



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01260**

(22) Data de depozit: **29/11/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/01/2017** BOPI nr. 1/2017

(41) Data publicării cererii:
30/07/2013 BOPI nr. 7/2013

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **PĂUN GABRIELA, STR. POSTĂVARUL
NR.17, BL. 0-28, SC. 3, AP. 35, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RADU GABRIEL-LUCIAN,
ALEEA ROTUNDĂ NR.4, BL.H 6, SC.D,
AP.61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **NEAGU ELENA, STR. PORȚILE DE FIER
NR. 40A, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MOROEANU VERONICA,
STR. PLT. PETRE IONESCU NR. 51, BL. 7,
SC. 5, AP. 285, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **ROTINBERG PINCU, STR.ION CREANGĂ
NR.73, BL.J 3, SC.B, ET.2, AP.9, IAȘI, IS,
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**G. PĂUN ROMAN, E. NEAGU, G. LUCIAN
RADU, "MEMBRANE PROCESSES FOR
THE PURIFICATION AND
CONCENTRATION OF HELLEBORUS
PURPURASCENS EXTRACTS AND
EVALUATION OF ANTIOXIDANT
ACTIVITY", REV. CHIM., 61, NR. 9, 2010;**
**E. NEAGU, G. PĂUN ROMAN, G. L. RADU,
GHE. NECHIFOR, CONCENTRATION OF
THE BIOACTIVE PRINCIPLES IN
GERANIUM ROBERTIANUM EXTRACTS
THROUGH MEMBRANE PROCEDURES
(ULTRAFILTRATION), ROMANIAN
BIOTECHNOLOGICAL LETTERS, VOL. 15,
NR. 1, 2010; G. PĂUN, E. NEAGU,
A. TACHE, G. L. RADU ȘI V.PĂRVULESCU,
"APPLICATION OF THE
NANOFILTRATION PROCESS FOR
CONCENTRATION OF POLYPHENOLIC
COMPUNDS FROM GERANIUM
ROBERTIANUM AND SALVIA
OFFICINALIS EXTRACTS",
CHEM. BIOCHEM. ENG. Q. 25(4),
PP. 453-460, 2011**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI EXTRACT PURIFICAT ȘI
CONCENTRAT DIN GERANIUM ROBERTIANUM ȘI
HELLEBORUS PURPURASCENS CU EFECT CITOSTATIC,
UTILIZÂND TEHNOLOGII MEMBRANARE**



RO 128610 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei combinații de extracte purificate
și concentrate din *Geranium robertianum* și *Helleborus purpurascens*, cu acțiune citostatică,
3 ce pot fi utilizate ca materie primă în industria farmaceutică.

5 Cele două specii de plante medicinale sunt cunoscute în fitoterapie ca având pro-
prietăți antioxidante, antiinflamatoare și imunostimulatoare [Sonia Amarai, Lurdes Mira, J.
7 **M. F. Nogueira, Alda Pereira da Silva, M. Helena Florêncio, (2009); “Plant extracts with
anti-inflammatory properties-A new approach for characterization of their bioactive
compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships”,
9 **Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17(5), 1876-1883; Büssing, A., Schweizer, K. (1998),
“Effects of a phytopreparation from Helleborus niger on immunocompetent cells in
11 **vitro”, Journal of Ethnopharmacology 59(3), 139-146], iar cercetări recente au arătat că
extractele de *Geranium sp.* și *Helleborus sp.* au acțiuni antitumorale [Okuda T, Yoshida T,
13 **Hatano T., (1992), “Pharmacologically active tannins isolated from medicinal plants”,
Basic Life Sci., 59, 539-69. Jesse P (2009), Präklinische “Evaluation von Helleborus niger
15 **in Zellkulturversuchen”, Der Merkurstab., 4, 308-314; Rosselli S, Maggio A, Bruno M,
Spadaro V, Formisano C, Irace C, Maffettone C, Mascolo N. (2009); “Furostanol
17 **Saponins and Ecdysones with Cytotoxic Activity from Helleborus bocconeii ssp.
intermedius”, Phytother, Res. 23, 1243-1249; P. Jesse, G. Mottke, J. Eberle, G. Henze,
19 **A. Prokop (2008), “Helleborus niger as new cytostatic compound against lymphoma
and leukemia in childhood”, European Journal of Integrative Medicine, Vol. 1, Suppl. 1,
21 **5-6 (DOI: 10.1016/j.eujim.2008.08.090)]. Comparativ cu metodele clasice de concentrare
a extractelor, prezenta invenție se referă la aplicarea unor tehnologii membranare perfor-
23 **mante, care decurg la temperatura mediului ambiant (microfiltrare și ultrafiltrare), pentru obți-
nerea concentratelor purificate.******************

25 În cadrul procesului de prelucrare a extractelor vegetale, microfiltrarea se realizează
în scopul de a îndepărta suspensiile și impuritățile grosiere cu dimensiuni mai mari decât
27 **diametrul porilor membranei (circa 0,45 μm), precum și pentru sterilizarea extractelor.
Ultrafiltrarea este aplicată în scopul concentrării proteinelor, polizaharidelor, polifenolilor și
29 **a compușilor flavonici cu mase moleculare mai mari de 1000 Da, din extractele de plante
medicinale studiate.****

