



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00718

(22) Data de depozit: 25/09/2018

(41) Data publicării cererii:
30/03/2020 BOPI nr. 3/2020

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE
CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF
BUCUREȘTI, CALEA VITAN NR.112,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• HLEVCA CRISTINA, STR. LIZEANU
NR. 19, ET. II, AP. 4, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;

• NEAGU GEORGETA,
STR.MUNȚII MEHEDINȚI, NR.4, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• PĂVĂLOIU RAMONA DANIELA,
ALEEA BARAJULUI BICAZ, NR.11B, BL.M
32B, SC.1, ET.7, AP.86, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• PÎRVU LUCIA CAMELIA, STR.BĂCIA
NR.11 A, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• SHA ' AT FAWZIA,
STR.LIVIU REBREANU, NR.5, BL.52, SC.2,
ET.3, AP.58, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **EXTRACT SELECTIV DE FRUNZE DE FAGUS SYLVATICA L.
CU EFECT DE POTENȚARE A ACTIVITĂȚII ANTITUMORALE
A IRINOTECANULUI**

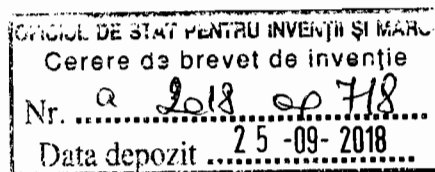
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui extract selectiv de frunze de *Fagus sylvatica* L. (fag), cu efect de potențare a activității antitumorale a irinotecanului pe linii celulare tumorale. Procedeu conform invenției constă în extracția materialului vegetal constituit din frunze de fag cu apă, timp de 1 h la temperatura de reflux a amestecului, după care se separă masa vegetală prin filtrare, și se concentrează la rotavapor; în continuare la 100 ml extract apos concentrat se adaugă 400 ml alcool etilic 96%, suspensia se separă prin

filtrare la vid, extractul hidroalcoolic se dozează în ceea ce privește conținutul în polifenoli totali exprimat în acid galic GAE per ml de extract, după care se concentrează la reziduu, care se reia în alcool etilic 20%, rezultând un extract standardizat cu un conținut în polifenoli totali exprimați în acid galic de 5 mg GAE/ml extract.

Revendicări: 1
Figuri: 3





EXTRACT SELECTIV DE FRUNZE DE *FAGUS SYLVATICA* L. CU EFECT DE POTENȚARE A ACTIVITĂȚII ANTITUMORALE A IRINOTECANULUI.

Invenția se referă la un extract selectiv, standardizat de frunze de fag (*Fagus sylvatica L. folium*) cu activitate antitumorală și cu acțiune de potențare a activității antitumorale a irinotecanului pe linia celulară de neuroblastom uman SH-SY5Y.

Este cunoscut faptul că deși în ultimile decade s-au înregistrat progrese în detectarea timpurie a cancerului și îmbunătățirea terapiei standard (chirurgie, terapie cu radiații și chimioterapie) durata de supraviețuire după tratament este limitată (1). Încă de la introducerea ei în terapie chimioterapie a prezentat o serie de dezavantaje esențiale care n-au fost rezolvate nici în prezent(1); 1) toxicitatea ridicată a tratamentului pentru celulele normale 2)rezistența la tratament, 3)incapacitatea eradicării complete a tumorilor.(2,3). Aceste dezavantaje au fost parțial rezolvate prin introducerea în tratamentele oncologice a terapiei combinate.

Este cunoscut faptul că o îmbunătățire considerabilă a chimioterapiei s-a realizat în ultimii ani prin introducerea în terapia standard a cancerului a tratamentelor cu combinații de medicamente. Schimbarea paradigmei de la terapia cu un singur medicament la terapia cu mai multe medicamente a fost posibilă datorită cercetărilor avansate efectuate în patofiziologia bolilor cronice și grave care au demonstrat că aceste boli sunt multifactoriale și de aceea necesită tratamente care acționează pe mai multe căi, deci necesită tratamente combinate.(4-7) Este cunoscut faptul că, carcinogeneza este un proces în mai multe etape care prezintă dereglări în mai multe căi de semnalizare celulară. De aceea utilizarea unor medicamente care au ca țintă o singură cale de semnalizare este de multe ori inefficientă. În ultimii ani în tratamentul standard al cancerului se utilizează o combinație de 2 sau mai multe medicamente ceea ce a dus la o creșterea a eficienței tratamentului deoarece prin țintirea mai multor căi de semnalizare celulară simultan se obține un efect aditiv sau sinergic și are loc și o micșorare a rezistenței la medicamente (8).

