



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00285

(22) Data de depozit: 21/04/2016

(41) Data publicării cererii:  
30/10/2017 BOPI nr. 10/2017

(71) Solicitant:  
• DACIA PLANT S.R.L., STR. HARMANULUI  
FN, BOD, BV, RO

(72) Inventatori:  
• IANTA CĂLIN IOAN, STR. CEAHLĂU  
NR. 36, BRAȘOV, BV, RO;  
• BOBIT MARIA DANA, STR. FĂNTĂNIȚEI  
NR. 15, BRAȘOV, BV, RO;  
• IONIȚĂ LUCIAN, STR. MICȘUNELELOR  
BR. 318A, COMUNA  
DRAGOMIREȘTI-VALE, IF, RO;  
• IONIȚĂ CARMEN, STR. MICȘUNELELOR  
NR. 318A, COMUNA DRAGOMIREȘTI  
-VALE, IF, RO;  
• GRIGORE ALICE, BD. UVERTURII NR. 43,  
BL. 1, SC.4, ET. 2, AP. 131, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• PIRVU LUCIA CAMELIA, STR. BACIA  
NR. 11A, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;

• COLCERU-MIHUL SVETLANA,  
STR. RĂMNICU SĂRAT 29, BL. 11A1,  
AP. 42, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• BUBUEANU CORINA, STR. CERNIȘOARA  
NR. 43, BL. 012, SC. A, AP. 19, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• DOBRE NICOLETA, ALEEA IANCA NR. 2,  
BL. V18, SC. 2, AP. 64, BUCUREȘTI, B, RO;  
• PANTELI MINERVA,  
STR. SPĂȚAR NICOLAE MILESCU  
NR.46-48, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• VULTURESCU VIRGINIA,  
STR. PRELUNGIREA GHENCEA NR. 28,  
BL. C5, SC. C, ET. 8, AP. 110, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MATEI FLORENTINA, STR. 23 AUGUST  
NR. 9, BL. U4, SC. 3, AP. 22, OTOPENI, IF,  
RO;  
• TĂNASE ANDREI,  
STR. AV. TRAIAN VASILE NR. 37,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• DIGUȚA CAMELIA,  
STR. TÂRGU DIN VALE NR. 68, BL. P20,  
SC. C, AP. 1, PITEȘTI, AG, RO

(54) HELSTIM

(57) Rezumat:

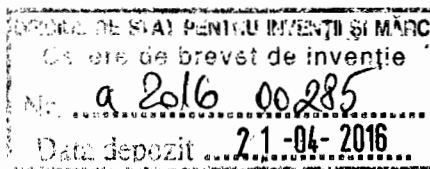
Invenția se referă la un produs fitoterapeutic imunostimulator de uz veterinar și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Produsul conform invenției este constituit din extract de *Hellebori radix* de concentrație 1 mg/ml de culoare galbenă, cu gust amar și miros caracteristic. Procedeu conform invenției constă în amestecarea materialului vegetal cu alcool etilic concentrat, macerarea amestecului timp de 10 zile la temperatura

camerei, filtrarea și concentrarea soluției extractive rezultate la presiune redusă, de 150 mmHg, și temperatura de maximum 50°C, după care reziduul este preluat în propilenglicol, rezultând extractul de concentrație 1 mg/ml.

Revendicări: 2

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





### b) Domeniul tehnic la care se referă invenția

Invenția se referă la realizarea unui produs fitoterapeutic injectabil, cu efect imunomodulator de uz veterinar și la procedeul de fabricare al acestuia prin extracția principiilor active din rădăcina plantei *Helleborus*.

### c) Stadiul tehnicii

Este cunoscut că genul *Helleborus* conține heterozide cardiotonice bufadienolidice (helebrozida = helebrina și desglucohelebrozida), săponozide sterolice (heleborina), protoanemonina (lactona hemiterpenică instabilă care se dimerizează transformându-se în anemonina (netoxică) în timpul uscării) ([http://www.plante-medicinale.ro/pm/fisa\\_planta.php](http://www.plante-medicinale.ro/pm/fisa_planta.php)) și cantități importante de ecdisteroizi, o clasă de compuși înrudiți cu steroizii polihidroxilați (Baltaev U., *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, 26(12), p. 799-831).

