



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00489**

(22) Data de depozit: **05/07/2016**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2017 BOPI nr. **3/2017**

(71) Solicitant:

- **ANCUCEANU ROBERT**, STR. MOȚOC NR. 2, BL. P3, SC.3, AP. 72, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- **ZBÂRCĒA CRISTINA ELENA**, STR. CALEA VĂCĂREȘTI NR. 308, BL. 1E, ET. 2, AP. 12, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- **ȚĂRCOMNICU ISABELA**, STR. TURDA NR. 127, BL. 2, SC. D, AP. 167, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **DINU MIHAELA**, STR. ȘOIMĂREȘTI NR. 19, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **NEGREȘ SIMONA**, ȘOS. GIURGIULUI NR. 121, BL. 5, SC. 2, AP. 44, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- **HOVANEȚ MARILENA VIORICA**, STR. CĂLINULUI NR. 13, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- **ANGHEL ADRIANA IULIANA**, STR. SOLD. N. SEBE NR. 5, BL. S24, AP. 36, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- **NICOLESCU TEODOR OCTAVIAN**, STR. PODUL GIURGIULUI NR.3, BL.11, SC.1, ET.5, AP.32, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- **COJOCARU-TOMA MARIA**, ȘOS. HANCEȘTI NR. 2, AP. 14,, CHIȘINĂU,, MD;
- **CALALB TATIANA**, STR. ALECU RUSSO NR. 55, AP. 146, CHIȘINĂU,, MD

(72) Inventatori:

- **ANCUCEANU ROBERT**, STR. MOȚOC NR. 2, BL. P3, SC.3, AP. 72, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- **ZBÂRCĒA CRISTINA ELENA**, STR. CALEA VĂCĂREȘTI NR. 308, BL. 1E, ET. 2, AP. 12, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- **ȚĂRCOMNICU ISABELA**, STR. TURDA NR. 127, BL. 2, SC. D, AP. 167, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **DINU MIHAELA**, STR. ȘOIMĂREȘTI NR. 19, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **NEGREȘ SIMONA**, ȘOS. GIURGIULUI NR. 121, BL. 5, SC. 2, AP. 44, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- **HOVANEȚ MARILENA VIORICA**, STR. CĂLINULUI NR. 13, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- **ANGHEL ADRIANA IULIANA**, STR. SOLD. N. SEBE NR. 5, BL. S24, AP. 36, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- **NICOLESCU TEODOR OCTAVIAN**, STR. PODUL GIURGIULUI NR.3, BL.11, SC.1, ET.5, AP.32, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- **COJOCARU-TOMA MARIA**, ȘOS. HANCEȘTI NR. 2, AP. 14,, CHIȘINĂU,, MD;
- **CALALB TATIANA**, STR. ALECU RUSSO NR. 55, AP. 146, CHIȘINĂU,, MD

(54) **EXTRACT DE ORIGINE VEGETALĂ PENTRU TRATAMENTUL DURERII NEUROPATE ASOCIATE CHIMIOTERAPIEI ȘI METODĂ DE OBTINERE A ACESTUIA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui extract de origine vegetală pentru tratamentul durerii neuropate asociate chimioterapiei. Procedeu conform invenției constă în colectarea materialului vegetal constând din rădăcinile speciei *Withania somnifera* (L.) *Dunal*, uscarea la temperaturi de până la 35°C și umiditate sub 65%, pulverizarea și cernerea materialului uscat, extracția repetată a materialului pulverizat cu un amestec etanol:apă într-un raport volumetric de 70:30,

la o temperatură de 70°C, timp de cel puțin 30 min la fiecare etapă de extracție, concentrarea soluțiilor extractive rezultate cu ajutorul unui evaporator rotativ la temperatura de aproximativ 70°C și liofilizarea soluției concentrate la temperaturi mai mici de -50°C.

Revendicări: 9

Figuri: 7

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).



DESCRIEREA INVENȚIEI

Extract de origine vegetală pentru tratamentul durerii neuropate asociate chimioterapiei

Domeniul tehnic la care se referă invenția

Prezenta invenție se referă la un extract vegetal pentru abordarea terapeutică a durerii neuropate asociate chimioterapiei și metode de utilizare a extractului pentru tratamentul durerii neuropate asociate chimioterapiei la om sau animale.

Stadiul tehnicii

Durerea neuropată este o formă de durere unică prin intensitatea sa devastatoare, prin simptomele eluzive, care scăpă descrierilor și prin inducerea unui sentiment de alienare în mintea pacientului care trece de la un medic la altul în căutarea alinării [1]. Durerea neuropată se deosebește de alte afecțiuni la care factorul cauzator al durerii este localizat inițial în alte țesuturi non-neuronale (durere nociceptivă, de ex. cea din inflamațiile articulare). Prin definiție, durerea neuropată își are originea într-o leziune a sistemului nervos [2]. Această leziune modifică sensibilitatea sistemului nervos, în unele cazuri ireversibil, scăzând pragul durerii până acolo încât stimuli inofensivi provoacă durere considerabilă, iar durata și amplitudinea răspunsului la durere sunt amplificate, făcând ca această condiție patologică să fie considerată din cauza acestor modificări o afecțiune distinctă a sistemului nervos [3].

O formă de durere neuropată este cea indusă de unele tratamente oncologice larg utilizate în diverse forme de cancer, în special paclitaxelul și derivații de platină. Sindromul neuropatic indus de acestea afectează calitatea vieții pacienților respectivi și poate avea drept consecință reducerea dozelor sau întreruperea prematură a tratamentului, cu consecințe asupra eficacității acestuia și a speranței de viață a pacienților [4]. În cazul pacientelor cu cancer de sân tratate cu taxani, de exemplu, numai 20-30% dintre acestea nu dezvoltă neurotoxicitate, manifestată inclusiv prin durere neuropată [5].