31 Tehnica ultrafiltrării a mai fost aplicată separat, pentru plantele ce fac obiectul acestei
cereri de brevet fiind evidențiată activitatea antioxidantă a extractelor, nefiind testat efectul
33 **amestecului de extracte [G. Paun-Roman, E. Neagu, G. L. Radu, (2010), “Membrane processes
for the purification and concentration of Helleborus purpurascens extracts and evaluation
35 **of antioxidant activity”, Rev. Chim., 61, nr. 9, [http:// www.revistadechimie.ro.](http://www.revistadechimie.ro), E. Neagu,
G. Paun-Roman, G. L. Radu, Ghe. Nechifor, (2010), “Concentration of the bioactive
37 **principles in Geranium robertianum extracts through membrane procedures
(ultrafiltration)”, vol. 15, nr. 1, Romanian Biotechnological Letters. G. Paun-Roman, E.
39 **Neagu, A. Tache, G. L. Radu , V. Pârvulescu, (2011), “Application of the nanofiltration
process for concentration of polyphenolic compounds from Geranium robertianum
41 **and Salvia officinalis extracts”, Chem. Biochem. Eng. Q., 25(4),453-460].**********

43 Problema tehnică a invenției constă în asigurarea unui tratament citostatic eficient
și cu toxicitate redusă.

45 Soluția la problema tehnică a invenției constă în furnizarea unei combinații de extracte
concentrate prin ultrafiltrare de *H. purpurascens* și *G. robertianum* în raport de 1:1 (raport de
volum), cu acțiune citostatică, utilizată în tratamentul cancerului.

RO 128610 B1

Extractele din plantele singulare și extractul final (combinație din cele două extracte obținute prin procedeul descris) sunt caracterizate din punct de vedere al conținutului în compușii biologic activi cu efect citostatic (polifenoli, flavone, proteine) și al efectului citostatic *in vitro* pe celule tumorale și normale. 1 3

Potențialul antitumoral *in vitro* maxim al citostaticelor standard, înregistrat în condițiile duratei de 72 h a tratamentului, de 42,6% în cazul metotrexatului, de 76,9% în cazul etopozidului și de 97,7% în cazul 5-fluorouracilului, ca etalon al eficienței antitumorale, ne permite să apreciem extractul concentrat mixt, obținut din *Geranium robertianum* și *Helleborus purpurascens* (raport de volum 1:1), care au indus un nivel maxim al efectului inhibitor asupra dezvoltării culturilor celulare HeLa de 89,6% la doza de 15 μg/ml - ca fiind potențial agent antineoplazic, cu posibilă valorificare biomedicală veterinară sau chiar umană, consecutiv trialurilor clinice. 5 7 9 11

Procedeul conform invenției constă în aceea că se supune produsul vegetal (frunze sau rădăcină), mărunțit foarte fin, extracției cu apă bidistilată, într-un raport produs vegetal/solvent de 6:100...10:100, la 25...30°C, urmată de filtrare, pentru separarea soluției extractive. Extractul prefiltrat este supus microfiltrării printr-o membrană cu pori de 0,22...1 μm, iar apoi microfiltratul este concentrat prin ultrafiltrare prin membrane cu cut-off cuprins în intervalul 10000...50000 Da. Extractul final este caracterizat din punct de vedere al conținutului în compușii biologic activi cu efect citostatic (polifenoli, flavone, proteine), și al efectului citostatic al extractelor concentrate pe linii de culturi celulare normale (celule renale de maimuță = RM) și neoplazice umane (Hep-2p și HeLa). 13 15 17 19 21

Procedeul de obținere a extractelor purificate și concentrate la nivel pilot prezintă următoarele faze tehnologice, și se realizează pe o instalație care va avea în componență 1 cartuș de prefiltrare, 1 cartuș de microfiltrare și 1 cartuș de ultrafiltrare: 23

- prefiltrarea se realizează cu ajutorul unui cartuș filtrant cu dimensiunea porilor de 50 μm sau 25 μm (în funcție de gradul de încărcare în suspensii al soluției, și de natura materiei prime vegetale folosite); 25 27

- microfiltrarea se realizează cu ajutorul unui cartuș filtrant, cu dimensiunea porilor de 0,22...1 μm, la presiunea de 1,5...3 bar; 29

- ultrafiltrarea se realizează cu ajutorul unui cartuș cu membrana hollow-fiber cu cut-off de 10000...50000 Da, la presiunea de lucru de 3...5 bar, stabilită astfel încât debitul de permeat să fie de 100...200 l/h. 31

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje: 33

- obținerea unor extracte purificate și concentrate de calitate superioară, cu acțiune citostatică bine definită, corelată cu conținutul în grupe de principii active extrase; 35

- prețul de cost al produsului final (extractul concentrat în compuși bioactivi) este mai mic decât cel obținut prin tehnologia clasică, ca urmare a eliminării etapei de concentrare la temperatură, care este mai costisitoare. 37

Procedeul este conceput astfel încât produsul fiecărei etape este trecut în cea următoare, fără adaos de compuși chimici, iar produsul etapei finale este extractul purificat și concentrat cu efect citostatic din *Geranium robertianum* și *Helleborus purpurascens*, un extract cu eficiență ridicată și efecte secundare minime, care poate fi folosit ca adjuvant în terapia cancerului. 39 41