Este cunoscut că efectul imunostimulator al *H. purpurascens* a fost semnalat la oaie; creșterea numărului de limfocite (2x) și neutrofile (3.5x) la 48 de ore de la injectarea cu 5% decoct de rădăcini și rizomi a arătat îmbunătățirea răspunsului imun la aceste animale (Nueleanu, 2008). Activarea rapidă și nespecifică a mecanismelor de apărare (leucocitoză pronunțată și creșterea procentului de neutrofile) a fost raportată după administrarea subcutanată, intraperitoneală și intramusculară a unor concentrații diferite de extract de *H. odorus* (Davidović et al., 2012).

În medicina veterinară empirică, rădăcinile și rizomii de *Helleborus* sp. implantați în pielea animalelor sau ureche erau considerate un fel de panaceu; această tradiție are o justificare științifică deoarece planta produce hiperleucocitoză și, indirect, un efect benefic în multe afecțiuni. În terapia umană se administrează produsul Boicil bazat pe extracte de *Helleborus* sp. în formă de soluție injectabilă sau unguent cu acțiune miorelaxantă și antalgică (brevet FR2333514 (A1) — 1977-07-01).

Diverse specii de *Helleborus* sunt utilizate în tratamentul anti-cancer așa cum este descris în brevetele GR1008552 (B) — 2015-09-03 (pulbere de *Helleborus odorus* Waldst. & Kit, subsp. *cyclophyllus* (a. Braun) Maire & Petitm.), RO128610 (A2) —

2013-07-30 (extracte concentrate de *Geranium robertianum* and *Helleborus purpurascens*).

Imunomodulatoare de origine vegetala fac subiectul unor cereri de brevet, dupa cum urmeaza.

Brevetul JPH083052 (A) — 1996-01-09 descrie obtinerea unui imunomodulator de origine vegetala – esenta de *Ampelopsis brevipedunculata* Trautv care poate fi administrata oral, intrarectal, local or parenteral.

De asemenea, brevetul US2011092585 (A1) — 2011-04-21 descrie o compozitie farmaceutica imunomodulatoare bazata pe cumarinolignoizi izolati din seminte de *Cleome viscosa* capabili sa moduleze raspunsul imun umoral si celular.

Brevetul US2005202041 (A1) — 2005-09-15 descrie un extract adjuvant/ imunomodulator izolat din pielita de alune util in prepararea compozitiilor imunogene si a vaccinurilor.

#### **d) Prezentarea problemei tehnice**

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in realizarea produsului farmaceutic imunomodulator inovativ de uz veterinar, bazat pe principii active de natura vegetala, eficient atat in profilaxie cat si in terapie. Elaborarea unui astfel de produs destinat animalelor de ferma cat si a celor de companie contribuie la stimularea industriei locale, reducand importurile si, indirect, are rol in asigurarea sigurantei alimentare si a calitatii vietii.

Preparatele utilizate in prezent nu sunt standardizate sau sunt insuficient caracterizate din punct de vedere analitic iar compusii sintetici sunt de multe ori toxici. Desi in terapia veterinara se utilizeaza produse fitoterapeutice de uz uman, aceasta modalitate nu este sigura, in special in cazul animalelor de interes economic deoarece lipsesc studiile privind toxicitatea, efectul farmacologic, efectele secundare, remanenta reziduurilor pe specia respectiva, cunoscand fiind faptul ca patologia veterinara prezinta diferente importante comparativ cu cea umana.

### e) Expunerea invenției

Produsul imunomodulator de uz veterinar conform invenției este constituit din extract de Hellebori radix de concentrație 1mg/mL, sub forma de soluție injectabilă opacă, de culoare galbenă, cu gust amar și miros caracteristic conținând 264.95mg%  $\beta$ -ecdison și 63.97mg% acid cafeic.

#### **Testări farmaco-toxicologice pentru evidențierea siguranței și eficacității produsului imunomodulator**

Produsul fitoterapeutic Helstim testat sub aspectul toxicității după doză unică, administrat pe cale subcutanată la șobolani Wistar, în doză unică de 50 mg/kgc nu a indus letalitate sau fenomene neurotoxice la animalele tratate. Concentrația maximă administrată de 250 mg/kgc nu a provocat letalitate dar a indus fenomene de neurotoxicitate cu modificarea motilității, a reflexelor posturale și semne de afectare a reflexelor medulare somatice. Tulburările s-au remis după circa 2 ore de la apariție.