Un grup de lucru al Federației Europene a Societăților de Neurologie (EFNS, *European Federation of Neurological Societies*) afirma în anul 2006 că „tratamentul durerii neuropate rămâne nesatisfăcător, în ciuda unei creșteri substanțiale a numărului studiilor clinice” [6]. Analiza sistematică a studiilor clinice realizate cu intervenții farmacologice a indicat că până în prezent majoritatea studiilor clinice randomizate pe eșantioane mari au inclus pacienți cu polineuropatii diabetice și nevralgie post-herpetică; studii mai mici au început să fie tot mai mult efectuate și în alte afecțiuni. În aceste studii, eficacitatea a fost demonstrată (nivel A de dovadă) pentru antidepresivele triciclice, pregabalin și gabapentin, tramadol și opioide (într-o varietate de afecțiuni), duloxetină, venlafaxină, lidocaină topică și capsaicină topică (doar în unele afecțiuni). Dintre terapiile de combinație, dovezile sunt favorabile asocierilor antidepresive triciclice-gabapentină și opioizi-gabapentină (nivel A de dovadă). Aceste medicamente au demonstrat o eficacitate comparabilă în diferitele afecțiuni, cu excepția nevralgiei de trigemen, a radiculopatiei cronice și a neuropatiei asociate HIV [7]. Deși farmacoterapia rămâne cea mai importantă opțiune de tratament, studiile transversale arată că cca. 75% dintre pacienții cu durere neuropată continuă să experimenteze durere de intensitate moderată până la severă, în ciuda utilizării medicamentelor [8].

În plus, toate medicamentele utilizate în tratamentul durerii neuropate, deși considerate sigure, au efecte adverse care nu pot fi neglijate. De exemplu, anumiți pacienți nu pot atinge concentrații plasmatiche terapeutice cu gabapentin din cauza efectelor adverse: somnolență (27,4%), amețeli (23,9%) sau ataxie (7,1%) [9]. În cazul carbamazepinei s-au raportat efecte adverse la peste 50% dintre pacienți [10]. În cazul amitriptilinei cca. 60% din pacienți au

Jalalb
Mareș
Silveșter
Măruș
H. H.

raportat efecte adverse (față de 40% la placebo) [11]. În special la vârstnici, efectele adverse intolerabile (mai probabile din cauza contextului fizio-patologic specific vârstei și a polimedicăției), perioadele lungi de creștere treptată a dozei pentru a atinge rezultatul terapeutic dorit, dificultățile de administrare și satisfacția redusă cu rezultatele tratamentului, conduc la înlocuirea unui medicament cu un altul sau adăugarea unui al doilea medicament [12]. În special, dezvoltarea de medicamente lipsite de efecte adverse sedative este anticipată ca o nevoie actuală ce urmează a fi satisfăcută [13].

Abordările potențial utile explorate în ultimii ani în domeniul includ: AINS, corticosteroizi, blocanți ai canalelor ionice (de calciu, sodiu, potasiu, TRP), modulatori ai schimbului ionic (NCE și NHE), modulatori ai transportorilor ionici (NKCC-1, glicină), modulatori ai unei varietăți de receptori (serotoninerfici, dopaminergici, alfa- și beta-adrenergici, purinerfici, histaminergici, ai kininei, ei endotelinei, ai melanocortinei, ai efrinei, ORL1, ai aminoacizilor stimulatori – acidul glutamic, ai PAR), inhibitori enzimatici (ai metaloproteinazelor, ai unor proteaze, ai vasopeptidazei, ai D-aminoacid-oxidazei, ai amid-hidrolazei acizilor grași, ai aldozo-reductazei și sorbitol-dehidrogenazei), medicamente care interferă cu căile de semnalizare imunologice (cascada complementului, citokine), neuropeptide și alți liganzi (AGE, RAGEs), factori de creștere ș.a. [14].

Există numeroase brevete care au ca obiect substanțe, extracte ori preparate destinate tratamentului durerii în general. Dintre acestea, mai multe brevete naționale și internaționale descriu diverse remedii vegetale propuse pentru tratamentul unei varietăți de simptome sau afecțiuni, printre care și pentru tratamentul durerii. Totuși, numărul celor care se referă la extracte vegetale pentru tratamentul durerii neuropate este foarte limitat. O interogare Espacenet utilizând cuvintele cheie „herbal AND neuropathic” a returnat un număr de 14 brevete/cereri de brevete, majoritatea din China, dintre care cinci se referă la aceeași invenție, ușor modificată/perfecționată, iar două nu se referă la durerea neuropată, ci la dermatita neuropată (a cărei componentă principală este pruritul și nu durerea).

P. Cao et al. (2015) au propus, pornind de la concepte specifice medicinei tradiționale chineze, o compoziție pentru tratamentul cancerului, despre care se pretinde, printre altele, că influențează favorabil și simptomele de durere neuropată induse de chimioterapie. Compoziția respectivă asociază mai multe produse vegetale: *Astragali membranaceus radix*, *Cinnamomi cortex*, *Paeonia alba radix*, *Jujubae fructus* și *Zingiberi rhizoma*, în anumite proporții preferate, extrase cu apă prin refluxare timp de 1-3 ore. Extractul astfel obținut urmează a fi asociat cu unul sau mai mulți compuși chimioterapici [15]. O altă invenție referitoare la un remediu de medicină tradițională chineză abordează generic cefaleea, inclusiv de origine neuropată, și se bazează pe „*Ligusticum wallichii*, *Rhizoma Cimicifugae*, sămânța de piersică, șofrănel și *Ephedrae herba*”, procesate în forme farmaceutice convenționale (comprimat, pulbere, capsulă, granule) [16]. S-a mai solicitat brevetarea unui spray inspirat de medicina tradițională chineză, spray destinat tratamentului spondilozei cervicale, despre care inventatorii au afirmat că „are unele efecte” și în durerea neuropată. Spray-ul include un amestec complex de produse vegetale (“*radix sophorae tonkinensis*, *ephedra chinezească*, rădăcină de bujor alb, resina draconis, tămâie, dangshen, rădăcină de kudzu vine, glicerină, *radix aconiti kusnezoffii* praeparata, rădăcină de *Angelica pubescens* Maxim.f. *biserrata*, pochivnic manciurian, rădăcină de *clematis chinezesc*,” și unele substanțe pure de origine vegetală (mentol, borneol, azonă, glicerină etc), precum și etanol 95% [17]. Alte versiuni ale aceleiași invenții [18-21] cuprind liste ușor diferite ale ingredientelor de origine vegetală.

