***a, ****b}	0,8±0,0003 ^{*a}
GSO1 [10 μM]	70,2±0,515 ^{**a}	21,1±0,912 ^{***a}	8,7±0,296 ^{**a}	54,3±0,426 ^{***a}	42,2±0,274 ^{***a}	3,6±0,009
GSO1 [14 μM]	79,6±0,671 ^{**a}	14,1±0,613 ^{***a}	6,3±0,520	57,9±0,698 ^{***a}	39,2±0,140 ^{***a}	2,9±0,019

MS = martor de solvent

Diferențele statistic semnificative ale indicelui de proliferare ($P < 0,05$) sunt indicate prin:

*** - extrem de semnificativ $P < 0,001$

** - foarte semnificativ $0,001 < P < 0,01$

* - semnificativ $0,01 < P < 0,05$

ns - nesemnificativ $P > 0,05$

a - vs MCS; b - vs GSO1 14 μM ;

Efectul exercitat de biocomplexul GSO1 asupra inducerii proceselor apoptotice versus necrotice în celule tumorale mamare. S-a determinat IC_{50} - semnificație statistică $p \leq 0,05$ prin algoritmul "one-way ANOVA" 3

Compus testat (μM)	Linie celulară IVICF7		
	% celule vii	% apoptoză	% neacroză
MS [8 μM]	77,9 \pm 0,357	12,82 \pm 0,395	9,2 \pm 0,123
MS [10 μM]	78,9 \pm 0,182	14,1 \pm 0,091	8 \pm 0,195
MS [14 μM]	80,77 \pm 0,097	11,50 \pm 0,106	7,73 \pm 0,274
GSO1 [8 μM]	64,5 \pm 0,241 ^{**a}	24,30 \pm 0,126 ^{**a}	11,14 \pm 0,085
GSO1 [10 μM]	57,5 \pm 0,075 ^{***b}	31,5 \pm 0,221 ^{***b}	11,1 \pm 0,175
GSO1 [14 μM]	54,1 \pm 0,395 ^{***c}	36,55 \pm 0,113 ^{***c}	9,4 \pm 0,048

MS = martor de solvent 13

Diferențele statistic semnificative ale indicelui de proliferare ($P < 0,05$) sunt indicate prin: 15

*** - extrem de semnificativ $P < 0,001$ 15

** - foarte semnificativ $0,001 < P < 0,01$ 17

* - semnificativ $0,01 < P < 0,05$ 19

ns - nesemnificativ $P > 0,05$ 19

a - vs MS 8 μM ; b - vs MS 10 μM ; c - MS 14 μM

Efectul exercitat de biocomplexul GSO2 asupra inducerii proceselor apoptotice versus necrotice în celule provenite din cancer de prostată. S-a determinat IC_{50} - semnificație statistică $p < 0,05$ prin algoritmul "one-way ANOVA" 23

Compus testat (μM)	Linie celulară DU145		
	% celule vii	% apoptoză	% necroză
MC	85,3 \pm 0,395	11,3 \pm 0,395	3,4 \pm 0,014
GSO2 [10 μM]	5,4 \pm 0,0935 ^{***a}	93,2 \pm 0,326 ^{***a}	1,4 \pm 0,009 ^{*a}
GSO2 [14 μM]	5,4 \pm 0,019 ^{***a}	93,7 \pm 0,157 ^{***a}	0,9 \pm 0,003 ^{***a}
GSO2 [24,56 μM]	33,3 \pm 0,085 ^{***a}	62,2 \pm 0,301 ^{*a}	4,5 \pm 0,026

MS = martor de solvent 31

Diferențele statistic semnificative ale indicelui de proliferare ($P < 0,05$) sunt indicate prin: 33

*** - extrem de semnificativ $P < 0,001$ 33

** - foarte semnificativ $0,001 < P < 0,01$ 35

* - semnificativ $0,01 < P < 0,05$ 37

ns - nesemnificativ $P > 0,05$ 37

a - vs MC, b - vs GSO2 24,56 μM

După primirea semnalelor apoptotice de la agenții antitumorali, celulele intră în apoptoză timpurie, urmată de apoptoză târzie/necroză secundară. Complexele bioactive acționează prin inducerea morții celulare apoptotice cu cinetica specifică prin fragmentare nucleară, cauzată de scindarea endonucleară a ADN-ului genomic. 41

RO 125279 B1

1 Din tabelul 4, se remarcă acțiunea selectivă a GSO1 de inducere progresivă a
fenomenului de apoptoză în celulele MCF7 (adenocarcinom mamar), exercitată în maniera
3 doză-efect.

5 Datele experimentale rezumate în tabelul 3, arată că la nivel de carcinom cervical,
atât în celule de tip Hep2, cât și în cele de tip HeLa, se constată o creștere a numărului de
celule apoptotice ca efect al prezenței GSO1 în mediul extracelular invers proporțională cu
7 concentrația de complex bioactiv.

9 Pe de altă parte, se evidențiază faptul că GSO2 (6-12 μM) acționează selectiv în carci-
nomul de prostată (linia DU 145), inducând procese caracteristice apoptozei - vezi tabelul 5.

11 Creșterea fracțiunii celulelor apoptotice este dublată de prezența unui procent de celule
necrotice comparativ cu a martorului de cultură/martorului de solvent ceea ce semnifică un
efect toxic convenabil al produsului.

13 3. *Activitatea asupra secvențialității ciclului celular* relevată prin determinarea procentului
de celule în fazele ciclului celular, Go/G1, S (sinteza ADN) și G2M prin tehnici de citometrie
15 în flux și marcarea fluorescență a nucleilor celulari cu iodură de propidiu legată stoichiometric
la ADN.