Se prezintă în continuare 2 exemple de realizare a unui extract purificat și concentrat din *Geranium robertianum* și *Helleborus purpurascens*, cu efect citostatic prin procedeul descris. 43 45

Exemplul 1

Se realizează extracte apoase prin macerare prin amestecul a 3...5 kg din fiecare plantă fin mărunțită, cu ajutorul unei mori de măcinare, cu 50 l apă distilată, la temperatura de 24...30°C, timp de 8...10 h. Soluțiile extractive se decantează, se filtrează grosier și se 47 49

RO 128610 B1

1 introduc în vasul de alimentare al instalației pilot, unde extractele sunt prelucrate prin urmă-
toarea succesiune de operații: prefiltrare (prefiltru cu pori de 20 μm), microfiltrare (microfiltru
3 cu pori de 1 μm) și ultrafiltrare (cartuș cu membrana hollow-fiber cu cut-off de 30000 Da). Extrac-
tul de *Geranium robertianum* purificat și concentrat are următoarele caracteristici:

- 5 - aspect: lichid concentrat de culoare brun închisă;
- polifenoli: 320...360 mg/l (exprimați în acid galic);
- 7 - flavone: 32...37 mg/l (exprimate în quercetin);
- proteine: 3...5 mg/ml.

9 Extractul de *Helleborus purpurascens* purificat și concentrat are următoarele caracteristici:

- aspect: lichid concentrat, de culoare brun închisă;
- 11 - polifenoli: 180...240 mg/l (exprimați în acid galic);
- flavone: 8...14 mg/l (exprimate în quercetin);
- 13 - proteine: 2,5...4 mg/ml.

15 Extractul purificat și concentrat mixt, obținut din cele 2 plante medicinale, în raport
de 1:1 (volume egale din cele 2 extracte concentrate), are următoarele caracteristici:

- aspect: lichid concentrat, de culoare brun închisă;
- 17 - polifenoli: 200...250 mg/l (exprimați în acid galic);
- flavone: 16...25 mg/l (exprimate în quercetin);
- 19 - proteine: 3...4 mg/ml.

21 Extractele concentrate, obținute prin procedeul descris, prezintă un efect citostatic
in vitro semnificativ, materializat prin inhibarea dezvoltării culturilor celulare neoplazice HeLa
și Hep-2p în valori de peste 85%, în timp ce impactul acestor extracte este nesemnificativ
23 din punct de vedere al evaluării citostatice asupra culturilor de celule normale. Acest aspect
demonstrează că ținta preferențială a acestor produse este localizată preponderent la nivelul
25 celulelor tumorale.

Exemplul 2

27 Se realizează extracte hidroalcoolice prin macerarea amestecului a 3...5 kg din
fiecare plantă fin mărunțită, cu ajutorul unei mori de măcinare, cu 50 l alcool etilic 50%, la
29 temperatura de 24...30°C, timp de 7...8 zile. Soluțiile extractive se decantează, se filtrează
grosier și se introduc în vasul de alimentare al instalației pilot, unde extractele sunt prelucrate
31 prin următoarea succesiune de operații: prefiltrare (prefiltru cu pori de 20 μm), microfiltrare
(microfiltru cu pori de 1 μm) și ultrafiltrare (cartuș cu membrana hollow-fiber cu cut-off de
33 30000 Da). Extractul de *Geranium robertianum* purificat și concentrat are următoarele
caracteristici:

- 35 - aspect: lichid concentrat de culoare brun închisă;
- polifenoli: 600...650 mg/l (exprimați în acid galic);
- 37 - flavone: 80...90 mg/l (exprimate în quercetin);
- proteine: 2...3 mg/ml.

39 Extractul de *Helleborus purpurascens* purificat și concentrat are următoarele caracteristici:

- aspect: lichid concentrat de culoare brun închisă;
- 41 - polifenoli: 400...550 mg/l (exprimați în acid galic);
- flavone: 52...60 mg/l (exprimate în quercetin);
- 43 - proteine: 1,6...2,7 mg/ml.

45 Extractul purificat și concentrat mixt obținut din cele 2 plante medicinale în raport de
1:1 (volume egale din cele 2 extracte concentrate) are următoarele caracteristici:

- aspect: lichid concentrat de culoare brun închisă;
- 47 - polifenoli: 500...600 mg/l (exprimați în acid galic);
- flavone: 70...80 mg/l (exprimate în quercetin);
- 49 - proteine: 2...2,5 mg/ml.

RO 128610 B1

Extracțele concentrate obținute prin procedeul descris prezintă un efect citostatic *in vitro* semnificativ, materializat prin inhibarea dezvoltării culturilor celulare neoplazice HeLa și Hep-2p în valoare de peste 86%, în timp ce impactul acestor extracțe este nesemnificativ din punct de vedere al evaluării citostatice asupra culturilor de celule normale.

Extracțele concentrate, obținute prin procedeul descris în exemplul 1, au fost analizate atât din punct de vedere al compoziției chimice (prin metode spectrofotometrice și HPLC), cât și din punct de vedere al efectului farmacodinamic antitumoral *in vitro*.