Deși utilizarea combinată a mai multor agenți antitumorali cu diferite mecanisme de acțiune s-a dovedit mai eficientă apare dezavantajul unei toxicități mărite. O modalitate de a depăși acest dezavantaj este de a utiliza în tratamentele oncologice substanțe active de origine vegetală sau extracte vegetale cu activitate antitumorală în combinație cu chimioterapicele standard. Studiile efectuate în ultimii ani atât în *vitro* cât și în *vivo* au demonstrat că numeroși metaboliți ai plantelor nu sunt numai agenți chemopreventivi (nu numai că reduc riscul de a dezvolta diverse tipuri de cancer) dar reprimă proliferarea celulelor tumorale, inhibă căile de semnalizare ai factorilor de creștere, induc apoptoza, inhibă angiogeneza, reprimă exprimarea proteinelor antiapoptotice, inhibă ciclooxygenaza-2, etc.(9,10)

În tratamentele bazate pe medicamente din plante se consideră că eficiența utilizării lor se datorează acțiunii sinergetice a mai multor constituenți în doze mici. Toxicitatea lor este redusă datorită dozelor mici în care acționează. Pornind de la aceste date a apărut și ideea combinării în diverse tratamente de produși naturali cu medicamente de sinteză în speranța găsirii unor combinații sinergice cu eficientizarea tratamentului și cu toxicitate mai scăzută. În cazul cancerului în numeroase lucrări s-a demonstrat efectul de potențare a activității agenților chimioterapeutici prin combinarea cu diverși compuși naturali.(6)

Este cunoscut faptul că extractul metanolic de *Fagus sylvatica L. folium* are activitate antiproliferativă pe o serie de linii celulare tumorale de cancer de colon LoVo uman, cancer de prostată PC3 și glioblastom U373.(11)

În acest context, problema pe care o rezolvă invenția este că extractul selectiv, standardizat de *Fagus sylvatica* conform invenției, este netoxic și potențează activitatea antitumorală a irinotecanului pe linia celulară umană de neuroblastom SH-SY5Y și poate fi astfel folosit pentru obținerea unui nou agent antitumoral, ce combină irinotecanul și extractul de *Fagus sylvatica*, **cu activitate specifică superioară irinotecanului și farmacotoxicologie asemănătoare irinotecanului.**

Extractul vegetal standardizat de *Fagus sylvatica*, conform invenției, constă în aceea că se obține

prin extracție cu apă, la temperatura de reflux, timp de 1h, din *frunze de fag*, după care se face filtrarea și concentrarea extractului apos până la un volum de 10 ori mai mic, după care la 1 volum extract apos, concentrat se adaugă 4 volume de alcool etilic 96% v/v, și se filtrează suspensia hidroalcoolică prin filtru de porozitate medie, la vid obținându-se un extract selectiv hidroalcolic brut de fag, pentru care se face dozarea conținutului în polifenoli totali (GAE) per mL extract, urmată de concentrarea soluției rezultate la presiune redusă până la stadiul de extract uscat, extract uscat care în final se reia cu alcool etilic 20 %(v/v) astfel încât să se obțină un extract selectiv, standardizat cu un conținut în polifenoli totali exprimați în acid galic de 5 mg GAE/mL extract.