Tabelul 6

19 *Variația procentului de celule aflate în faza de sinteză a ADN a ciclului celular ca efect al*
acțiunii biocomplexului GSO1 asupra celulelor MCF 7 HeLa și Hep 2. S-a determinat IC_{50}
21 *- semnificație statistică $p < 0,05$ prin algoritmul "one-way ANOVA"*

Linia celulară/ Biocomplex	% faza S de sinteză ADN		
	MCF 7	HeLa	Hep
MS [8,5 μM]	86,56 \pm 1,018	35,57 \pm 1,741	30,10 \pm 1,484
MS [10,6 μM]	83,25 \pm 1,009	31,54 \pm 1,091	33,08 \pm 0,878
MS [14,1 μM]	85,25 \pm 1,097	24,08 \pm 1,568	34,09 \pm 0,358
GSO1 [8,5 μM]	56,37 \pm 0,815 ^{**a}	24,46 \pm 0,279 ^{**a}	7,820 \pm 0,716 ^{***a}
GSO1 [10,6 μM]	53,08 \pm 0,215 ^{**b}	24,44 \pm 0,859 ^{*b}	12,00 \pm 0,732 ^{***b}
GSO1 [14,1 μM]	33,72 \pm 0,317 ^{***c,**d}	23,33 \pm 0,930 ^{ns}	15,09 \pm 0,273 ^{***b}

31 MS = martor solvent

33 Diferențele statistic semnificative ale indicelui de proliferare ($P < 0,05$) sunt indicate prin:

*** - extrem de semnificativ $P < 0,001$

35 ** - foarte semnificativ $0,001 < P < 0,01$

* - semnificativ $0,01 < P < 0,05$

37 ns - nesemnificativ $P > 0,05$

a - vs MS 8,5 μM ; b - vs MS 10,6 μM ; c - vs MS 14,1 μM ; d - vs GSO1 8,5 μM

RO 125279 B1

Tabelul 7

Variația procentului de celule aflate în faza GO/G1 din cadrul ciclului celular ca efect al acțiunii biocomplexului GSO1 asupra celulelor MCF 7, HeLa și Hep 2. S-a determinat IC_{50} - semnificație statistică $p < 0,05$ prin algoritmul "one-way ANOVA"

Linia celulară/ Biocomplex	% faza GO/G1 a ciclului celular			% faza G2/M a ciclului celular		
	MCF 7	HeLa	Hep	MCF 7	HeLa	Hep
MS [8,5 μM]	12,41±0,364	54,46±0,148	65,75±0,245	1,03±0,106	10,06±0,317	4,15±0,554
MS [10,6 μM]	15,21±0,354	56,36±0,465	60,39±0,843	1,36±0,222	12,05±0,614	6,53±0,34
MS [14,1 μM]	13,22±0,225	60,54±0,786	62,4±0,124	0,98±0,144	11 ±0,247	5,43±0,443
GSO1 [8,5 μM]	42,75±0,412 ^{***a**d}	66,2±0,317 ^{**a}	82,33±0,348 ^{***a}	1,88±0,096	9,5±0,156	9,85±0,113 ^{***a}
GSO1 [10,6 μM]	45,44±0,365 ^{***b; **d}	61,74±0,235 ^{**b}	75,04±0,454 ^{***b}	4,17±0,088 ^{***b}	13,82±0,456	12,95±0,765 ^{***b}
GSO1 [14,1 μM]	63,02±0,554 ^{***c}	65,3±0,287	74,27±0,113 ^{***c}	3,26±0,012 ^{***c}	11,54±0,273	10,65±0,36 ^{***c}

MS = martor solvent

a - vs MS 8,5 μM, b - vs MS 10,6 μM, c - vs MS 14,1 μM, d - vs GSO1 14,1 μM

RO 125279 B1

1 Datele rezumate în tabelul 6 arată faptul că celulele tumorale mamare și cervicale sunt
 2 deosebit de responsive la acțiunea GSO1 în ceea ce privește mecanismele sintezei ADN,
 3 astfel încât se constată o inhibare semnificativă a celulelor replicative. Parcurgerea ciclului
 4 celular de către celulele tumorale de tip mamar și cervical sub influența GSO1 arată că
 5 secvențialitatea ciclului celular este modulată și în ce privește numărul de celule din celelalte
 6 faze - tabelul 7. Sunt influențate mecanismele creșterii și multiplicării celulare la nivelul inițierii
 7 progresiei ciclului celular, în interfață cu posibilitatea blocării celulare în punctul Go.

8 4. *Activitate asupra proliferării celulare* - evaluată prin citometrie în flux și marcarea
 9 fluorescentă cu carboxi fluorescein diacetat succinimidil ester.

11 *Tabelul 8*

12 *Variația indicelui de proliferare celulară în liniile MCF7, HeLa și Hep2 în prezența GSO1 în*
 13 *mediul de cultură. S-a determinat IC₅₀ - semnificație statistică p < 0,05 prin algoritmul*
 14 *"one-way ANOVA"*

Linia celulară/ Biocomplex	Indice de Proliferare (IP)		
	MCF7	HeLa	Hep2
MC	7,76±0,42	1,470±0,069	4,150±0,213
GSO1 [8,5 μM]	5,24±0,083	1,720±0,27 ^a	2±0,127 ^{***a}
GSO1 [10,6 μM]	5,02±0,116	1,673±0,034	1,97±0,029 ^{***a}
GSO1 [12 μM]	4,91±0,231 ^{**a}	1,026±0,018 ^a	1,83±0,102 ^{***a}
GSO1 [14,1 μM]	3,56±0,198 ^{***a}	1,00±0,008 ^b	1,4±0,2 ^{***a}
GSO1 [16 μM]	1,45±0,242 ^{***a,***b}	0,876±0,054 ^a	1±0,078 ^{***a**b}
MTX [5 nM]	3,77±0,046 ^{***a}	0,398±0,008 ^{***a}	1,675±0,067 ^{***a}

16 MC = martor celular

17 MTX = metrotexat

18 Diferențele statistic semnificative ale indicelui de proliferare (P < 0,05) sunt indicate prin:

19 *** - extrem de semnificativ P < 0,001

20 ** - foarte semnificativ 0,001 < P < 0,01

21 * - semnificativ 0,01 < P < 0,05

22 ns - nesemnificativ P > 0,05

23 a -vs MC; b - vs MTX 5 nM.

24 Tabelul 8 arată inhibiția marcantă în maniera doză-efect a capacității proliferative a
 25 celulelor tumorale din adenocarcinom mamar și cervical de tip Hep2, precum și inducerea
 26 unui ușor efect antiproliferativ asupra tumorilor cervicale HeLa.

27 GSO1 reduce numărul de generații în procesele proliferative la nivelul celulelor tumorale
 28 studiate față de martorul pozitiv.

