



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00858

(22) Data de depozit: 01.09.2011

(41) Data publicării cererii:
28.09.2012 BOPI nr. 9/2012

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLATARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE BUCUREȘTI-
CENTRUL DE CERCETĂRI BIOLOGICE,
"STEJARUL" PIATRA NEAMȚ,
STR. ALEXANDRU CEL BUN NR. 6,
PIATRA NEAMȚ, NT, RO

(72) Inventatori:
• GILLE ELVIRA, STR. PLEVNEI NR. 4,
BL. F10, SC. C, AP. 51, PIATRA NEAMȚ,
NT, RO;
• HÂNCIANU MONICA,
STR. PROF. EMIL HONORIU NR. 16D, IAȘI,
IS, RO;
• STĂNESCU URSULA HELENA,
STR. NICOLAE GANEA NR. 32A, BL. C2,
AP. 1, IAȘI, IS, RO;

• MIHĂILESCU ROXANA LAURA,
STR. GEORGE COȘBUC NR. 8, BL. A7,
SC. B, ET.2, AP. 29, PIATRA NEAMȚ, NT,
RO;
• DĂNILĂ DOINA, STR. SOMEȘ NR. 22,
PIATRA NEAMȚ, NT, RO;
• MIRON ANCA, ALEEA DOMENII NR. 23,
IAȘI, IS, RO;
• APROTOSOAIIE ANA CLARA,
ȘOS. NAȚIONALĂ NR. 76, BL. C4, SC. A,
ET. 3, AP. 3, IAȘI, IS, RO;
• CIOANCĂ OANA,
STR. PROF. EMIL HONORIU NR. 16D, IAȘI,
IS, RO;
• NECULA RADU, BD. TRAIAN NR. 2,
BL. S1, SC. E, AP. 151, PIATRA NEAMȚ,
NT, RO;
• GHÎȚĂ GEORGIANA LUMINIȚA,
STR. PICTOR NICOLAE GRIGORESCU
NR. 3, BL. E6, SC. B, AP. 29,
PIATRA NEAMȚ, NT, RO

(54) PROCEDU DE OBȚINERE A UNEI FRAȚIUNI
MACROMOLECULARE DIN *TELEKIA SPECIOSA* (SCHREB.)
BAUMG. CU ACȚIUNE IMUNOSTIMULATORIE

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un produs fitoterapeutic macromolecular, extras din *Telekia speciosa*, cu acțiune imunostimulatoare, care se prezintă sub forma unui produs liofilizat de culoare alb-crem sidefie, cu gust mucilaginos, conținând, drept componentă majoritară, un compus de natură glucidică, având greutate moleculară de 130000 D, constituit în principal din acid galacturonic, acid glucuronic, glucoză, galactoză și ramnoză. Procedul de realizare a produsului fitoterapeutic constă în obținerea unui decoct în apă a părții aeriene înflorite a *Telekia speciosa*, uscată și mărunțită,

urmată de macerare timp de 24 h la un raport drog uscat:extract de 1:10 g/ml, după care amestecul extractiv s-a agitat, s-a filtrat, peste filtrat s-a adăugat un volum dublu de solvent metanol:acetona 1:1; după repaus, supernatantul s-a îndepărtat, iar precipitatul filtrat s-a esorat și uscat la 40°C. Frația macromoleculară brută obținută a fost redizolvată în apă și s-a liofilizat, rezultând produsul fitoterapeutic macromolecular purificat.

Revendicări: 2

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



PROCEDEU DE OBTINERE A UNEI FRAȚIUNI MACROMOLECULARE DIN *TELEKIA SPECIOSA* (SCHREB.) BAUMG. CU ACȚIUNE IMUNOSTIMULATOARE

Autori: Gille Elvira, Hănceanu Monica, Stănescu Ursula Helena, Mihăilescu Roxana Laura,
Dănilă Doina, Miron Anca, Aprotosoia Ana-Clara, Cioancă Oana, Necula Radu, Ghiță
Georgiana Luminița

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la un procedeu de separare din *Telekia speciosa* a unei fracțiuni macromoleculare constituită în principal din poliholozide cu greutate moleculară cuprinsă între 130.000-2.000.000 D.

Această fracțiune este alcătuită din două componente macromoleculare de natură glucidică, pentru care monomerii sunt acizii glucuronic și galacturonic, glucoza, galactoza, ramnoza alături de două oze neidentificate. Fiecare din cele două fracțiuni poliholozidice conține, în stare brută, o cantitate de macromolecule proteice solubile sau insolubile.

Este cunoscut că *Telekia speciosa* este o specie frecvent întâlnită în regiunile muntoase ale Europei, deci și în România, dar ea a fost foarte puțin studiată până în prezent.