Prescreeningul *in vitro*, pe culturi de celule neoplazice HeLa și Hep-2p, a demonstrat reproductibilitatea efectului farmacodinamic antitumoral, confirmând proprietatea citostatică atât a extractului apos purificat și concentrat mixt, obținut din *Geranium robertianum* și *Helleborus purpurascens* în raport de 1:1, cât și a extractelor apoase purificate și concentrate singulare, aceasta fiind exprimată de intensitatea crescută a impactului inhibitor asupra proteinosintezei celulare (fig. 1), proliferării celulare și asupra dezvoltării culturilor de celule tumorale, prezentate în fig. 1, 2 și 3 atașate.

Tratamentul asociat cu amestecul 1:1, tot în doza de 15 μg/ml, se caracterizează printr-o eficiență maximă de perturbare a biosintezei proteice celulare, superioară potențialelor citostatice ale tratamentelor singulare corespunzătoare.

Pentru același interval (72 h), potențialul inhibitor al dezvoltării culturilor este, pentru extractul apos concentrat de *Geranium robertianum*, de 72,3% al celulelor HeLa, respectiv, 70,1% al celulelor Hep-2p, pentru extractul apos concentrat de *Helleborus purpurascens* este de 83,2% al celulelor HeLa, respectiv, 77,6% al celulelor Hep-2p, și, respectiv, pentru extractul purificat și concentrat mixt, obținut din cele 2 plante în raport de 1:1, s-au obținut inhibiții de 89,6% ale dezvoltării celulelor tumorale HeLa, respectiv, 86,8% ale celulelor Hep-2p.

Analiza comparativă a valorilor obținute ale acestui indice de evaluare a efectului antitumoral *in vitro*, exprimat prin potențialul de inhibare a dezvoltării culturilor celulare tumorale HeLa și Hep-2p, a evidențiat superioritatea amestecului purificat și concentrat mixt, obținut din cele 2 plante în raport de 1:1.

Comparativ cu rezultatele obținute pe culturile de celule tumorale, reactivitatea culturilor de celule normale la acțiunea extractelor purificate și concentrate prezentate este una moderată (fig. 4 atașată), ceea ce demonstrează că ținta preferențială a acestor produse este localizată preponderent la nivelul celulelor tumorale.

Alte două criterii impuse de programele de prescreening de referință, destinate selectării potențialilor agenți citostatici *in vitro*, urmărite au fost:

- demonstrarea existenței unei relații doză-efect, care să permită optimizarea eficienței prin manipularea dozelor de tratament;
- estimarea eficienței noului produs în funcție de potențialul antitumoral *in vitro* al unor citostatice standard de uz clinic.

Efectul diferitelor doze (μg/ml) ale extractelor apoase purificate și concentrate, singulare, și al extractului mixt obținut prin combinația celor 2 extracțe de plante (raport 1:1), obținute prin procedeul descris în cererea de brevet, asupra dezvoltării culturilor de celule tumorale HeLa, comparativ cu evoluția culturilor martor corespunzătoare la 72 h, sunt prezentate în fig. 5 atașată.

Creșterea dozei de tratament *in vitro* a extractului concentrat induce asupra culturilor de celule canceroase HeLa amplificarea impactului proteinosintezo-inhibitor, accentuarea inhibării dezvoltării culturilor celulare în decursul evoluției de 72 h a culturilor, confirmând potențialul antitumoral *in vitro* al dozei stabilite de noi ca fiind citostatic activă (15 μg/ml). Se observă o potențare a eficienței antitumorale a amestecului obținut din cele două extracțe concentrate de bază, care poate fi explicată prin acțiunea sinergică a compușilor polifenolici

RO 128610 B1

1 concentrați în extractele obținute prin procedeul descris (acizi fenolici: acid cafeic, acid
2 cumaric, acid elagic, acid galic, acid ferulic, respectiv, flavonoide: rutin, kaemferol, luteolin
3 și quercetin), la care se adaugă efectul bufadienolidelor din extractul purificat și concentrat
4 de *Helleborus purpurascens*, precum și al altor compuși de natură proteică, glucidică etc.

5 Un alt criteriu urmărit a fost estimarea eficienței extractelor concentrate, obținute în
6 funcție de potențialul antitumoral *in vitro* al unor oncochimioterapeutice (citostatice) standard
7 de uz clinic. Reactivitatea procesului de proliferare a celulelor neoplazice HeLa la acțiunea
8 extractelor luate în studiu, investigată prin citometrie în flux continuu (fig. 6), a fost demon-
9 strată prin potențialul perturbator al apoptozei celulare și proliferării celulare, care este supe-
10 rior tuturor citostaticelor standard luate în studiu, ceea ce dovedește o eficiență antitumorală
11 semnificativă a extractelor purificate și concentrate, și, în special, a extractului concentrat
12 mixt, obținut din *Geranium robertianum* și *Helleborus purpurascens* (raport 1:1).

13 Rezultatele analizei comparative a extractelor concentrate cu citostatice standard de
14 uz clinic (etopozid, metotraxat și 5-fluorouracil) sunt prezentate sintetic în fig. 7 atașată docu-
15 mentului.