Variația indicelui de proliferare celulară în linia celulară DU145 în prezența GSO2 în mediul de cultură. S-a determinat IC_{50} - semnificație statistică $p < 0,05$ prin algoritmul "one-way ANOVA"

Linia celulară	DU 145
Biocomplex	Indice de Proliferare (IP)
MC	4,150±0,213
GSO2 [10 μM]	2±0,127 ^{***a,*b}
GSO2 [14 μM]	1,750±0,28 ^{***a}
GSO2 [24,56 μM]	1,4±0,2 ^{***a}
MTX 5 nM	1,67±0,0,067 ^{***a}

MC

Diferențele statistic semnificative ale indicelui de proliferare ($P < 0,05$) sunt indicate prin:

*** - extrem de semnificativ $P < 0,001$

** - foarte semnificativ $0,001 < P < 0,01$

* - semnificativ $0,01 < P < 0,05$

ns - nesemnificativ $P > 0,05$

a - vs. MC, b - vs MTX

GSO2 (10-24,56 μM) reduce, în maniera doză-efect, numărul de generații în procesele proliferative ale celulelor DU 145, prin urmare biocompusul exercită un efect antiproliferativ specific asupra celulelor provenite din cancer de prostată.

5. *Activitate asupra proceselor de angiogeneză*, evaluată prin metoda Ribatti, pe membrana embrionară chorioalantoică de pui (43). S-a determinat acțiunea antiangiogenică a compusului GSO1, prin care se demonstrează că efectul antitumoral se manifestă prin mecanisme alternative de blocare a progresiei tumorale datorate proceselor de reducere sau inhibiție a irigării tumorii.

GSO1 exercită un puternic efect cicatrizant evidențiat atât prin testul pe ou embrionat (refacerea vaselor de sânge), cât și în experimente preclinice pe șoarece B6D2F1, în care s-a remarcat refacerea rapidă a unor leziunilor induse. Acțiunea GSO1 induce etapizat hemoliză, apoi cicatrizare și supraviețuirea embrionului prin mecanisme de reducere a vascularizației ceea ce evidențiază caracterul antiangiogenic al biocomplexului.

6. *Activitate asupra modulării fazei de sinteză ADN a limfocitelor normale*, separate din sânge periferic uman, stimulate mitogenic cu fitohemaglutinina (PHA) 20 μg/ml, prin care se extrapolează fenomenele *in vivo* privind răspunsul limfocitelor la intervenția unui factor de creștere a proliferării (spre exemplu multiplicare stimulată în cadrul proceselor tumorale). Testele aplicate în scopul evidențierii influenței complexelor bioactive asupra secvențialității ADN a ciclului celular specific celulelor mononucleare stimulate *in vitro* au constat în monitorizarea fazei de sinteză ADN și a efectului indus asupra capacității proliferative a limfocitelor nestimulate, în condițiile prezenței în mediu a GSO1, respectiv, GSO2.

Efectul GSO1 și GSO2 asupra limfocitelor stimulate mitogenic și asupra capacității proliferative bazale, exprimată de procentele de limfocite nestimulate care parcurg faza de sinteză ADN în condițiile întreținerii culturii 48 h

	% faza S de sinteză ADN	
	Limfocite ne-stimulate	Limfocite stimulate cu PHA 48 h
MC	0,15±0,0001	21,55±10,59
GSO1 [8 μM]	0	16,5±0,54 ^{***b}
GSO1 [12 μM]	0,0410,0009 ^{***a}	14,03±0,01 ^{***b}
GSO2 [32 μM]	0	21,7±0,38 ^{ns b}
GSO2 [50 μM]	0	23,6±0,41 ^{ns b}

MC = martor celular

a - vs MC nestimulat; b - vs MC stimulat cu PHA

Din tabelul 10 rezultă că biocomplexele nu influențează capacitatea proliferativă bazală a limfocitelor exprimată prin numărul celulelor nestimulate prezente în faza de sinteză ADN, ceea ce arată faptul că prezența GSO1 și GSO2 nu afectează *in vitro* statusul fiziologic normal. Se manifestă însă un efect inhibitor semnificativ, în maniera doză - efect, al GSO1 asupra celulelor stimulate cu mitogen care se află în faza de sinteză S. De asemenea, acțiunea GSO2 este prezentă în sistemul experimental, indicând scăderea procentului celulelor mononucleare replicative direct proporțională cu creșterea concentrației de biocomplex. Realizarea modelului *in vitro* de inducere a stimulării mitogenice a limfocitelor separate din sânge periferic uman pentru extrapolarea fenomenelor *in vivo* au arătat că intervenția complexelor bioactive induce un răspuns imun policlonal mediat de limfocitele T favorabil acțiunii antiproliferative impusă în condițiile creșterii necontrolate a tumorilor.

Din analiza și coroborarea datelor experimentale prezentate, se poate concluziona faptul că cele 2 complexe bioactive glicozidate sub formă de pulbere cristalizată purificată, una cu conținut în saponine triterpenice monodesmozidice totale standardizat în α-hederina de 70...80% și cealaltă cu un conținut în saponine triterpenice bisdesmozidice totale standardizat în Hederacozidă C de 60...75% induce citotoxicitate moderată și un pregnant efect citostatic comparativ cu etaloanele existente de α-hederină (minimum 95%) și Hederacozidă C (minimum 95%) și manifestă activitate biologică remarcantă în statusul proliferativ tumoral cu efecte *in vitro* antitumorale dovedite.

II. Activitate antioxidantă și regenerativă *in vitro*

Modelul analitic aplicat pentru demonstrarea potențialului antioxidant al grupului structural GSO1 a utilizat metoda spectrofotometrică indirectă cu 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) ca sistem de generare a radicalului liber stabil DPPH.

Capacitatea reducătoare a extractelor asupra radicalului liber DPPH

Concentrație/ Substanță	Inhibiție%				
	10 μg/ml	20 μg/ml	40 μg/ml	50 μg/ml	80 μg/ml
GSO1	13,02	18,82	27,94	31,47	45,73

Tabelul 11 (continuare)

Concentrație/ Substanță	Inhibiție%				
	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	50 µg/ml	80 µg/ml
GSO2	6,9	13,66	24,55	26,74	49,91
Trolux	21	27	32	40	52

Capacitatea antioxidantă semnificativă, manifestată la nivelul radicalilor liberi de către GSO1, este evidențiată față de Trolux, considerat martor pozitiv, protejând celulele de atacul speciilor de oxigen reactive (SRO).

III. Activitatea hepatoprotectoare in vivo a GSO1 și GSO2, în contextul eficienței acestora în activitatea antitumorală

Acțiunea hepatoprotectoare a complexelor bioactive, exprimată prin determinarea statusului antioxidant total, evaluarea activității enzimaticice a catalazei și dozarea malondialdehidei MDA (indicator specific pentru peroxidarea lipidică) s-a evidențiat pe un model experimental de inducere a unor leziuni hepatice la șobolani Wistar cu CCl₄.