Administrarea extractului produsului în diferite concentrații (7-500 $\mu$ g/ml) asupra culturii de celule tumorale Jurkat a condus la scăderea drastică a viabilității culturii (sub 20%) atât la 24 cât și la 48 de ore de la administrare. Substanța de referință, 5-fluorouracil a demonstrat o evoluție mai lentă, viabilitatea scăzând de la 30% la 24 de ore de tratament la cca. 10% (comparativ cu produsul fitoterapeutic) la 48h.

Efectul imunomodulator a fost evidențiat preclinic pe un model experimental de imunodepresie indusă cu dexametazonă la șobolani Wistar. Raportul neutrofile/limfocite utilizat în evaluarea statusului imun și inflamator a evidențiat că loturile tratate cu 12,5mg/kgc produs imunomodulator au prezentat valori superioare lotului tratat exclusiv cu dexametazonă, semn al stimulării imunitare în contextul imunodepresiei induse, efect comparabil tratamentului cu levamisol după aceeași schemă de administrare, subcutanat, în două prize la interval de 24 ore.

Testele clinice au fost efectuate pe vaci la 14-15 zile după fătare, cu evaluarea parametrilor hematologici și imunologici înainte de administrarea subcutanată a produsului, la 24 de ore, 5, 8 și 14 zile după administrare. La 24 de ore după administrarea a 1mL (1mg/mL) produs imunomodulator este indusă inversarea raportului limfocite B/limfocite T cu activarea clonelor de limfocite B, în corelare cu

cresterea functiei fagocitare a neutrofilelor. Leucocitoza aparuta la 24 de ore este mentinuta timp de 14 zile de la administrare.

#### **f) Avantaje**

- Se diversifica gama de produse cu actiune imunomodulatoare de uz veterinar cu un produs natural, de origine vegetala
- Produsul are o toxicitate redusa
- Se utilizeaza o materie prima vegetala accesibila, plantele fiind obtinute din cultura
- Tehnologia are un numar redus de faze
- Tehnologia este nepoluanta, nu rezulta deseuri toxice sau ape reziduale

#### **h) Mod de realizare**

Intr-un vas de inox de capacitate 250L prevazut cu gura de alimentare, stut de evacuare si sistem de agitare se introduc 7,5 kg material vegetal Hellebori radix si 75L alcool etilic concentrat. Se macereaza amestecul timp de 10 zile la temperatura camerei cu agitare ocazionala. Solutia extractiva se filtreaza prin stutul de evacuare. Se obtin 67,5L solutie extractiva care se concentreaza la presiune redusa (150mm Hg) si temperatura de max. 50°C pana la eliminarea alcoolului. Se obtin 1,01 kg de reziduu spiss de culoare galben-brun care se reia in 9,9L propilenglicol pentru a obtine o concentratie de 1mg/mL a produsului fitoterapeutic.

Produsul imunomodulator de concentratie 1mg/mL se prezinta sub forma de solutie opaca de culoare galbena, cu gust amar si miros caracteristic continand 264.95mg%  $\beta$ -ecdison si 63.97mg% acid cafeic.

#### **i) Aplicabilitate industrială**

Inventia poate fi aplicata in industria farmaceutica veterinara, pentru productia de solutii injectabile cu efect imunomodulator prelungit care sa nu mai prezinte efectele adverse ale substantelor chimice si sa aiba un continut maxim de substanta activa.

**REVENDICARE 1**

Produs fitoterapeutic imunomodulator de uz veterinar realizat integral din plante medicinale, caracterizat prin aceea ca este constituit din extract de Hellebori radix de concentratie 1mg/mL, sub forma de solutie injectabila opaca, de culoare galbena, cu gust amar si miros caracteristic continand 264.95mg%  $\beta$ -ecdison si 63.97mg% acid cafeic.

**REVEDICARE 2**

Procedeu de obtinere a unui produs imunomodulator de uz veterinar realizat integral din plante medicinale caracterizat prin aceea ca se amesteca 7,5 kg material vegetal Hellebori radix cu 75L alcool etilic concentrat, macerarea amestecului timp de 10 zile la temperatura camerei cu agitare ocazionala; filtrarea solutiei extractive prin stutul de evacuare, concentrarea a 67,5L solutie extractiva rezultata la presiune redusa (150mm Hg) si temperatura de max. 50°C pana la eliminarea alcoolului, obtinandu-se 1,01 kg de reziduu spiss de culoare galben-brun care se reia in 9,9L propilenglicol pentru a realiza o concentratie de 1mg/mL a produsului fitoterapeutic.