Procedul de obținere a extractului vegetal standardizat de *Fagus sylvatica* cu acțiune de potențare a activității antitumorale a irinotecanului, constă în aceea că se supun extracției 100 g de material vegetal constituit din frunze de fag cu 1000 ml apă, timp de 1 oră la temperatura de reflux a amestecului, după care se separă de masa vegetală prin filtrare și se concentrează până la 100 ml la rotavapor. În continuare, la 100 ml volum de extract apos concentrat se adaugă 400 ml de alcool etilic 96% (v/v), iar suspensia obținută se separă prin filtrare la vid (filtru de porozitate medie). Cei 500 ml extract hidroalcoolic se dozează în ceea ce privește conținutul în polifenoli totali exprimați în acid galic (GAE) per mL extract, după care se concentrează la reziduu, iar reziduuul se reia în alcool etilic 20 %(v/v) astfel încât să se obțină un extract standardizat cu un conținut în polifenoli totali exprimați în acid galic de 5 mg GAE/mL extract.

Principalele caracteristici ale extractului vegetal de *Fagus sylvatica* conform invenției sunt:

1. Are un conținut bogat în polifenoli; studiile HPTLC asupra extractului selectiv în etanol 20% din frunze de fag au indicat prezența a cel puțin 13 compuși polifenolici foarte activi, derivați ai acidului clorogenic (s1, s3, s6, s9, s11), derivați ai apigeninei (s7, s1 și s12), plus kempferol (s4), apigenină și quercetin (spotul din regiunea de Front a cromatogramei) - vezi **Figura 1**. Acești polifenoli, conform datelor de literatură, au activitate antiproliferativă pe diferite linii celulare și acționează pe mai multe căi

de semnalizare celulară (8).

2. Este lipsit de toxicitate până la o concentrație de 100 µg/mL pe celule de fibroblaste murine 3T3, adică o concentrație de 10 ori mai mare decât concentrația activă de 10 µg/mL evidențiată pe celule umane de neuroblastom SH-SY5Y - vezi **Figura 2**.

3. Prezintă activitatea antiproliferativă evidențiată pe celule umane de neuroblastom SH-SY5Y- vezi **Figura 3**.

4. Are efect de mărire a activității antiproliferative a irinotecanului evidențiat pe celule umane de neuroblastom SH-SY5Y - vezi **Figura 3**.

Avantajele invenției

1. Extractul vegetal de *Fagus sylvatica*, conform invenției, are efect de mărire a activității antiproliferative a irinotecanului evidențiat pe linia celulară umană de neuroblastom SH-SY5Y.

2. Prin combinarea irinotecanului cu extractul de *Fagus sylvatica L. folium* se poate obține un nou agent antitumoral cu activitate specifică superioară irinotecanului și cu activitate farmacotoxicologică comparabilă cu a irinotecanului.

Prezentăm mai jos un exemplu de aplicare a procedurii de obținere a extractului de *Fagus sylvatica L. folium*, conform invenției.

Exemplu 1

100 g de material vegetal constituit din frunze de fag, se supun extracției cu 1000 ml apă, timp de 1 oră, la temperatura de reflux a amestecului, după care se separă de masa vegetală prin filtrare și se concentrează până la 100 mL la rotavapor. În continuare, la 100 ml volum de extract apos concentrat se adaugă 400 mL de alcool etilic 96% (v/v), iar suspensia obținută se separă prin filtrare la vid (filtru de porozitate medie). Cei 500 ml extract hidroalcoolic se dozează în ceea ce privește conținutul în polifenoli totali exprimați în acid galic (GAE) per mL extract, rezultând o concentrație de 1,29 mg GAE/ml. după care se concentrează la reziduu, iar reziduuul se reia în alcool etilic 20 %(v/v) astfel

încât să se obțină un extract standardizat cu un conținut în polifenoli totali exprimați în acid galic de 5 mg GAE/mL extract. Din 500 ml extract de concentrație 1,29 mg GAE/ml se obțin $500 \times 1,29 : 5 = 129$ ml extract selectiv, standardizat de fag conținând 5 mg GAE/ml în soluție hidroalcoolică 20%.