S-au efectuat 3 studii:

I - animalele au fost tratate timp de 7 zile cu GSO1, în ziua a 5-a s-a administrat hepatotoxicul;

II - animalele au fost tratate timp de 14 zile cu GSO2, în ziua a 10-a s-a administrat hepatotoxicul;

III - animalele au primit timp de 7 zile ser fiziologic, apoi au fost tratate timp de 7 zile cu GSO1, respectiv, GSO2, în ziua a 7-a s-a administrat hepatotoxicul.

În urma intoxicării animalelor cu 1 ml/kg g.c. CCl₄:ulei floarea-soarelui, 1:1, v/v, a crescut concentrația radicalilor liberi existenți în plasmă (martorul intoxicat - 0,054 mmol/l față de martorul neintoxicat - 0,018 mmol/l) cu scopul determinării răspunsului sistemic la acțiunea GSO1 și GSO2.

Tabelul 12

Efectul GSO1 asupra statusului antioxidant total la nivel plasmatic

Parametru / Lot		Status antioxidant total	
		fără CCl ₄	cu CCl ₄
Studiul I	LMV (n = 6)	0,018±0,001	0,052±0,013
	LGSO1_1 (n = 6)	0,016±0,003	0,026±0,009**a
	LGSO1_2 (n = 6)	0,014±0,0016	0,020±0,005**a

LMV = lot martor vehicol (ulei)

LGSO1_2 = lot tratat cu GSO1 75 mg/kg. g.c,

LGSO1_2 = lot tratat cu GSO1 150 mg/kg. g.c.

Diferențele statistic semnificative ale indicelui de proliferare (P < 0,05) sunt indicate prin:

*** - extrem de semnificativ P < 0,001

** - foarte semnificativ 0,001 < P < 0,01

* - semnificativ 0,01 < P < 0,05

a - vs martor

RO 125279 B1

1 Conform rezultatelor obținute în urma prelucrării statistice (tabelul 12), s-a observat
că pretratarea animalelor cu GSO1 (75 mg/kg g.c. și 150 mg/kg g.c.) a scăzut nivelul radicalilor
3 liberi existenți în plasmă, efect evidențiat și în cazul animalelor intoxicate cu hepatotoxic. În
cazul lotului LGSO1_2, concentrația radicalilor liberi în plasmă (0,020 mmol/l) a fost similară
5 cu cea a martorului neintoxicat (0,018 mmol/l), prin urmare influența GSO1 a menținut valoarea
fiziologic normală a potențialului oxidativ din plasmă. Pe baza acțiunii reducătoare a GSO1,
7 acesta contracarează semnificativ efectele negative ale speciilor reactive de oxigen manifestând
prin urmare un efect antioxidant remarcabil la nivel sistemic.

Tabelul 13

Efectul GSO1 asupra peroxidării lipidice la nivel plasmatic

Plasma			
Parametru / Lot		Peroxidare lipidică	
		fără CCl ₄	cu CCl ₄
Studiul I	LMV (n = 6)	0,483±0,054	1,458±0,269
	LGSO1 1 (n = 6)	0,475±0,094	1,127±0,103
	LGSO1 2(n = 6)	0,442±0,055	1,128±0,087

19 LMV = lot martor vehicol (ulei)

LGSO1_2 = lot tratat cu GSO1 75 mg/kg. g.c,

21 LGS01_2 = lot tratat cu GSO1 150 mg/kg. g.c,

23 Diferențele statistic semnificative ale indicelui de proliferare ($P < 0,05$) sunt indicate prin:

*** - extrem de semnificativ $P < 0,001$

25 ** - foarte semnificativ $0,001 < P < 0,01$

* - semnificativ $0,01 < P < 0,05$

RO 125279 B1

Tabelul 14

Efectul GSO1 și GSO2 asupra sistemului oxidativ exprimat de gradul peroxidării lipidice și activității catalazei în omogenate hepatice.
Prelucrarea statistică a datelor experimentale s-a realizat aplicând algoritmul one-way ANOVA, urmat de Dunnett's t-test

Omogenat ficat					
Parametri / Lot		Peroxidare lipidică nmolMDA/g proteină		Catalază unit/mg proteină	
		fără CCl ₄	cu CCl ₄	fără CCl ₄	cu CCl ₄
Studiu I	LMV (n = 6)	0,8630±0,0086	2,15±0,109	30,10±1,091	10,71±1,137
	LGSO1_1 (n = 6)	0,7735±0,0158 ^{*a}	1,33±0,088 ^{***a}	31,13±2,414	12,01±1,018
	LGSO1_2 (n = 6)	0,2992±0,005 ^{***a,***b}	1,17±0,011 ^{***a,**b}	47,44±1,441 ^{***a,***b}	22,49±1,076 ^{***a,***b}
Studiu II	LM (n = 6)	0,7700±0,06351	1,65±0,106	42,28±1,372	16,99±1,973
	LGSO2_1 (n = 6)	0,2745±0,1155 ^{*a}	1,25±0,125 ^{*a,***b}	68,35±1,338 ^{*a,*c}	62,67±4,425 ^{*a,*c}
	LGSO2_2 (n = 6)	0,1140±0,0220 ^{**a}	0,29±0,095 ^{***a}	80,68±2,612 ^{*a,*c}	94,18±6,175 ^{**a}
	LHep	0,1045±0,0055 ^{**a}	0,91±0,024 ^{**a}	177,90±2,6862 ^{**a}	112,01±3,606 ^{**a}
Studiu III	LMV (n = 6)	-	1,63±0,211	-	4,95±1,432
	LM(n = 6)	-	1,65±0,185	-	15,02±1,973
	LGSO1_2 (n = 6)	-	0,76±0,107 ^{***a}	-	87,46±3,478
	LGSO2_2 (n = 6)	-	1,22±0,2133 ^{*a}	-	78,47±4,102

LMV = lot tratat cu vehicul (ulei)

LM = lot tratat cu ser fiziologic

LGSO1_1 = lot tratat cu GSO1 75 mg/kg. g.c.

LGSO1_2 = lot tratat cu GSO1 150 mg/kg. g.c.