Invenția lui B. Xugang (2013) se focalizează tot asupra cefaleei neuropate și include un amestec complex de remedii vegetale chinezești: *Angelicae radix*, *Houttuynia cordata*, *Ligustri lucidi fructus*, *Sileris radiceis*, *Cinnamomum sp.* și *Liquiritiae radix*. Acestea sunt supuse unei decoctii la foc lent, concentrate până la o formă de pastă și apoi transformate în diverse forme farmaceutice [22]. Invenția lui B. Xie (2008) bazată pe un amestec complex de

Handwritten signatures and notes at the bottom of the page, including names like "Sereg", "Gulob", "Alex", and "ATB".

condiții adecvate de temperatură și umiditate, de preferat la umbră (temperaturi mai mici de 35°, umiditate sub 65%). Rădăcinile uscate sunt supuse pulverizării prin măcinare și cernute printr-o sită cu dimensiunea ochiurilor de 250 μm. Materialul vegetal se supune extracției de 3 ori cu un amestec etanol:apă 70:30 (v/v) la o temperatură de cca. 70 °C. Soluțiile extractive se filtrează, se reunesc și se concentrează prin metode cunoscute la temperaturi mai mici sau egale cu 70 °C, de exemplu cu ajutorul unui evaporator rotativ. Soluția concentrată se supune apoi liofilizării la temperaturi mai mici de (-)50 °C, când se obține un extract cu miros slab caracteristic (de zahăr caramelizat) și gust amar și slab acid. Extractul a fost testat *in vivo* (la șobolan) pentru efectul antialodinic și analgezic în durerea neuropată, iar toxicitatea a fost evaluată la șoarece, pe crustaceul acvatic *Artemia franciscana*. iar geno- și fitotoxicitatea pe radicule embrionare de *Triticum aestivum* L. Efectul antioxidant al extractului a fost evaluat spectrofotometric prin metoda cu DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrat). Reproducibilitatea procesului de obținere a extractului a fost evaluată prin analiza LC-MS a trei serii distincte de extract obținute prin procedeul descris mai sus.

Avantaje.

Invenția oferă o soluție terapeutică pentru durerea neuropată indusă de chimioterapie, prezintă eficacitate în modelele non-clinice chiar la doze mai mici decât cele ale gabapentinei utilizate ca produs de referință, ceea ce este remarcabil ținând seama de natura de extract vegetal, cu o compoziție complexă, a produsului. De asemenea, extractul vegetal are un foarte bun profil de siguranță, evaluarea toxicității pe cale orală după doză unică la șoarece indicând că extractul se încadrează în categoria 5 (DL50 > 5000 mg/kg corp, p.o.) în conformitate cu datele incluse în Sistemul Global de Armonizare [Global Harmonised System (GHS) – ENV/JM/MONO (2001).

Procesul de obținere a extractului este simplu și eficient din punct de vedere al costurilor. Materia primă vegetală poate fi obținută la costuri modeste, iar solvenții utilizați în modalitatea preferată de realizare a invenției (apă și etanol), sunt ieftini și siguri. Extractul astfel preparat poate avea și alte beneficii pentru sănătate, cum ar fi combaterea oboselii sau ameliorarea funcțiilor sexuale, așa cum sugerează datele din literatură pentru extractele de *Withaniae radix* [44, 45]

În continuare se prezintă mai multe exemple de realizare a invenției.

Exemplu 1. Se supune extracției conform metodei de mai sus 170 grame de produs vegetal pur, pulverizat, se concentrează cu ajutorul unui evaporator rotativ la 70 °C, iar soluția apoasă concentrată rezultată se supune liofilizării la -53 °C. Se obțin cca. 30 g de extract cu miros slab caracteristic (de zahăr caramelizat), gust amar și slab acid, foarte higroscopic (randament de extracție 17,79%, raport produs vegetal:extract (DER) 17:3).

Exemplu 2. Se supune extracției conform metodei de mai sus cca. 506 g de pulbere de rădăcină de *Withania somniferae radix*, se concentrează cu ajutorul evaporatorului rotativ la 70 °C, iar soluția concentrată se liofilizează la -53 °C. Se obțin cca. 92 g de extract cu aceleași caracteristici organoleptice și higroscopie (randament de extracție 91,93%, raport produs vegetal: extract 16,7:3).

Exemplu 3. S-au preparat trei serii de extract prin procedeul descris anterior, pornind de la cca. 50 grame de produs, provenit din trei surse comerciale diferite, fiecare obținut cu randamente asemănătoare (19,87%, 16,1%, 18.85%). S-a studiat compoziția chimică a extractului prin LC-MS și s-a observat o compoziție foarte asemănătoare de la serie la serie.(Fig.1-3)

Jalob
Alteios
Ape
Seregres
Jalob
Jalob
HTO

Analizele au fost efectuate cu un spectrometru de masă de tip triplu quadrupol AB Sciex model API 3200, cuplat cu un sistem LC compus din autosampler, pompă cromatografică și degazor Agilent model 1260 Infinity. S-a folosit o interfață de tip electrospray, operată în mod de ionizare pozitiv. Compușii de interes au fost separați pe o coloană cromatografică Luna PFP (2), 100x2 mm, 100A (Phenomenex), cu o fază mobilă compusă din A) apă cu 0,1% acid formic și B) Acetonitril cu 0,1% acid formic, la un debit de 0.25 mL/min, în gradient de compoziție pornind de la 90% A și ajungând la 85% B. Au fost efectuate experimente de tip scanare generală pe un domeniu de masă, pentru identificarea ionilor moleculari și scanare de produși de fragmentare a compușilor de interes, pentru elucidarea structurii.

Pe cromatograme au fost evidențiați 3 compuși cu masa moleculară 470,267 (ion molecular $[M=H]^+ = 471.5$). Aceștia au fost tentativ identificați conform structurii și pe baza datelor din literatura ca fiind withaferină A ($R_t = 6,25$ min), withanonă ($R_t = 6,37$) și withanolidă A ($R_t = 6,49$) (Fig. 4). Au fost de asemenea observați ionii moleculari pentru withanolida B - $[M=H]^+ = 455.4$, sominonă - $[M=H]^+ = 459.3$ și deoxiwithastramonolidă - $[M=H]^+ = 457.3$.

Tot pentru controlul, reproductibilității procesului de obținere a extractului s-au determinat polifenolii totali din patru serii de extract, utilizând metoda Folin-Ciocalteu. În primele trei serii de extract, obținute din surse comerciale diferite pentru produsul vegetal, conținutul în polifenoli totali – medie (grame) per 100 grame extract (deviație standard) - a fost de 1,55 (0,05); 1,49 (0,06); și 1,68 (0,07). Pentru cea de-a patra serie, preparată cu un an mai înainte dintr-o altă sursă comercială de *Withaniae radix*, conținutul în polifenoli totali a fost de 2,47 (0,10).

