



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00725

(22) Data de depozit: 26/09/2018

(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.M32B, SC.1, ET.7, AP.86, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• PIRVU LUCIA CAMELIA, STR. BACIA
NR. 11A, 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 JUGLANS REGIA L.
CU EFECT DE POTENȚARE A ACTIVITĂȚII ANTITUMORALE
A IRINOTECANULUI**

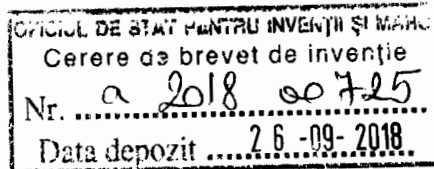
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui extract selectiv de frunze de *Juglans Regia L* (nuc), 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 nuc cu apă, timp de 1 h, la temperatura de reflux a amestecului, se separă masa vegetală prin filtrare, și se concentrează la rota vapor, în continuare la 1000 ml extract apos concentrat se adaugă 400 ml alcool etilic 96%, suspensia se separă prin

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

Revendicări: 1
Figuri: 3





**EXTRACT SELECTIV DE FRUNZE DE *JUGLANS REGIA L.* CU EFECT DE POTENȚARE A
ACTIVITĂȚII ANTITUMORALE A IRINOTECANULUI.**

AUTORI: Hlevca Cristina, Neagu Georgeta, Păvăloiu Ramona Daniela, Pîrvu Lucia Camelia,

Sha'at Fawzia

Invenția se referă la un extract selectiv, standardizat de frunze de nuc (*Juglans regia 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 terapii 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

duș 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 ciclooxigenaza-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 extractele în metanol, eter de petrol și hexan din frunze de nuc au efect antiproliferativ pe o serie de linii celulare tumorale: liniile celulare umane de cancer de rinichi A-498 și 769-P, linia celulară de cancer de colon Caco-2 (11), linia celulară umană de cancer de prostată PC3 (12), linia celulară de carcinom scuamos oral uman (BHY), linia celulară de adenocarcinom de colon (HT-29) și linia celulară de adenocarcinom mamar (MCF7) (13).

În acest context, problema pe care o rezolvă invenția este că extractul selectiv, standardizat de *Juglans regia* 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 *Juglans regia*, **cu activitate specifică superioară irinotecanului și farmacotoxicologie asemănătoare irinotecanului.**

Extractul vegetal standardizat de *Juglans regia*, conform invenției, constă în aceea că se obține prin extracție cu apă, la temperatura de reflux, timp de 1h, din frunze de nuc, 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 nuc, 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.

Procedeele de obținere a extractului vegetal standardizat de *Juglans regia* 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 nuc 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 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 *Juglans regia* conform invenției sunt:

1. Are un conținut bogat în polifenoli; studiile HPTLC asupra extractului selectiv în etanol 20% din frunze de nuc au indicat un număr de cel puțin patru derivați ai quercetinului, respectiv hiperozida (S3),

izoquercitrin (S5), avicularin (S6) și quercitrin (S7), doi derivați de apigenină, izovitexin (S4) și juglanin (S8), precum și doi derivați ai acidului cafeic, acidul clorogenic (S1) și acidul neoclorogenic (S2) plus acid protocatecuic (S9), în acord cu datele de literatură pentru această materie primă vegetală. - 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. În cazul extractului obținut din *Juglans regia L.*, indicele de viabilitate celulară prezintă variații mici în funcție de doza de expunere, extractul vegetal având efect citoprotector la toate concentrațiile utilizate pe celule umane de fibroblaste murine 3T3, deci nu este toxic până la concentrații de cel puțin 15 ori mai mari decât concentrația de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – concentrația activă pe celule tumorale 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 *Juglans regia*, 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 *Juglans regia L. folium* se poate obține un nou agent antitumoral cu activitate specifică superioară irinotecanului și toxicitate comparabilă cu a irinotecanului.

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

Exemplu 1

100 g de material vegetal constituit din frunze de nuc, 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 1,66 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 1,66 mg GAE/mL se obțin $500 \times 1,66 : 5 = 166$ mL extract selectiv, standardizat de nuc conținând 5 mg GAE/mL în soluție hidroalcoolică 20%.

Extractul de frunze de nuc 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 (vezi **Figura 3**).