Extractul de frunze de fag astfel obținut a fost testat privind activitatea antiproliferativă precum și privind efectul de potențare al activității antiproliferative a irinotecanului pe linia celulară umană de neuroblastom SH-SY5Y, prin metoda RTCA (fig.3)

BIBLIOGRAFIE

- 1.Lewandowska, U., Gorlach, S., Owczarek, K., Hrabec, E., Szewczyk, K., Synergistic Interactions Between Anticancer Chemotherapeutics and Phenolic Compounds and Anticancer Synergy Between Polyphenols, *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 68, 528-540, 2014
- 2.Drabu, S., Khatri, S., Babu, S., Verma, D., Nanotechnology: an introduction to future drug delivery system. *J. Chem. Pharm. Res.* 2(1), 171–179, 2010.
3. Sak K., Chemotherapy and Dietary Phytochemical Agents, *Chemotherapy Research and Practice*, Volume 2012, Article ID 282570, 11 pages, doi:10.1155/2012/282570, 2012
- 4.Yang Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X., He, K., Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis, *Fitoterapia*, volum 92, (1) 133–147, 2014
- 5.Wink, M., Ashour, M.L., Zaki El-Readi, M., Secondary metabolites from plants inhibiting ABC transporters and reversing resistance of cancer cells and microbes to cytotoxic and antimicrobial agents *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-15, 2012
- 6.Ulrich-Merzenich, G.S., Combination screening of synthetic drugs and plant derived natural products—Potential and challenges for drug development, *Synergy*, 1, 59-69, 2014
7. Biavatti, M.W., Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 45, (3), 371-378, 2009

8. Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli L., Frajese, G.V., Tresoldi, I., Modesti, A. and Bei, R., *In Vitro* and *in Vivo* Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment, *Int. J. Mol. Sci.* 16, 9236-9282, 2015
9. Qurishi, Y., Hamid, A., Majeed, R., Hussain, A., Qazi, A.K., Ahmed, M., Zargar, M.A., Singh, S.K. and Saxena, A.K., Interaction of natural products with cell survival and signaling pathways in the biochemical elucidation of drug targets in cancer, *Future Oncol.* 7(8), 1007-1021, 2011
10. Rajput, S., Mandal, M, Antitumor promoting potential of selected phytochemicals derived from spices: a review, *European Journal of Cancer Prevention* , 21(2), 205-215, 2012
11. Frédérich, M., Marcowycz, A., Cieckiewicz, E., Mégalizzi, V., Angenot, L., Kiss, R., *In Vitro* Anticancer Potential of Tree Extracts from the Walloon Region Forest, *Planta Med* 75, 1-4, 2009

REVENDICĂRI

1. Activitatea de potențare a extractului selectiv, standardizat de *Fagus sylvatica L. folium*, caracterizat prin aceea că se obține prin extracția materiei prime vegetale, frunze de fag, în apă, în raport de 1:10, 1 oră la temperatura de reflux a amestecului de extracție, urmată de filtrarea și concentrarea extractului apos până la un volum de 10 ori mai mic. În continuare, la un (1) volum de extract apos concentrat se adaugă 4 volume de alcool etilic 96% (v/v), iar suspensia obținută se separă prin filtrare la vid (filtru de porozitate medie). Filtratul se dozează în ceea ce privește conținutul în polifenoli totali exprimați în acid galic (GAE) per mL extract, după care se concentrează la reziduu, iar reziduuul se reia în alcool etilic 20 %(v/v) astfel încât să se obțină un extract standardizat cu un conținut în polifenoli totali exprimați în acid galic de 5 mg GAE/mL extract, asupra activității antitumorale a irinotecanului, demonstrată pe linia celulară tumorală de neuroblastom SH-SY5Y, și care poate fi astfel folosit în combinație cu irinotecanul pentru obținerea unor noi agenți antitumorali.