Exemplu 4. Dovezi experimentale. Toate experimentele pe animale pentru evaluarea eficacității extractului în modele non-clinice au fost efectuate respectând normele de bioetică în cercetarea pe animale de experiență în scop științific, conform Legii 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și a Directivei 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010, privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice. Pentru evaluarea activității antinociceptive a extractului s-a utilizat un model de neuropatie periferică indusă la șobolani albi, masculi, sușa Wistar, prin administrare de paclitaxel 2 mg/kg corp, i.p. 4 zile consecutiv [Zbârcea CE, Negreș S et al., 2011]. Neuropatia periferică a fost evaluată prin sensibilitatea tactilă (alodinie și hiperalgezie), determinate cu ajutorul aparatului *Dynamic Plantar Aesthesiometer* și cu ajutorul filamentelor manuale Von Frey (Ugo Basile – Comerio, Italia).

Animale. Experimentul s-a realizat pe 44 de șobolani masculi, sușa Wistar, cu greutatea medie de 191,50 g (d.s. 27,71 g), proveniți de la biobaza Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București. Șobolanilor li s-a oferit acces la hrana și la apă *ad libitum*. Temperatura și umiditatea relativă au fost menținute la 21-24° C, respectiv 45-60% pe tot parcursul experimentului. Acesta a avut loc pe parcursul a 17 zile în laboratorul de Farmacologie experimentală a Facultății de Farmacie a UMF „Carol Davila” București.

Animalele au fost împărțite în patru grupuri experimentale a câte 9-8 animale pe lot, astfel:

- Lotul martor (M): ser fiziologic 0,1 mL/corp, i.p., 4 zile consecutiv + apă distilată 1mL/100 g corp, p.o., 17 zile consecutiv;
- Lotul paclitaxel (P): paclitaxel 2 mg/kg corp, i.p., 4 zile consecutiv + apă distilată 1mL/100 g corp, p.o., 17 zile consecutiv;
- Lotul paclitaxel cu extract *Withania somnifera* (L.) Dunal. (P+W): paclitaxel 2 mg/kg corp, i.p., 4 zile consecutiv + extract *Withania somnifera* (L.) Dunal. 250mg/kg corp, p.o., 17 zile consecutiv.

Handwritten signatures and initials at the bottom of the page, including names like "Gabriel", "Alina", "Flora", and "Negreș".

- *Lotul paclitaxel cu gabapentin (P+Gaba):* paclitaxel 2 mg/kg corp, i.p, 4 zile consecutiv + gabapentin 300mg/kg corp, p.o., 17 zile consecutiv.

Materiale. Soluția de paclitaxel s-a preparat prin diluarea cu ser fiziologic a unei soluții 6 mg/mL (Actavis - România) până la 2mg/mL și s-a păstrat la frigider (2-8 °C) maximum 2 zile. Extratul uscat de *Withania somnifera* (L.) Dunal. a fost obținut după cum s-a descris anterior. Acesta s-a administrat sub formă de soluție coloidală 2,5% (m/v) obținută prin dizolvare în apă distilată, păstrată la frigider (2-8°C), maxim 2 zile. Pentru grupul de control pozitiv s-a utilizat o soluție 3% de clorhidrat de gabapentin (Artesan Pharma - Germania), păstrată la frigider (2-8°C) maxim 2 zile.

Inducerea neuropatiei cu paclitaxel. La doze mici, cumulative, paclitaxel produce alodinie și neuropatie dureroasă la șobolan, caracterizată prin scăderea pragurilor de percepție și de reacție la durere mecanică și termică. S-a indus neuropatie la șobolani albi, masculi sușa Wistar, prin administrare de paclitaxel 2 mg/kgc i.p. zilnic, timp de 4 zile consecutiv [Flatters SJ et al., 2006, modificată; Zbârcea CE, Negreș S et al., 2011].

La diferite momente ale experimentului s-a evaluat sensibilitatea tactilă cu ajutorul celor două teste. Testările au fost efectuate în zile diferite, după o oră de la administrarea per os a tratamentului. Reprezentarea grafică a protocolului experimental este redată în fig. 1.

Evaluarea statistică a datelor experimentale s-a realizat prin analiză dispersională unifactorială (one way ANOVA), iar pentru analizele post-hoc s-a utilizat contraste relative neparametrice de tip Tukey și intervale simultane de încredere, utilizând funcția de transformare „logit” pentru aproximarea asimptotică.

Rezultate. Forța maximă suportată pentru stimulul de 4g/s pentru fiecare din loturile experimentale (M, P, P+W și P+Gaba) la diferite intervale de timp este prezentată în figura 2. Dacă la momentul inițial nu au existat diferențe semnificative între cele patru loturi în privința forței maxime suportate, după patru zile grupul tratat numai cu paclitaxel a suportat forțe mult mai mici în comparație cu grupul martor (fără paclitaxel) sau grupul tratat cu gabapentin. Extractul de *Withania* nu a avut decât un efect foarte limitat, nesemnificativ statistic în ziua a 4-a, dar acesta a devenit tot mai pronunțat, la ziua a 10-a nedeosebindu-se de grupul martor, ca și la ziua a 17-a, în care însă nu s-a mai deosebit semnificativ nici de gabapentin ($p=0.929$), diferențele fiind însă semnificative față de grupul tratat cu paclitaxel ($p<0.001$). Efectul este cu atât mai remarcabil cu cât este produs de un extract complex și nu de o substanță pură, iar doza utilizată pentru extract a fost inferioară celei a substanței de referință (gabapentin 300 mg/kg corp, extractul de *Withania somnifera*, 250 mg/kg corp).

O variație foarte asemănătoare s-a înregistrat și în privința parametrului timp de răspuns (figura 3): la momentul inițial nu au existat diferențe între cele patru loturi, iar timpul de răspuns s-a scurtat rapid (ziua a 4-a) pentru lotul tratat doar cu paclitaxel. Efectul extractului de *Withania somnifera* (L.) Dunal s-a instalat lent, în ziua a 4-a timpul de răspuns nefiind semnificativ superior celui observat la grupul tratat doar cu paclitaxel, dar începând cu ziua a 10-a timpul de răspuns a fost superior grupului martor negativ (netratat cu paclitaxel), iar în ziua a 17-a diferențele minore față de gabapentin au fost nesemnificative statistic. Și aici este valabilă mențiunea că aceste efecte sunt cu atât mai remarcabile cu cât se referă la un extract vegetal și nu la o substanță pură, iar administrarea s-a făcut la o doză inferioară celei a gabapentinei (250 mg/kg versus 300 mg/kg).