16 Potențialul antitumoral *in vitro* maxim al citostaticelor standard, înregistrat în condițiile
17 duratei de 72 h a tratamentului, de 42,6%, în cazul metotraxatului, de 76,9%, în cazul
18 etopozidului, și de 97,7%, în cazul 5-fluorouracilului, ca etalon al eficienței antitumorale, ne
19 permite să apreciem extractul concentrat mixt, obținut din *Geranium robertianum* și
20 *Helleborus purpurascens* (raport 1:1), care au indus un nivel maxim al efectului inhibitor
21 asupra dezvoltării culturilor celulare HeLa de 89,6% la doza de 15 μg/ml - ca fiind potențial
22 agent antineoplazic cu posibilă valorificare biomedicală veterinară sau chiar umană,
23 consecutiv trialurilor clinice.

RO 128610 B1

Revendicări

1

1. Combinație de extracte concentrate prin ultrafiltrare de *H. purpurascens* și *G. robertianum* în raport de 1:1 în volum.

3

2. Combinație de extracte conform revendicării 1, pentru utilizare în tratamentul cancerului.

5

(51) Int.Cl.

A61P 35/00 (2006.01);

A61P 29/00 (2006.01);

A61K 31/00 (2006.01)

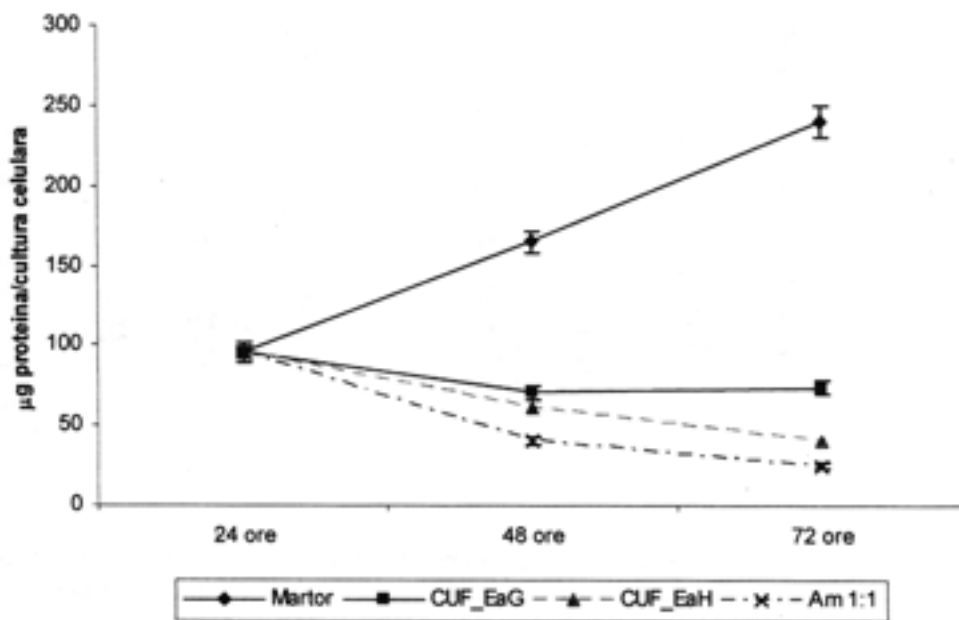


Fig. 1

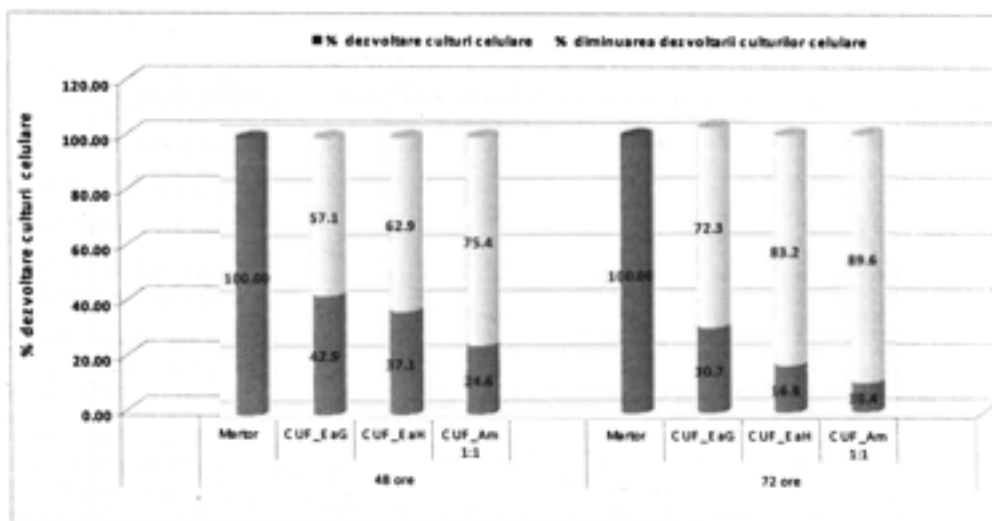


Fig. 2

(51) Int.Cl.