RO 125279 B1

1 LGSO2_1 = lot tratat cu GSO2 75 mg/kg. g.c,
 LGSO2_2 = lot tratat cu GSO2 150 mg/kg. g.c.
 3 LHep = lot tratat cu arginină perfuzabilă (martor pozitiv pentru activitate hepatoprotectoare)

5 Diferențele statistic semnificative ale indicelui de proliferare ($P < 0,05$) sunt indicate prin:

*** - extrem de semnificativ $P < 0,001$

7 ** - foarte semnificativ $0,001 < P < 0,01$

* - semnificativ $0,01 < P < 0,05$

9 a - vs LMV, b - vs GSO1_1, c - vs LHep, d - vs LM

11 Conform datelor obținute se constată o creștere semnificativă a concentrației MDA
 în țesutul hepatic al șobolanilor Wistar după administrarea hepatotoxicului, indicând
 13 instalarea peroxidării lipidice, datorită metabolizării microzomiale a tetraclorurii de carbon.
 Nivelul cel mai ridicat al peroxidării se atinge, așa cum era de așteptat, la lotul intoxicat cu
 15 tetraclorură (2,15 nmolMDA/g proteină), reprezentând o creștere de 59,6% față de martorul
 neintoxicat. La nivelul țesutului hepatic, în cazul administrării GSO1 animalelor de laborator
 17 sănătoase, se constată o diminuare a concentrației MDA în funcție de doza administrată
 (tabelul 14 - Studiul I), tendința evidențiată și în cazul animalelor cărora li s-a indus inflamația
 19 (lotul LGSO1_1 cu 37,5%, respectiv, lotul LGSO1_2 cu 45,6%). În cazul probelor de plasmă
 (tabelul 13), se observă o slabă acțiune a compusului bioactiv, exercitată asupra
 21 mecanismelor de inițiere și propagare a peroxidării lipidice. Aplicând un model animal similar
 cu cel utilizat în cazul studiului I, s-a constatat că administrarea de GSO2 în absența
 23 xenobiotocului nu induce toxicitate la nivelul ficatului și are aceleași proprietăți protectoare
 ca GSO1 și arginina perfuzabilă utilizată în practica medicală.

25 În cazul în care complexe bioactive au fost administrate subiecților ce prezentau
 leziuni la nivelul ficatului, datorită intoxicației cu hepatotoxic (tabelul 14 - Studiul III), GSO1
 27 a prezentat o protecție mai bună decât substanța cu structură asemănătoare GSO2,
 provocând o diminuare a concentrației de MDA cu 53,24% față de 26,37%).

29 Activitatea enzimatică specifică catalazei este semnificativ scăzută în cazul
 animalelor ce au fost intoxicate cu CCU, excepție făcând lotul LGSO22 pretratată, ce a
 31 menținut nivelul crescut al enzimei. Administrarea celor două complexe bioactive a crescut
 concentrația de catalază la nivelul țesutului hepatic într-o manieră doză-efect, datorită
 33 acțiunii de încetinire/inhibare a proceselor de formare a radicalilor. Interesant este faptul că
 diferența între concentrația catalazei observată în cazul loturilor martor (30 units/mg proteină)
 35 și LGSO1_1 (31 units/mg proteină) nu sunt foarte diferite, însă între cele două doze testate,
 diferențele sunt statistic semnificative. Atunci când grupurile structurale analizate au fost
 37 administrate subiecților cu potențiale leziuni la nivelul parenchimului hepatic (tabelul 14 -
 Studiul III), s-a observat o îmbunătățire semnificativă a statusului enzimatic în ambele
 39 variante studiate, însă GSO1 (87,46 unit/mg proteină) a prezentat o potențare a activității
 enzimatică a catalazei mult mai mare decât GSO2 (78,47 unit/mg proteină).

Tabelul 15

Efectul GSO1 și GSO2 asupra metabolismului proteic la nivel hepatic

Parametri / Lot		Proteine hepatice mg/g țesut		Diferența față de martor (%)	
		fără CCl ₄	cu CCl ₄	fără CCl ₄	cu CCl ₄
Studiul I	LMV (n = 6)	93,71±6,156	84,29±3,257	-	-
	LGSO1_1 (n = 6)	179±6,450	117,9±6,447	20	14,118
	LGSO1_2 (n = 6)	142,6±9,164	140,1±7,05 ^a	52,172	66,212

Tabelul 15 (continuare)

Parametri / Lot		Proteine hepatice mg/g țesut		Diferența față de martor (%)	
		fără CCl ₄	cu CCl ₄	fără CCl ₄	cu CCl ₄
Studiul II	LM (n = 6)	43,44±5,041 ^{***b}	31,25±1,902	-	
	LGSO2_1 (n = 6)	116,9±3,443 ^{***b}	147,6±9,616 ^{***b}	169,172	372,320
	LGSO2_2 (n = 6)	123,4±6,882 ^{***b}	70,47±1,288 ^{***b,c}	184,070	125,504
	LHep	140,8±4,830 ^{***b}	59,65±1,010 ^{***c}	224,125	90,880
Studiul III	LMV (n = 6)	-	49,2±4,540	-	
	LM (n = 6)	-	31,25±1,902	-	
	LGSO1_2 (n = 6)	-	80,89±2,014 ^{***a}	-	45,784
	LGSO2-2 (n = 6)	-	82,51±2,482 ^{***b}	-	164,032

LMV = lot tratat cu vehicul (ulei)

LM = lot tratat cu ser fiziologic

LGSO1_1 = lot tratat cu GSO1 75 mg/kg. g.c.

LGSO1_2 = lot tratat cu GSO1 150 mg/kg. g.c.

LGSO2_1 = lot tratat cu GSO2 75 mg/kg. g.c.

LGSO2_2 = lot tratat cu GSO2 150 mg/kg. g.c.

LHep = lot tratat cu arginină perfuzabilă

a - vs LMV, b - vs LM, c - vs LGSO2_1

Administrarea CCl₄ determină scăderea proteinelor hepatice care este redresată prin tratamentul cu GSO1 și GSO2 astfel încât în ambele situații se înregistrează o creștere a proteinelor hepatice cu peste 50%.

În urma acestor studii, a rezultat ca GSO1 și GSO2 nu induce activitate hepatotoxică în loturile netratate cu substanța hepatotoxică, iar în loturile intoxicate cu CCl₄ - inductor de disfuncții hepatice - ambele biocomplexe determină protecția și refacerea țesutului hepatic, prin supresia proceselor metabolice dezvoltate de CCl₄ lanțul de evenimente ce urmează după inducerea inflamației fiind întrerupt.