Pentru filamentele von Frey, variația sensibilității tactile (exprimate prin pragul de răspuns – în grame - al forței la care apare 50% din răspuns) este reprezentată grafic în figura 4. Se observă o evoluție ușor diferită față de măsurătorile realizate în privința forței maxime și a timpului de răspuns, în sensul că dacă acolo s-a observat o evoluție ascendentă a efectului, cu un maxim atins în ziua a 17-a, în cazul utilizării filamentelor von Frey efectul maxim a fost înregistrat în ziua a 10-a (când efectul a fost ușor superior, chiar dacă nu semnificativ statistic) față de gabapentină. În schimb, în ziua a 17-a s-a observat o diminuare a efectului măsurat cu

Jalob
Mered
Negreș
S
J
H

ajutorul filamentelor von Frey, acesta fiind inferior gabapentinei (și pentru aceasta observându-se o diminuare a efectului în comparație cu ziua a 10-a), deși non-inferior față de grupul martor (la care nu s-a indus neuropatie cu paclitaxel), însă nu s-a deosebit semnificativ statistic nici față de grupul tratat doar cu paclitaxel. Aceste date indică o diminuare a efectului măsurat cu ajutorul filamentelor von Frey în ziua a 17-a față de ziua a 10-a, însă absența unor efecte semnificative statistic cu această modalitate de evaluare a efectului în ziua a 17-a trebuie privită și în contextul dimensiunii limitate a eșantioanelor; graficul (fig. 4) indică un trend în favoarea extractului de *Withania* față de grupul tratat doar cu paclitaxel, iar observația că doza de extract utilizată a fost inferioară celei utilizate pentru gabapentin (250 mg/kg versus 300 mg/kg este validă și aici).

În concluzie, datele experimentale indică pentru extractul de *Withania somnifera* (L.) Dunal un efect anti-alodinic similar celui observat la gabapentin la evaluarea cu ajutorul esteziometrului plantar dinamic și un efect similar celui observat la gabapentin la evaluarea cu ajutorul filamentelor von Frey în ziua a 10-, dar nu și în ziua a 17-a a experimentului. Mai mult, aceste efecte remarcabile au fost obținute cu un extract vegetal complex, multicomponent, și nu cu o substanță pură, iar doza utilizată pentru extract a fost inferioară celei de gabapentin.

Pentru a evalua eventuala contribuție a unui potențial efect antioxidant al extractului la efectul farmacologic s-a investigat capacitatea extractului de a neutraliza radicalii liberi prin metoda bazată pe DPPH. S-a obținut o concentrație inhibitorie mediană (CI₅₀) de 632,38 ± 1,96 mg/L (medie ± deviație standard) (IC 95%, 448,41-816,35). IC₅₀ astfel determinată experimental este relativ mare (indicând un efect antioxidant modest) în comparație cu cea determinată în condiții identice pentru acidul ascorbic (197,16; IC 95% 191,02-203,31), quercetol (quercetin) (67,58; IC95% 51.07 - 84.10) sau acid galic (36,50; IC 95% 27.41 - 45.59). Aceasta sugerează că nu mecanismul antioxidant este esențial în inducerea efectului antialodinic și analgezic al extractului.

Exemplu 5. Dovezi experimentale. Conform ghidurilor OECD (Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică) pentru determinarea toxicității la șoarece, după doză unică administrată per os [46], s-a utilizat o metodă alternativă de estimare a toxicității după doză unică a extractului, metoda dozelor fixe (OECD 420/2001) utilizând testul limită. Experimentul s-a realizat pe colectivitate de șoareci masculi, sușa NMRI, proveniți de la biobaza Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București. Șoarecilor li s-a oferit acces la hrană și la apă ad libitum. Temperatura și umiditatea relativă au fost menținute la 21-24° C, respectiv 45-60% pe tot parcursul experimentului și determinate cu ajutorul unui higrometru. Toate procedurile au fost efectuate respectând normele de bioetică în cercetarea pe animale de experiență în scop științific, conform Legii 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și Directivei 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010, privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.

Doza limită a fost de 2000 mg/kg corp, ce a fost administrată unui singur animal de experiență, urmată de administrarea ulterioară la 4 animale, dacă nu se înregistrează nici un deces. Extractele au fost administrate în condiții de post alimentar, timp de 4 ore înaintea administrării. Hrana a fost adăugată la 2 ore după administrarea extractelor de testat, iar rozătoarele au avut acces la apă pe toată perioada determinării. Animalele au fost alese la întâmplare, marcate pentru identificarea individuală, și păstrate în cuștile lor. S-a utilizat testul limită, care prevede utilizarea unei doze inițiale de 2000 mg/kg corp, deoarece literatura de specialitate sugerează că mortalitatea este puțin probabilă la o doză unică mare din extractele testate. Pentru că nu s-a înregistrat letalitate, după 48 de ore de la prima administrare p.o., s-au mai luat încă 4 șoareci pentru fiecare lot, ce au primit în doză unică, p.o. același extract, în

Jabol
 Altoniof
 A. R. Sebeș
 Ștefan
 S. J. B.
 H. T. D.

doza de 2000 mg/kg cp. După administrare, șoarecii au fost observați individual în primele 60 minute, apoi periodic în primele 4 ore și zilnic timp de 14 zile. S-a urmărit apariția următoarelor efecte: tremor, convulsii, hipersalivație, diaree, letargie, somn și comă. Masa corporală a fost determinată inițial înainte de administrare, la 2, 4, 7, 10, 14 zile de la începerea experimentului.

Pentru lotul tratat cu extractul uscat din *Withania somnifera* (L.) Dunal. s-a observat cea mai mare creștere a masei corporale pe tot parcursul experimentului (în experiment au fost evaluate alte trei extracte vegetale, plus un grup martor). Conform ghidului OECD 420 pentru determinarea toxicității orale a substanțelor după doză unică, extractul de *Withania somnifera* (L.) Dunal se încadrează în categoria 5 (DL50 > 5000 mg/kg corp, p.o.) în conformitate cu datele incluse în Sistemul Global de Armonizare [Global Harmonised System (GHS) – ENV/JM/MONO (2001) 6, 2001] [47].

Jalali
Albani
F. M. S. J. B.
L. P. G. M. N. H. O.

DESENE EXPLICATIVE

Figura 1 redă cromatograma extrasă pentru ionul molecular $[M=H]^+ = 471.5$ după analiza primei serii de extract.

Figura 2 redă cromatograma extrasă pentru ionul molecular $[M=H]^+ = 471.5$ după analiza celei de-a doua serii de extract.

Figura 3 redă cromatograma extrasă pentru ionul molecular $[M=H]^+ = 471.5$ după analiza celei de-a treia serii de extract.