În literatura de specialitate sunt menționate două sesquiterpene caracteristice, telekina și izotelekina [1,2,3,4]. Alături de acestea sunt prezente alantolactona și izoalantolactona antimicrobiene [5], întâlnite și la *Inula helenium* și alte asteracee [6]. De asemenea, din frunzele acestei specii a fost extrasă o cantitate de 2,45% lipide totale, în care se găsesc 3,72 mg% tocoferoli [7].

Este cunoscut că în medicina tradițională din țara noastră, specia a fost utilizată în Țara Oltului, unde ocupă și astăzi un loc important între plantele medicinale. Era culeasă de către femei cu ocazia pelerinajului la mănăstirea Sambata de Sus, în credința că era bună "la toate bolile" în unele locuri purtând denumirea populară de "buruiana de la mănăstire" [8].

Este cunoscut că în stare proaspătă, planta se folosea pentru tratarea tăieturilor, a umflăturilor, a ranilor de orice fel, iar în stare uscată se utiliza sub formă de băni în tratamentul reumatismului, a dermatozelor, iar intern pentru combaterea unor afecțiuni hepatice sau urinare. Utilizarea preparatelor de *Telekia* (brustan) în aceste din urmă afecțiuni indică faptul că principiile active care trec în extractul apos (infuzie) sau alcoolic (tinctură) intervin în metabolismul dereglat, la nivelul unui anumit organ, reechilibrându-l.

Procedeul de obținere a fracțiunii polizaharidice constă, în invenția noastră, din extracția acesteia din partea aeriană înflorită și, separat, din rădăcinile de *Telekia*, prin fierberea materialului vegetal timp de șase minute cu apă în raport drog:solvent de 1:10 (m/v). După separarea extractului, fracțiunea poliholozidică brută a fost precipitată un amestec metanol-acetonă, urmata de filtrare. Fracțiunile brute au fost purificate prin redizolvarea precipitatului în apă, centrifugare și liofilizarea supernatantului, când s-au obținut poliholozidele purificate.

Randamentul de obtinere al poliholozidei purificate din frunzele de *Telekia* (PTfol) a fost de 1,8951 g/100g drog.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje:

-Se diversifica gama de produse cu ortomoleculara actiune imunomodulatoare necesare in terapia unor afectiuni metabolice si de status imunitar;

-produsul este lipsit de toxicitate (toxicitatea acuta a fost determinata pe soareci albi, de ambele sexe, carora li s-a administrat, cu ajutorul sondei gastrice cantitati crescande, de la 200mg la 3.200 de mg/kg greutate corporala, polizaharida purificata PTfol), neputand fi evidentiata reactii nedorite nici la doza maxima;

-se utilizeaza o materie prima vegetala accesibila, indigena, planta putand fi introdusa si in cultura;

-tehnologia are un numar redus de faze si este nepoluanta.

Exemplu de realizare a inventiei

Se da, in continuare, un exemplu de realizare a inventiei: materialul vegetal utilizat, constand din partile aeriene in florite de *Telekia speciosa*, uscate si macinate (sita IV) a fost supus unei decoctii (fierbere 5-7 minute), in mediu apos si apoi unei macerari prelungite (24 ore); raportul drog-extract (DER) a fost de 1:10 (g/mL).

Dupa acest interval, amestecul extractiv a fost agitat, iar extractul apos a fost filtrat. In filtrat s-a adaugat un volum dublu de amestec metanol:acetona (1:1), iar dupa un repaus de aproximativ 5 ore, supernatantul s-a indepartat prin decantare, iar precipitatul, dupa filtrare, s-a esorat si uscat la etuva la 40°C. S-a obtinut, in acest fel, fractiunea macromoleculara bruta, codificata BTfol.

In continuare, fractiunea macromoleculara bruta a fost supusa unui proces de purificare, deoarece, in timpul precipitarii cu amestecul de solventi polari, sunt antrenate, alaturi de poliholozide, atat proteine, cat si compusi cu masa moleculara mica (polifenoli).

Fractiunea BTfol a fost purificata prin redizolvare in apa distilata (1:100), sub agitare continua, centrifugata timp de 10 minute, la 3.000 de rotatii/minut, supernatantul fiind apoi liofilizat.

S-a obtinut, in acest fel, fractiunea poliholozidica purificata PTfol.

Din 100g BTfol se obtin 32,200g PTfol.

Fractiunea purificata contine, in continuare, o anumita cantitate de substante proteice, azotul total determinat pentru PTfol fiind intre 6,00-6,23%.

Analiza fractiunii macromoleculare (efectuata prin cromatografie pe coloana de schimbator anionic) a pus in evidenta faptul ca PTfol contine patru polizaharide, dintre care una neutra, levogira si trei acide, dintre care una dextrogira si doua levogire. Poliholozida

dextrogira este majoritara, si are o greutate moleculara aptoximativa de 130.000 D (determinare efectuata prin HP-GPC, cromatografie de gel permiatie la inalta presiune).