A61P 35/00 (2006.01);

A61P 29/00 (2006.01);

A61K 31/00 (2006.01)

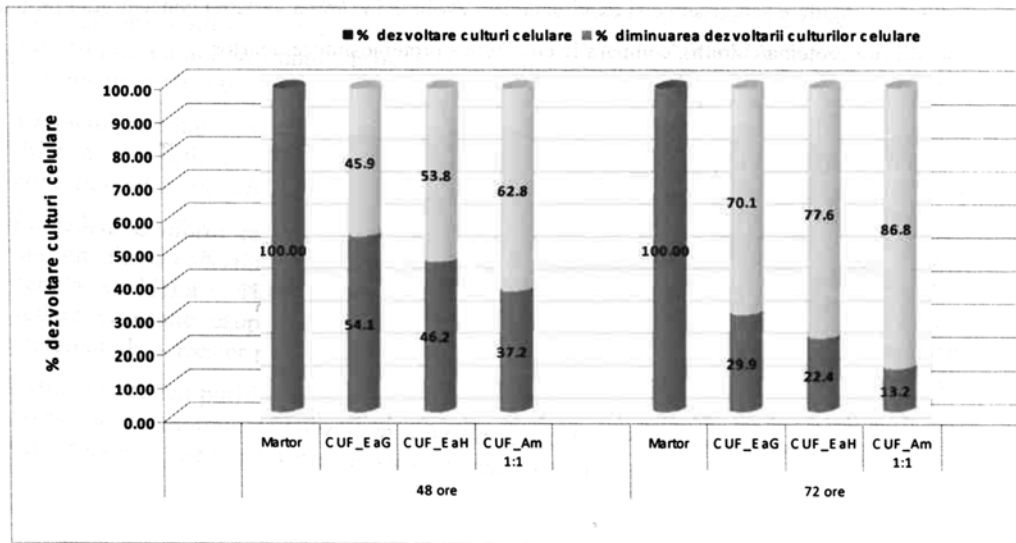


Fig. 3

(51) Int.Cl.
A61P 35/00 (2006.01);
A61P 29/00 (2006.01);
A61K 31/00 (2006.01)

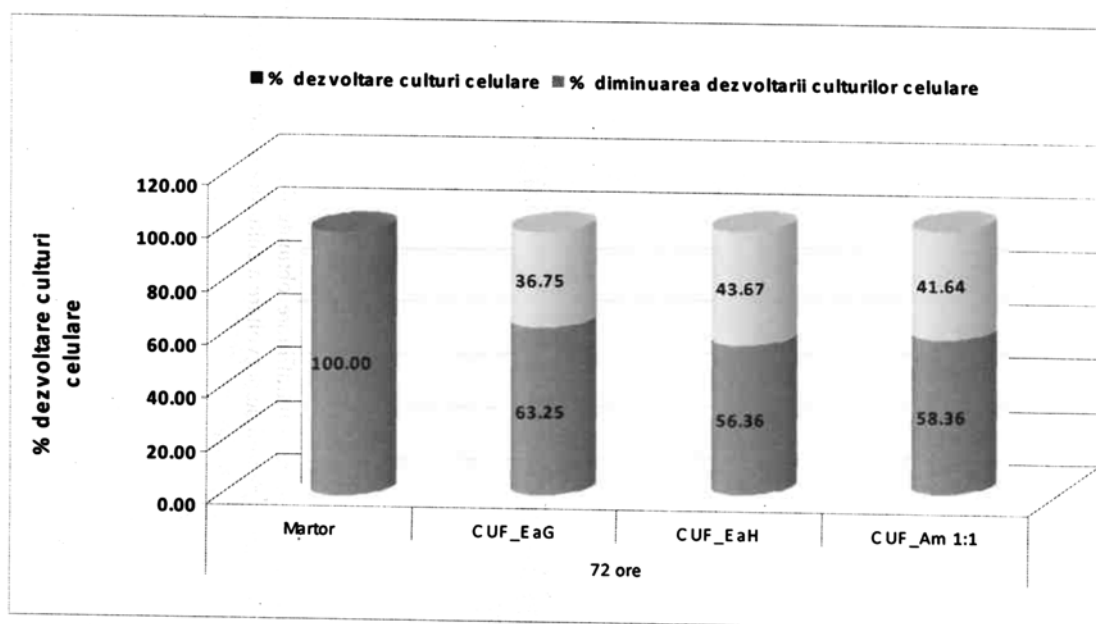


Fig. 4

(51) Int.Cl.
A61P 35/00 (2006.01);
A61P 29/00 (2006.01);
A61K 31/00 (2006.01)