Figura 4 reprezintă grafic protocolul experimental utilizat în cadrul exemplului 4.

Figura 5 redă variația forței maxime suportate pentru stimulul de 4g/s pentru cele patru loturi experimentale pe parcursul experimentului (media și intervalul de încredere 95%). Se observă cum în ziua a 17-a extractul de *Withania somnifera* (L.) Dunal nu se deosebește semnificativ nici de grupul martor (fără neuropatie indusă), nici de grupul tratat cu gabapentin.

Figura 6 redă variația timpului de răspuns pentru cele patru loturi experimentale pe parcursul experimentului (media și intervalul de încredere 95%). Se observă cum în ziua a 17-a extractul de *Withania somnifera* (L.) Dunal nu se deosebește semnificativ nici de grupul martor (fără neuropatie indusă), nici de grupul tratat cu gabapentin.

Figura 7 reprezintă grafic Efectul extractului vegetal din *Withania somnifera* (L.) Dunal și al gabapentinei asupra neuropatiei indusă de paclitaxel, exprimat prin pragul de răspuns al forței la care apare 50% din răspuns, pe parcursul experimentului (medie și interval de încredere 95%).

Jalobă
Alina
Ji
A
S. P. P. P.
J. P. P. P.
P. P. P. P.

REVENDICĂRI

1. Extract pentru tratamentul durerii neuropate asociate chimioterapiei, caracterizat prin aceea că se obține din rădăcina de *Withania somnifera* (L.) Dunal. prin extracție repetată cu solvenți adecvați.
2. Extract conform revendicării 1, la care solvenții utilizați pentru extracție sunt apoși sau organici, de preferință alcool etilic 70%.
3. Extract conform revendicării 1, la care temperatura de extracție este de cca. 70 °C.
4. Extract conform revendicării 1, la care durata fiecărei operații de extracție este de cel puțin 30 de minute;
5. Extract conform revendicării 1, obținut prin concentrare la temperaturi mai mici de 70 °C și uscare prin liofilizare.
6. Extract conform revendicării 1, utilizat sub formă de comprimate, capsule, pulberi, supozitoare, sau într-o formă farmaceutică lichidă.
7. Metodă de tratare a durerii neuropate asociate chimioterapiei antitumorale la un subiect uman, constând în administrarea unei cantități eficiente de extract obținut conform revendicărilor 1-4, sub una din formele conform revendicării 6.
8. Metodă conform revendicării 7, la care doza de extract administrată variază între 2 și 8 grame pe zi, divizate în 2-4 prize.
9. Extract conform revendicărilor 1-8, așa cum a fost descris anterior cu referire la exemplele de realizare.

Jalab
Mărcuș
Mi
A. B. Schegrez
Fon
S. B. H.

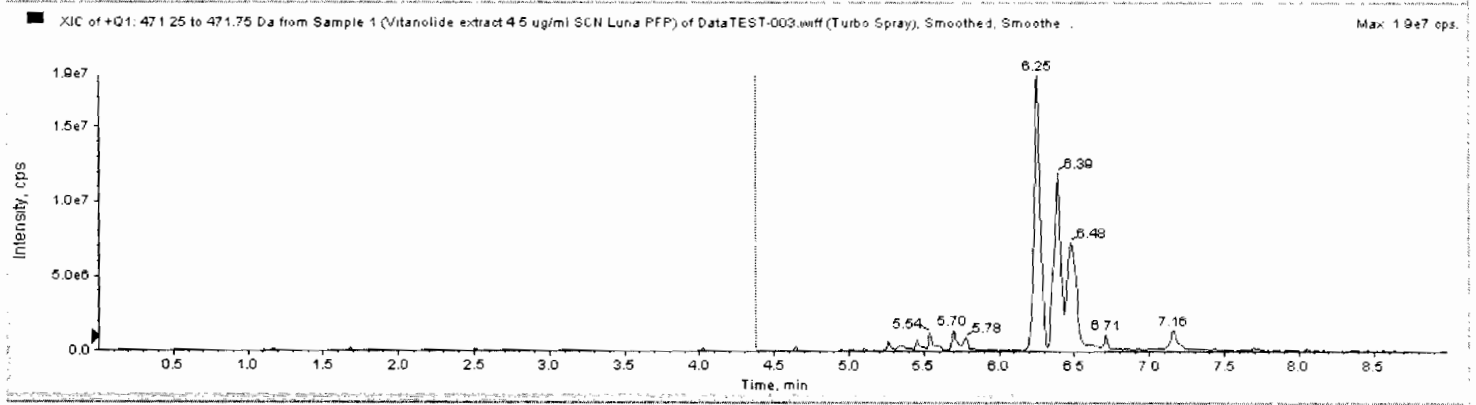
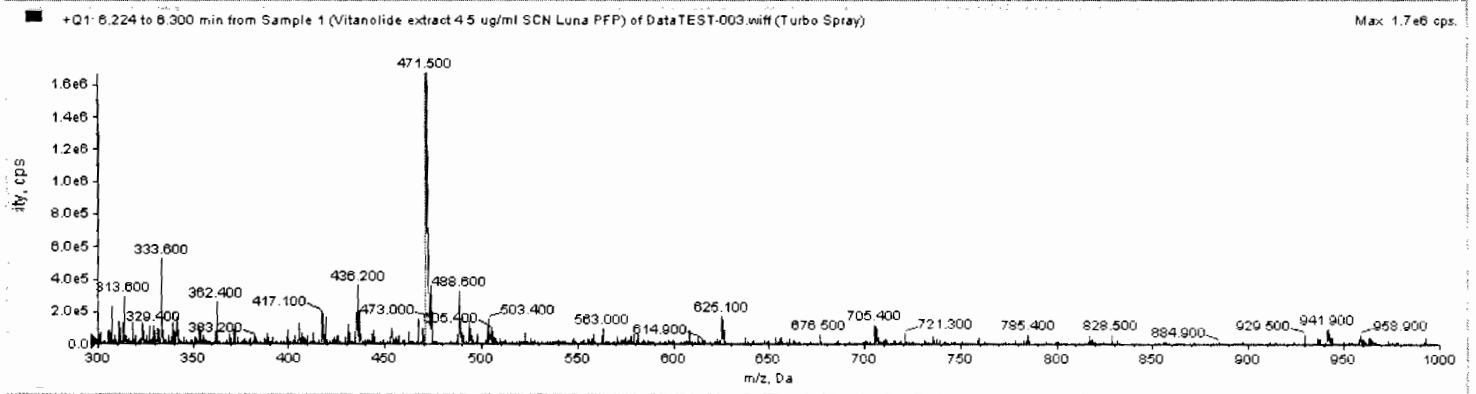
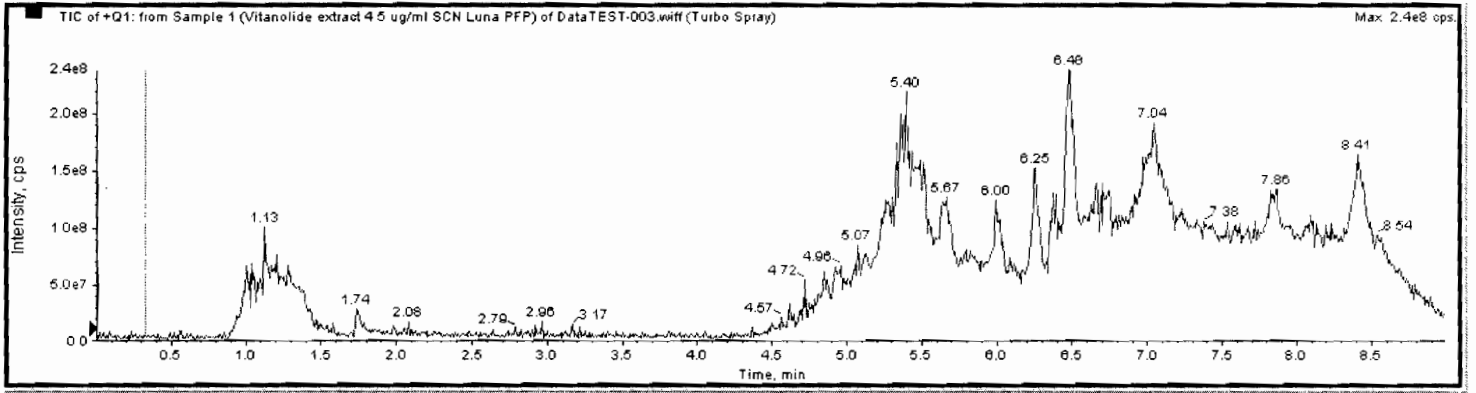