În concluzie, datele studiilor experimentale coroborate arată că primele 2 preparate fitoterapice conform invenției au ca scop obținerea unor produse cu efecte antitumorale și raport eficacitate/toxicitate remarcabil prin exercitarea unei acțiuni concomitente antitumorale, antioxidante și hepatoprotectoare, utilizabile atât în oncologie veterinară cât și pentru uz uman. În particular, GSO1 este un biocomplex activ cu acțiune antitumorală *in vitro* complexă, cu precădere pentru adenocarcinom mamar și carcinom cervical. GSO2 are un efect antitumoral moderat în cancerul de prostată prin inducere de apoptoză și efect antiangiogenic.

Exemplul 2. Produs medicamentos antitumoral - soluție injectabilă conținând 2% produs fitoterapic din *Hedera helix*

Formula de condiționare:

- preparat fitoterapic -GSO-1 22 g
- alcool benzilic 100 ml
- soluție apoasă tampon fosfat pH=8 100 ml
- propilenglicol ad. 1000 ml

RO 125279 B1

1 Modul de preparare: produsul fitoterapic se dizolvă la cald (60...70°C) în 200 ml
2 amestec 1:1 v/v alcool benzilic: propilenglicol, se adaugă sub agitare restul de propilenglicol
3 și soluția apoasă de tampon fosfat cu pH=8, iar soluția omogenă rezultată se filtrează aseptice
4 și se condiționează în fiole de 1...2 ml care conțin 20 mg/ml produs fitoterapic din *Hedera*
5 *helix*.

6 Produsul se administrează parenteral, în doze de 1...3 fiole/zi, timp de 1...6 luni, în
7 tratamentul de uz uman și veterinar al unor tumori benigne și maligne, cu precădere în
8 terapia neoplaziei mamare, precum și ca imunoprotector pentru contracararea efectelor
9 adverse, imunosupresoare ale chimioterapiei cu medicamente citostatice de sinteză.

10 **Exemplul 3.** *Produs medicamentos antitumoral - Soluție buvabilă conținând 2%*
11 *produs fitoterapic din Hedera helix*

Formula de condiționare:

13	- produs fitoterapic	22 g
	- glicerină	200 ml
15	- propilenglicol	200 ml
	- alcool etilic 95°	200 ml
17	- sorbitol	40 g
	- p-hidroxibenzoat de metil	1 g
19	- p-hidroxibenzoat de propil	2 g
	- soluție apoasă tampon fosfat pH=8	ad. 1000 ml

21 Modul de preparare: produsul fitoterapic se dizolvă la cald (60...70°C) în 400 ml
22 amestec 1:1 v/v alcool etilic: propilenglicol, după care se adaugă cantitatea prevăzută de
23 glicerină și soluția apoasă de tampon fosfat cu pH=8, în care s-au dizolvat cei doi
24 conservanți prevăzuți în formulă și sorbitolul.

25 Se agită pentru omogenizare și se filtrează, iar soluția limpede rezultată se
26 condiționează în flacoane de 100...200 ml.

27 Produsul conține 20 mg/ml produs fitoterapic din *Hedera helix* care se administrează
28 oral, în doze de 5... 10 ml/zi, timp de 1...6 luni, în tratamentul de uz uman și veterinar al unor
29 tumori benigne și maligne, în special în terapia neoplaziei mamare, precum și ca
30 imunoprotector pentru contracararea efectelor adverse, imunosupresoare și hepatotoxice ale
31 chimioterapiei cu medicamente citostatice de sinteză.

32 **Exemplul 4.** *Produs medicamentos antitumoral - Capsule tari conținând 100*
33 *mg/capsulă produs fitoterapic din Hedera helix*

Formula de condiționare/capsulă:

35	- produs fitoterapic - minimum 90%	110 mg
	- lactoză monohidrat	150 mg
37	- glicolat sodic de amidon	9,00 mg
	- polivinilpirolidonă K30	6,50 mg
39	- lauril sulfat de sodiu	2,00 mg
	- aerosill	1,47 mg
41	- talc	7,25 mg
	- stearat de magneziu	2,90 mg

43 Modul de preparare: produsul fitoterapic se sitează pe o sită numărul II cu excipienții:
44 lactoză monohidrat și aerosil; peste amestecul obținut se adaugă o soluție realizată prin
45 dizolvarea polivinilpirolidonei K30 în alcool etilic, se omogenizează, rezultând granule, care
46 se usucă la temperatura de 35...45°C și se sitează prin sita numărul V; se adaugă glicolatul
47 sodic de amidon, laurilsulfatul de sodiu, talcul și stearatul de magneziu, se omogenizează,
iar pulberea astfel obținută se încapsulează în capsule de mărimea 1.

RO 125279 B1

Produsul conține 100 mg/capsulă produs fitoterapic din *Hedera helix* și se administrează oral, în doze de 2...4 capsule/zi, timp de 1...12 luni, în terapia antitumorală de uz uman sau veterinar, cu precădere în neoplazia mamară, precum și ca imunoprotector pentru contracararea efectelor adverse imunosupresoare ale chimioterapiei cu medicamente citostatice de sinteză.

Exemplul 5. *Produs medicamentos antitumoral - capsule moi conținând 100 mg/capsulă produs fitoterapic din Hedera helix*

Formula de condiționare:

- produs fitoterapic - minimum 90% 22 g 9
- alcool etilic 95° 250 ml
- glicerină 250 ml 11
- ulei de cătină ad. 1000 ml

Modul de preparare: produsul fitoterapic se dizolvă la cald (60...70°C) în 500 ml amestec 1:1 v/v alcool etilic 95°: glicerină, rezultând o soluție omogenă, care se aduce în balonul de distilare al unui rotavapor și se efectuează distilarea la temperatura de 30...35°C, sub vid, până la îndepărtarea totală a alcoolului etilic, după care se adaugă cantitatea prevăzută de ulei de cătină și se omogenizează prin agitare. Se obține o soluție semicoloidală care conține 20 mg/ml produs fitoterapic și care se condiționează în capsule gelatinoase moi, a câte 5 ml produs, care se administrează oral, în doze de 2...4 capsule/zi, timp de 1...12 luni, în terapia antitumorală de uz uman și veterinar, cu precădere în tumorile mamare, precum și ca imunoprotector pentru contracararea efectelor adverse imunosupresoare ale chimioterapiei cu medicamente citostatice de sinteză.