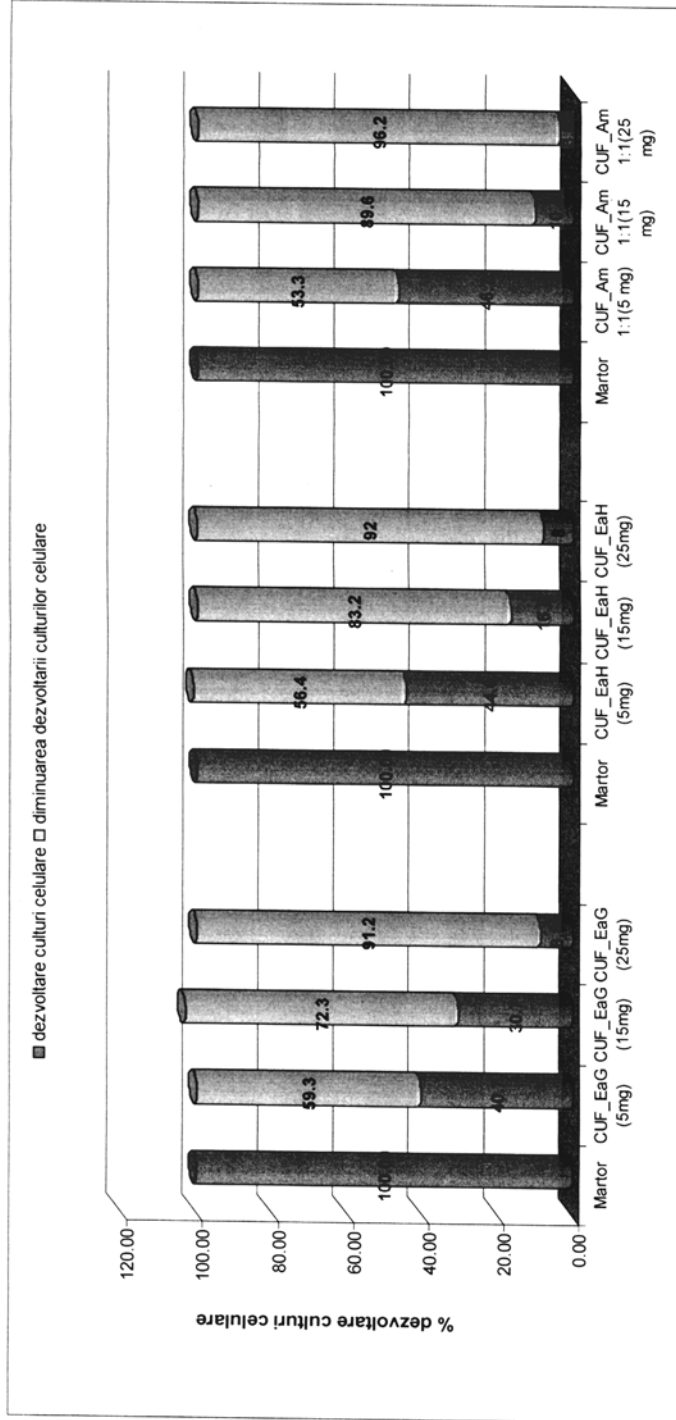


Fig. 5

(51) Int.Cl.
A61P 35/00 (2006.01).
A61P 29/00 (2006.01).
A61K 31/00 (2006.01)