Fig 2.

Handwritten signatures and notes:
Jabal Jij
Macedo
Lopez
Hoo

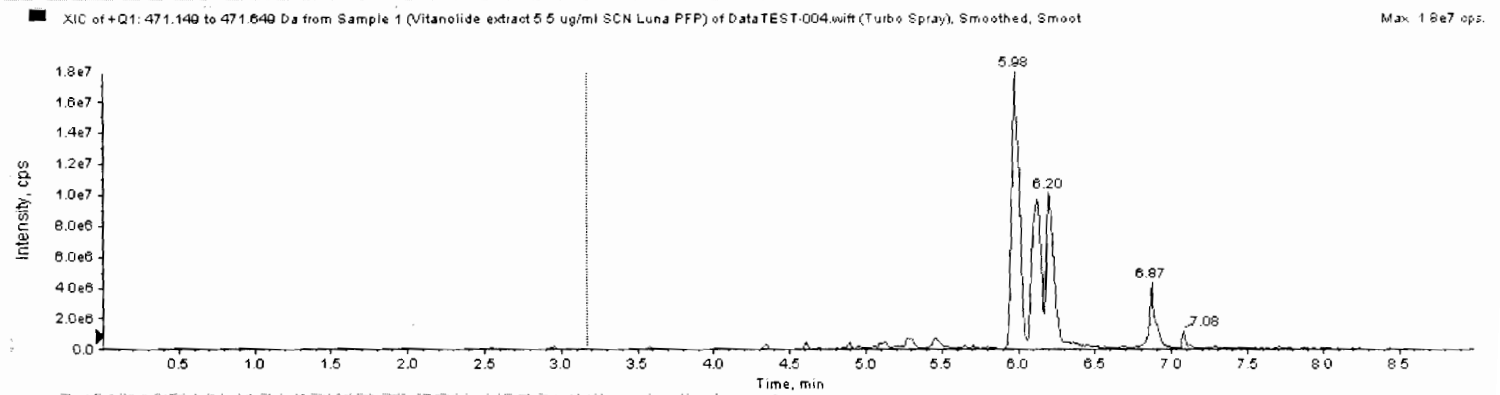
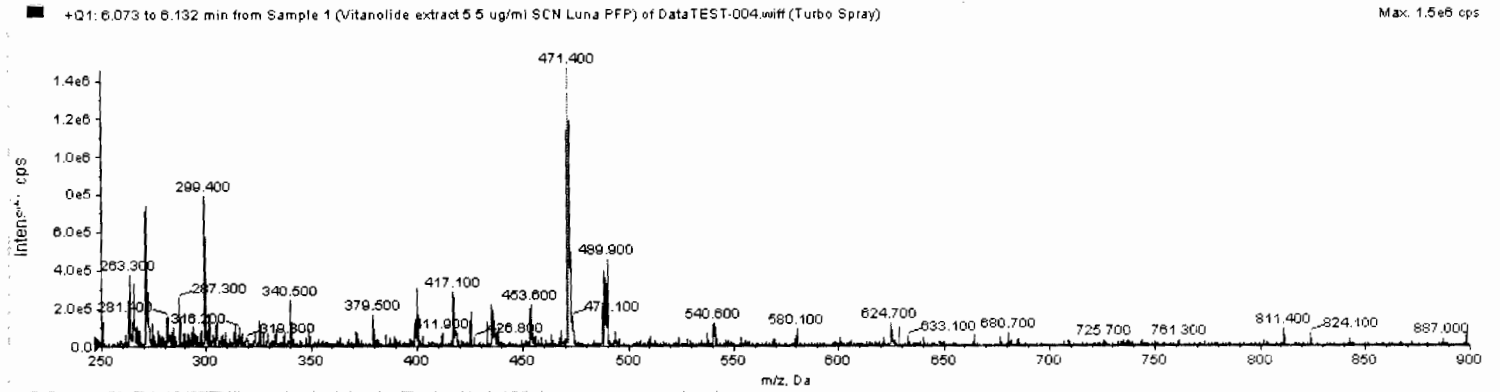
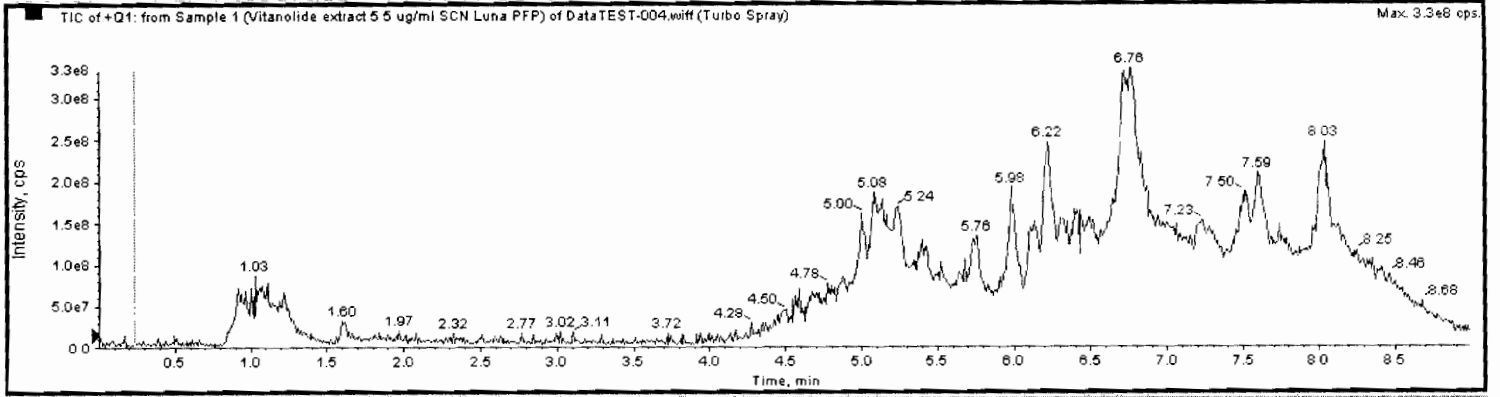