Exemplul 6. *Produs medicamentos antitumoral - gel conținând 1% produs fitoterapic din Hedera helix*

Formula de condiționare/capsulă:

- produs fitoterapic - minimum 90% 11 g 25
- carbopol 940 20 g 27
- glicerină 50 g
- alcool etilic 50 g 29
- trietanolamină 15 g
- propilenglicol 60 g 31
- p-hidroxibenzoat de metil 1 g
- p-hidroxibenzoat de propil 2 g 33
- apă purificată ad. 1000 g

Modul de preparare: se prepară masa de gel prin dispersarea a 20 g Carbopol 940 în amestecul format din glicerină, alcool etilic și apă purificată, în care se dizolvă, în prealabil amestecul de conservanți prevăzut în formulă. Se agită ușor, apoi se lasă în repaus 24 h la temperatura de 20...25°C, după care se adaugă sub agitare lentă amestecul constituit din pulberea de produs fitoterapic, propilenglicol și soluția de trietanolamină, reglându-se la pH=7,0 și continuându-se agitarea pentru perfectarea omogenizării, urmat de ambalare.

Produsul conține 1% produs fitoterapic din *Hedera helix* și se administrează topic, în doze de 3...5 g/zi, timp de 1...6 luni, în terapia antitumorală locală a neoplaziei mamare sau a altor tumori benigne și maligne, localizate extern, pentru uz uman și veterinar.

Exemplul 7. *Produs medicamentos antitumoral - cremă conținând 1% produs fitoterapic din Hedera helix*

Formula de condiționare:

- produs fitoterapic - minimum 90% 11 g 47
- alcool cetilic 160 g

RO 125279 B1

1	- vaselină	200 g
	- glicerină	107 g
3	- Tween 80	70 g
	- p-hidroxibenzoat de metil	1 g
5	- p-hidroxibenzoat de propil	2 g
	- apă purificată	ad. 1000 g

7 Modul de preparare: produsul fitoterapic se dizolvă la cald (60...70°C) în cantitatea
prevăzută de glicerină, iar soluția rezultată se încorporează în masa de unguent, obținută
9 prin topirea la 60°C a alcoolului cetilic și a vaselinei, urmat de emulsionare, prin adăugarea
cantităților prevăzute de Tween 80 și apă purificată, în care s-au dizolvat în prealabil cei 2
11 conservanți, omogenizare și condiționare.

Produsul conține 1% produs fitoterapic din *Hedera helix* și se administrează topic, în
13 doze de 3...5 g/zi, timp de 1...6 luni, în terapia antitumorală locală a neoplaziei mamare sau
a altor tumori benigne și maligne, localizate extern, pentru uz uman și veterinar.

15 **Exemplul 8.** *Produs medicamentos antitumoral - unguent conținând 1% produs
fitoterapic din Hedera helix*

17 Formula de condiționare:

	- produs fitoterapic - minimum 90%	11 g
19	- propilenglicol	100 g
	- polietilenglicol 4000	300 g
21	- polietilenglicol 400	ad.1000 g

23 Modul de preparare: produsul fitoterapic se dizolvă la cald (60...70°C) în cantitatea
prevăzută de propilenglicol, iar soluția obținută se încorporează după răcire în masa de
unguent rezultată prin topirea la 65...70°C a amestecului de polietilenglicoli 4000 și 400,
25 urmat de omogenizare prin agitare și condiționare.

27 Produsul conține 1% produs fitoterapic din *Hedera helix* și se administrează topic, în
doze de 3...5 g/zi, timp de 1...6 luni, în terapia antitumorală locală a neoplaziei mamare sau
a altor tumori benigne și maligne, localizate extern, pentru uz uman și veterinar.

29 **Exemplul 9.** *Produs medicamentos antitumoral - soluție uz extern conținând 1% pro-
dus fitoterapic din Hedera helix*

31 Formula de condiționare:

	- produs fitoterapic - minimum 90%	11 g
33	- alcool etilic 95°	100 ml
	- ulei de ricin rafinat	ad. 1000 g

35 Modul de preparare: produsul fitoterapic se dizolvă la cald (60...70°C) în 200 ml
amestec 1:1 v/v alcool etilic 95°: ulei de ricin, rezultând o soluție omogenă, în care se adaugă
37 restul de ulei de ricin, se omogenizează prin agitare, se filtrează și se condiționează.

39 Produsul conține 10 mg/ml produs fitoterapic din *Hedera helix* și se administrează
topic, în doze de 3...5 g/zi, timp de 1...6 luni, în terapia antitumorală locală a neoplaziei
mamare sau a altor tumori benigne și maligne, localizate extern, pentru uz uman și veterinar.

41 **Exemplul 10.** *Produs medicamentos antitumoral - supozitoare conținând 1% produs
fitoterapic din Hedera helix*

43 Formula de condiționare:

	- produs fitoterapic - minimum 90%	11 g
45	- polietilenglicol 400	100 g
	- parahidroxibenzoat de metil	300 g
47	- parahidroxibenzoat de propil	2 g
	- Suppocire (trigliceride de semisinteză)	ad. 1000 g

RO 125279 B1

Modul de preparare: produsul fitoterapeutic se dizolvă la cald (60...70°C) în cantitatea prevăzută de polietilenglicol 400, iar soluția rezultată se încorporează în masa de Suppocire, încălzită în prealabil la 40°C. 1
3

Se adaugă amestecul de conservanți, se omogenizează și se condiționează sub formă de supozitoare a 2,5 g. 5

Produsul conține 25 mg/supozitor produs fitoterapeutic din *Hedera helix* și se administrează rectal, în doze de 2...4 supozitoare/zi, timp de 1...6 luni, în tratamentul de uz uman și veterinar al unor tumori benigne și maligne, cu precădere în terapia neoplaziei mamare, precum și ca imunosupresoare ale chimioterapiei cu medicamente citostatice de sinteză. 7
9