Hidroliza acida a fractiunii majoritare a furnizat, la analiza gazcromatografica, urmatorii monomer:acid galacturonic, acid glucuronic, glucoza, galactoza si ramnoza, alaturi de o componenta glucidica neidentificata pentru PTfol [9].

Pentru evaluarea actiunii imunostimulatoare a fractiunii macromoleculare PTfol s-a realizat un screening utilizand un test original de stimulare inflamatiei labei de sobolan cu carrageenan, care permite aprecierea capacitatii de stimulare a fagocitozei indusa de fractiunea testata. Ca martor pozitiv s-a utilizat levamisolul. A fost cercetata puterea opsonica a serului, capacitatea fagocitara si bactericida a macrofagelor peritoneale, si influenta asupra complementului seric.

Testul farmacologic de screening a unei posibile actiuni imunostimulatoare pentru fractiunea PTfol (116,7%), a demonstrat o activitate superioara celei a martorului pozitiv, levamisol (75%). Deasemenea, se poate aprecia ca tratamentul cu PTfol stimuleaza capacitatea fagocitara a leucocitelor polimorfonucleare, determina o activitate anticomplementara importanta si creste activitatea de rozetare a limfocitelor T splenice, comparativ cu martorul pozitiv levamisol.

BIBLIOGRAFIE

- [1] Bohlmann F., Mahanta P. K. (1979) *Zwei neue pseudoguajanolide aus Telekia speciosa*, *Phytochemistry* 18, 887-888.
- [2] Bohlmann F., Jakupovic J., Schuster A. (1981) *Further eudesmanolides and xanthanolides from Telekia speciosa*, *Phytochemistry* 20, 1891-1893.
- [3] Jodynis-Liebert J., Murias M., Błoszyk E. (1999) *Effect of several sesquiterpene lactones on lipid peroxidation and glutathione level*, *Planta Med.* 65, 320-324.
- [4] Jodynis-Liebert J., Murias M., Błoszyk E. (2000) *Effect of sesquiterpene lactones on antioxidant enzymes and some drug- metabolizing enzymes in rat liver and kidney*, *Planta Med.* 66, 199-205.
- [5] Picman A. K., Schneider E. F. (1993) *Inhibition of fungal growth by selected sesquiterpene lactones*, *Biochemical Systematics and Ecology* 21, 307-314.
- [6] Cantrell C. L., Abate L., Fronczek F. R., Franzblau S. G., Quijano L., Fischer N. H. (1999) *Antimycobacterial eudesmanolides from Inula helenium and Rudbeckia subtomentosa*, *Planta Medica* 65, 351-355.
- [7] Rustanbekov R. B., Gadzhieva T. G., Mamedov S. S. (1988) *Components of Telekia speciosa*, *Chem Nat Compd* 24, 658-658.
- [8] Butura V. (1979) *Enciclopedie de etnobotanica romaneasca*, Ed. Stiintifica si Enciclopedica, Bucuresti, 48.
- [9] Hancianu M. (2000) *Cercetarea unor componente macromoleculare separate din specii de plante indigene, cu actiune imunostimulatoare si antistres-adaptogene*, teza de doctorat, Universitatea de Medicina si Farmacie "Gr. T. Popa", Iasi.

**PROCEDEU DE OBTINERE A UNEI FRAȚIUNI MACROMOLECULARE DIN
TELEKIA SPECIOSA (SCHREB.) BAUMG. CU ACȚIUNE IMUNOSTIMULATOARE**

Autori: Gille Elvira, Hănceanu Monica, Stănescu Ursula Helena, Mihăilescu Roxana Laura,
Dănilă Doina, Miron Anca, Aprotosoia Ana-Clara, Cioancă Oana, Necula Radu, Ghiță
Georgiana Luminița

REVENDICĂRI

1. Produs fitoterapeutic cu utilizare în terapia deficitului de imunitate asociat infecțiilor microbiene din sfera respiratorie sau urinară, virale la nivel hepatic sau de altă natură, caracterizat prin aceea că se prezintă sub formă de pulbere fină, de culoare alb-crem, sifidie, cu gust mucilaginos, conținând o componentă majoritară de natură glucidică cu greutate moleculară de 130.000 D, constituită, în principal, din acid galactronic, acid glucuronic, glucoză, galactoză și ramnoză.

2. Procedeu de obținere a produsului fitoterapeutic definit în revendicarea 1, caracterizat prin extracția cu apă (DER=1:10g/mL) a părții aeriene înflorite de *Telekia speciosa*, urmată de macerare timp de 24 de ore, separarea fazei lichide și precipitarea fracțiunii poliholozidice din aceasta, prin tratarea cu amestec metanol-acetonă (v/v). Polizaharida brută se purifică, după uscare, prin redizolvare în apă, centrifugare și liofilizarea supernatantului.