Fig 3.

Jabell
 Altman
 [Signature] → [Signature] → [Signature]
 [Signature] [Signature] [Signature]

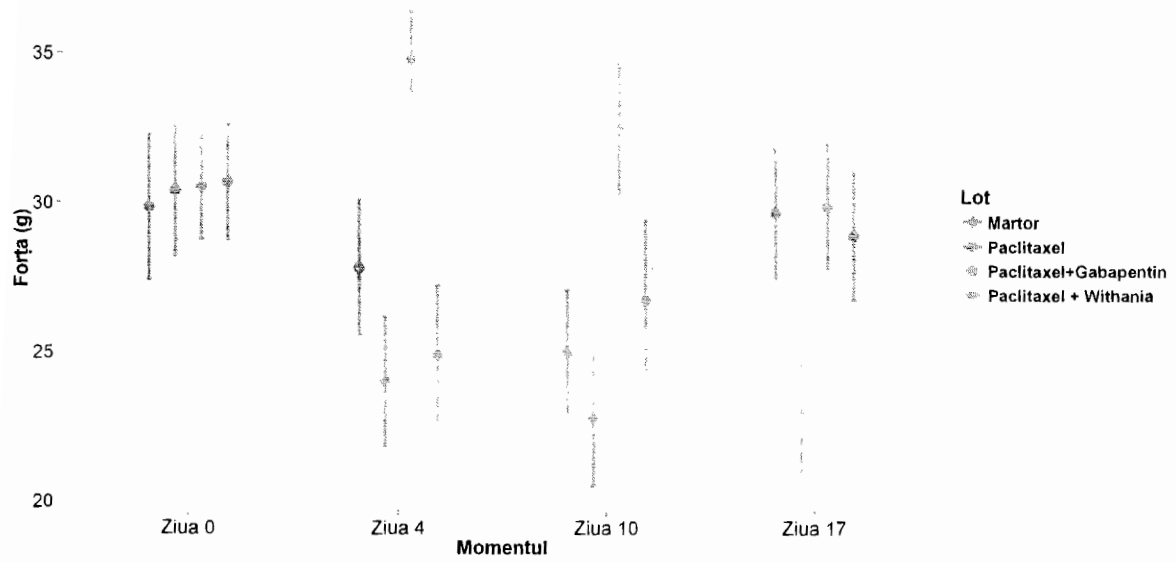


Fig. 5

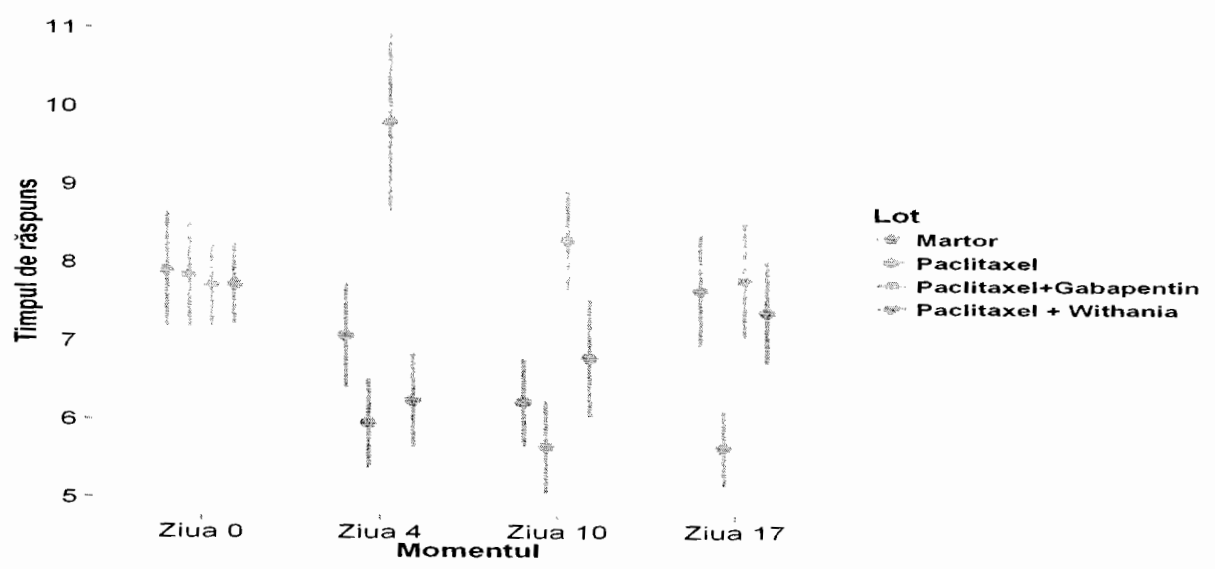


Fig. 6

Tabell A
K
Schlager
Karl-Franz-Universität Wien