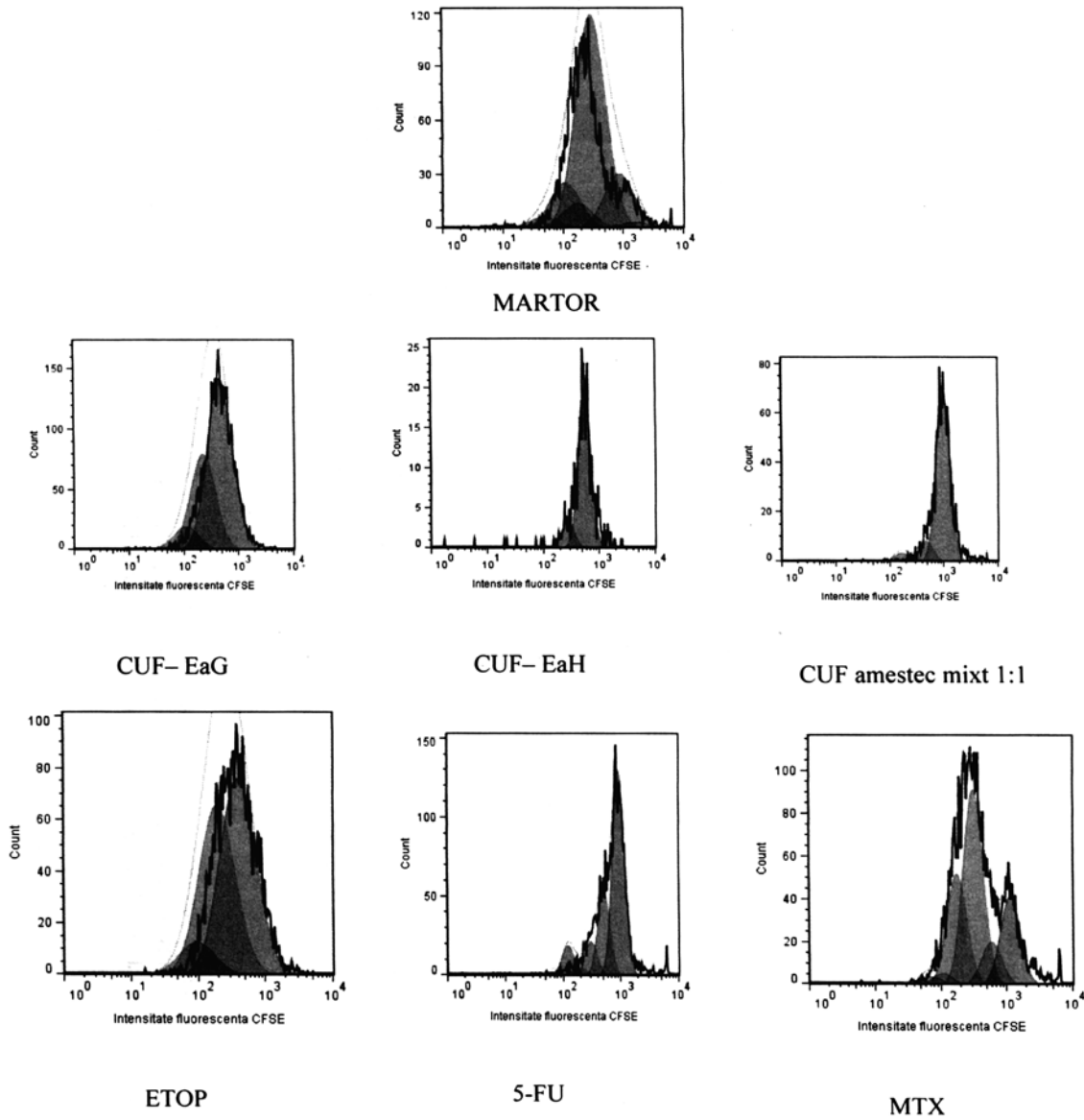


Fig. 6

(51) Int.Cl.
A61P 35/00 (2006.01);
A61P 29/00 (2006.01);
A61K 31/00 (2006.01)

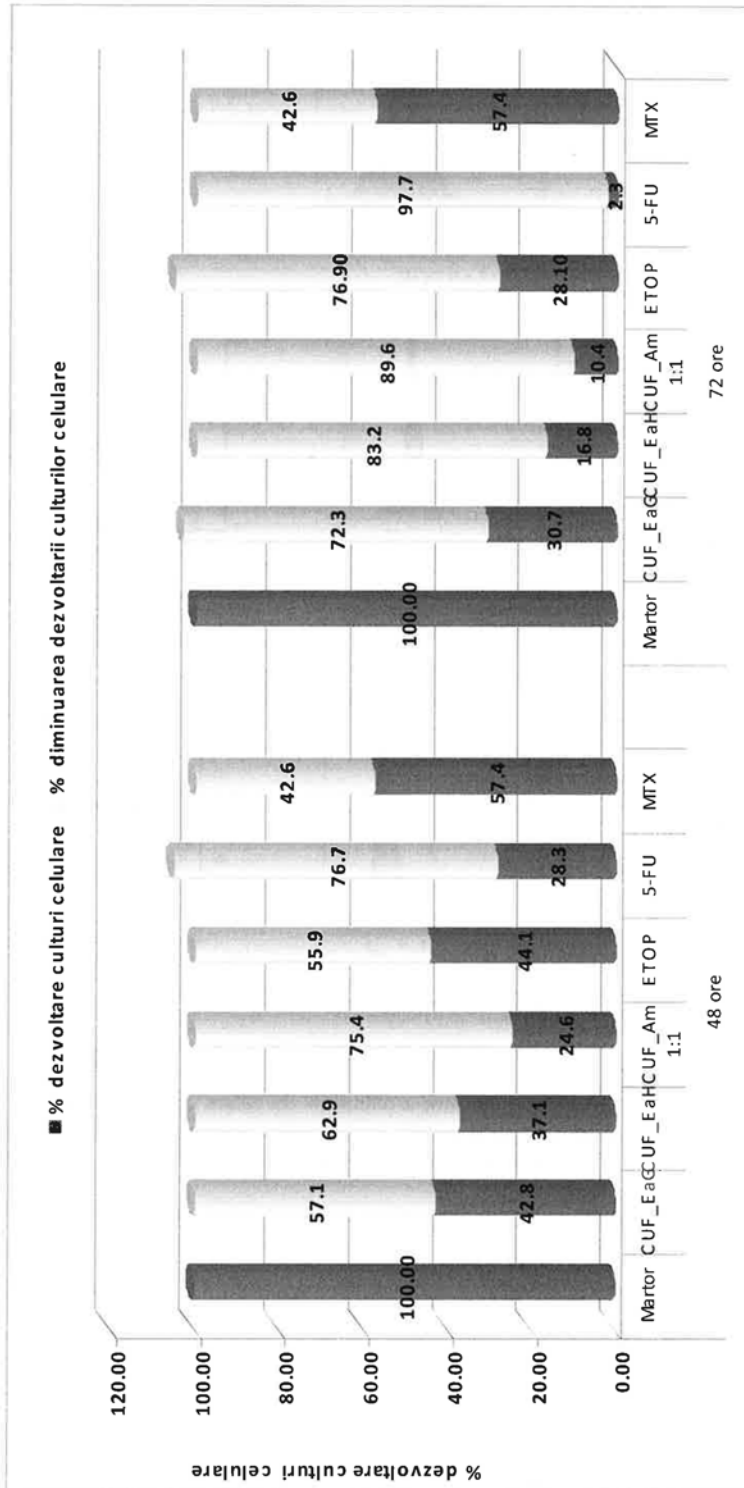


Fig. 7



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 11/2017