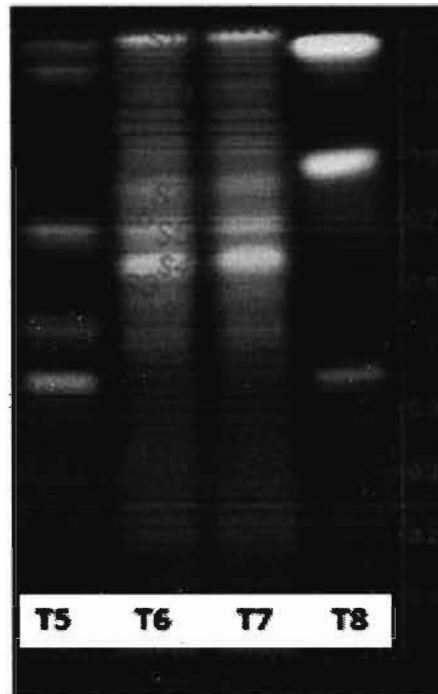


Figura 1. Aspectul (HP)TLC al extractului alcoolic din frunze de fag, *Fagus sylvatica* L. (T6-T7) comparativ cu substantele de referinta (T5, T8).

Tracks : T5– rutin, acid clorogenic, apigenin-7-O-apiozilglucozida/apiin, hiperozidă, apigenin; T8– rutin, vitexin-2''-O-rhamnoside, luteolin-7-O-glucoside, quercitrin, quercetin

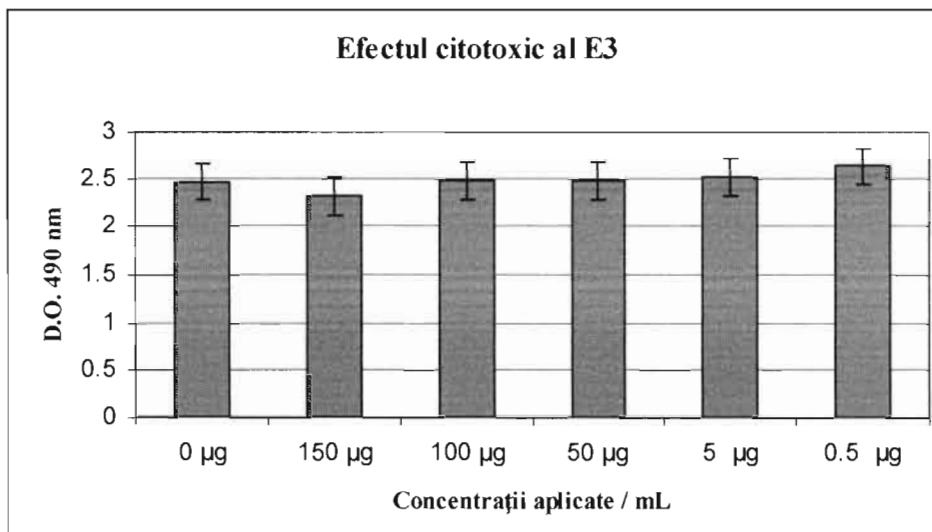


Fig.nr. 2. Rezultate obtinute la testul MTS de viabilitatea celulară (linia celulara normala de fibroblaste murine 3T3) în prezența extractului de *Fagus sylvatica* L. (E3)

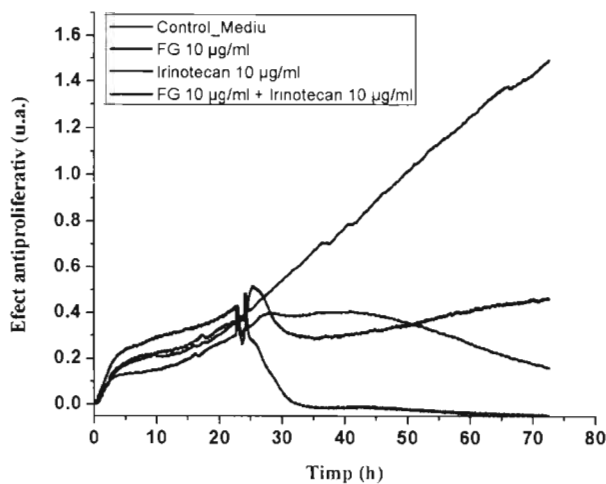


Fig.nr. 3. Activitatea antiproliferativă pe durata de 72h pentru celule SH-SY5Y incubate cu extract FG (*Fagus sylvatica*) 10 µg/mL, irinotecan 10 µg/mL și mixul irinotecan 10 µg/mL - extract vegetal 10 µg/mL.