BIBLIOGRAFIE 11

1. Salomi N. J. Cancer Letters 1992, 63 (1); 41 -6 13
2. JieLiu Journal of Ethnopharmacology, 1995, 49, 57-68
3. Nishino H. Cancer Research, 1988, 48, 5210-5215 15
4. Huang M. Cancer Research, 1994, 54, 701-708
5. Kuttan K. Intern. Journal of Phytotherapy/Phytopharm. 7/1/2003 17
6. B.Demiro Pharmazie 59(2004); 10;770-774
7. ROTE LISTE/2002 Frankfurt/Main, 24.059-24.068 19
8. Brevet de invenție CN 1439374/2003.09.03
9. Brevet de invenție JP 2004256504/2004.09.16 21
10. Brevet de invenție JP 2004256412/2004.09.16
11. Brevet de invenție JP 2003261802/2003.09.19 23
12. Brevet de invenție JP 200268959/2002.03.08
13. Brevet de invenție JP 2001136941/2001.05.22 25
14. Brevet de invenție USA 20020114767/22.08.2002
15. Code of Federal Regulation Title 21, Vol. 1, 2006 27
16. Pratt M. M. Carcinogenesis 2007, Mar.28 (3):611-24
17. Sharma D.; Mol. Immunol. 2007, Jan. 44(4):347:59 29
18. Breinholt V.; Chem. Res.Toxicol. 1995.Jun; 8(4):506-14
19. Kapiotis S; Hermann M.; Free Radic. Res. 2005.Nov; 39 (11):193-202 31
20. Tajmir Riahi H.A.; Methods Mol. Biol. 2004; 274; 159-71
21. Hartig U.; Carcinogenesis 1998 Jul. 19(7); 1323-6 33
22. Amara Mokrane; Balansard G Mutagenesis 1996.Mar.II (2); 161-7
23. Botelho MV.; Lett. Appl. Microbiol. 2004; 39(2): 174-7 35
24. Kumar SS.; Mutat. Res 1999. Mar. 10; 425(I); 71-9
25. Brevet de invenție Franța 1.531.621/24.05.1967 37
26. Brevet de invenție GB 1106133/1968.03.13
27. Brevet de invenție CN 200710034341/29.01.2007 39
28. Brevet de invenție GB 2051575/08.01.1980
29. Cerere de Brevet de invenție US 20060057236/16.03.2006/A1 41
30. Cerere de Brevet de invenție US 20060210660/21.09.2006/A1
31. Brevet de invenție CN 1245693/01.03.2000 43
32. Brevet de invenție RU 2127605/20.03.1999
33. Brevet de invenție WO 9916414/04.08.1999 45
34. Brevet de invenție ES 2166342/04.01.2002
35. Brevet de invenție FR 2886546/12.08.2006 47

RO 125279 B1

- 1 36. Brevet de invenție US 2007031516/02.08.2007
37. Brevet de invenție JP 6145036/05.24.1994
- 3 38. Brevet de invenție JP 7017847/01.20.1995
39. Brevet de invenție JP 2004-018471/22.01.2004
- 5 40. Brevet de invenție RO 121004/11.30.2006
41. Brevet de invenție RO 121583/28.12.2007
- 7 42. S. Buttiglieri, A. Galetto, S. Forno, Int. J. Cancer: 106, 516-520 (2003)
- 9 43. Ribatti D, Gualandris A, Bastaki M, Vacca A, Iurlaro M, Roncali L, et al. J. Vasc. Res. 1997; 34:455-463.) A new model for the study of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): the gelatin sponge/CAM assay.

1. Procedeu de preparare a unor complecși bioactivi din *herba Hedera helix*, utilizați în terapia antitumorală, **caracterizat prin aceea că**, într-o primă etapă, *herba Hedera helix* uscată este supusă extracției prin percolare dinamică cu alcool etilic de concentrație 80% într-un raport 1:15 la temperatură ambiantă timp de 12 h, urmată de concentrarea soluției extractive alcoolice, extractul concentrat se supune apoi extracției lichid-lichid cu acetat de etil în raport 1:3, din care rezultă un extract apos și o fază de acetat de etil, care în continuare se separă, se filtrează și se concentrează sub vid până la un raport 1:30, se suspendă sub agitare în acetonă, din care rezultă un prim complex bioactiv brut, care se supune purificării prin dizolvare în alcool etilic 95%, decolorare cu cărbune activ și concentrare, care conduc la un filtrat acetonic și un cristalizat care este purificat, rezultând un prim complex bioactiv purificat, după care, într-o a doua etapă, extractul apos amintit se supune unei separări lichid-lichid, din care rezultă o fază apoasă și o fază n-butanolică care, în continuare, se supune concentrării sub vid, rezultând un al doilea complex bioactiv brut, care se suspendă în acetonă, iar precipitatul se separă prin filtrare și se purifică prin dizolvare prin alcool etilic 70%, decolorare cu cărbune și concentrare, rezultând un al doilea complex bioactiv purificat, în continuare, într-o a 3-a etapă, filtratul acetonic se concentrează sub vid și se reunește cu faza apoasă din extracția lichid-lichid din etapa anterioară, se concentrează și se condiționează în propilenglicol, din care rezultă un al treilea complex bioactiv, și în final, filtratul acetonic de purificare din etapa 1 se concentrează și se suspendă în soluția alcoolică la pH 8,5...12,5, se separă prin filtrare și se suspendă în soluție de sulfat de cupru de concentrație 10% în mediul acid, urmată de solubilizarea Cu-clorofilei într-o soluție apoasă de hidroxid de sodiu la pH 8,5...12,5, rezultând un extract apos de Cu Na-clorofilă. 3
2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** complexul bioactiv purificat din etapa 1 este o pulbere albă cristalină, având un conținut de minimum 95% saponine triterpenice monodesmozidice totale cu aglicon hederagenină, din care 70...80% α -Hederină. 5
3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** complexul bioactiv purificat din etapa 2 este o pulbere alb-gălbuie, având un conținut de minimum 90% saponine triterpenice bisdesmozidice totale cu aglicon hederagenină, din care 50...75% Hederacozida C. 7
4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** complexul bioactiv din etapa 3 este sub formă de extract lichid brun-roșcat, având 1...3 g/100 ml conținut de saponine bisdesmozidice cu aglicon acid oleanolic și 1,5...5 g/100 ml acizi polifenolcarboxilici 9
5. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extractul apos de CuNa-clorofilă are 0,2...1 g/100 ml conținut în saponine monodesmozidice cu aglicon acid oleanolic și 0,1...0,5 g/100 ml extract clorofilă totală. 11
6. Produs medicamentos, constituit din 1...2% dintr-un complex bioactiv preparat prin procedeul definit într-una dintre revendicările 2...4, condiționat sub formă de soluție injectabilă sau buvabilă, gel, cremă sau supozitoare, pentru utilizarea în terapia antitumorală. 13
7. Produs medicamentos, constituit din 100 mg dintr-un complex bioactiv preparat prin procedeul definit într-una dintre revendicările 2...4, condiționat sub formă de capsule, pentru utilizarea în terapia antitumorală. 15