BIBLIOGRAFIE

- 1.Lewandowska, U., Gorchach, 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 extract on the 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 agent *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 *Centella asiatica* a review, *European Journal of Cancer Prevention*, 21(2), 205-215, 2012
11. Carvalho, M., Ferreira, P.J., Mendes, V.S., Silva, R., Pereira, J.A., Jerónimo, C., Silva, B.M., Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L., *Food and Chemical Toxicology*, 48, 441–447, 2010.
12. Li, W., Li, D.Y., Wang, H.D., Zheng, Z.J., Hu J., Li, Z.Z., *Juglans regia* Hexane Extract Exerts Antitumor Effect, Apoptosis Induction and Cell Cycle Arrest in Prostate Cancer Cells *In vitro*, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14 (3), 399-405, 2015
13. Salimi, M., Majd, A., Sepahdar, Z., Azadmanesh, K., Irian, S., Ardestaniyan, M.H., Hedayati, M.H. and Rastkari N., Cytotoxicity effects of various *Juglans regia* (walnut) leaf extracts in human cancer cell lines, *Pharmaceutical Biology*, 50(11), 1416-22, 2012

REVEDICĂRI

1. Activitatea de potențare a extractului selectiv, standardizat de *Juglans regia L. folium*, caracterizat prin aceea că se obține prin extracția materiei prime vegetale, frunze de nuc, 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.

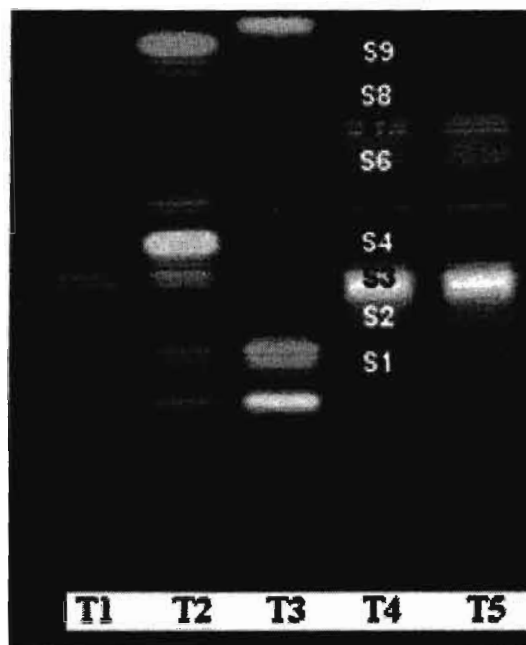


Figura 1. Aspectul (HP)TLC al extractului alcoolic din frunze de nuc, *Juglans regia* L. (14-15) comparativ cu substanțele de referință (T1, T2, T3).

Tracks: T1– rutin, hiperozida, acid protocatehuic; T2- rutin, acid clorogenic, hiperozida, luteolin-7-glucozida, vitexin, acid cafeic; T3– rutin, acid clorogenic acid, cosmosiin, kaempferol

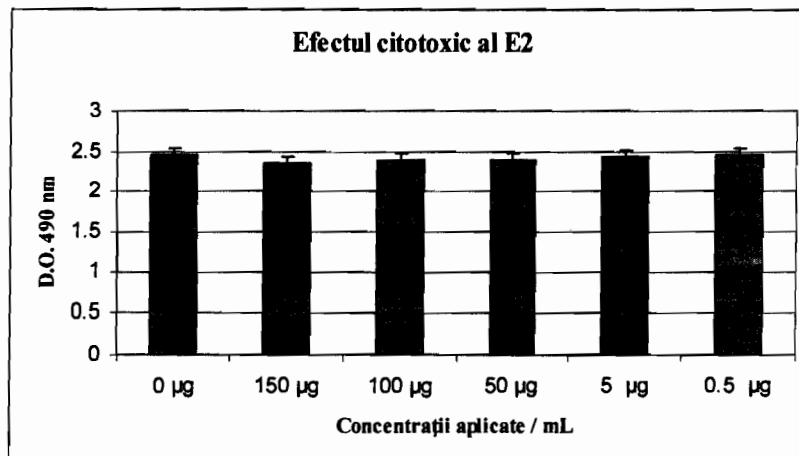


Fig.nr. 2. Rezultate obținute la testul MTS de viabilitate celulară (linia celulară normală) fibroblaste murine 3T3) în prezența extractului de *Juglans regia* L. (E2)

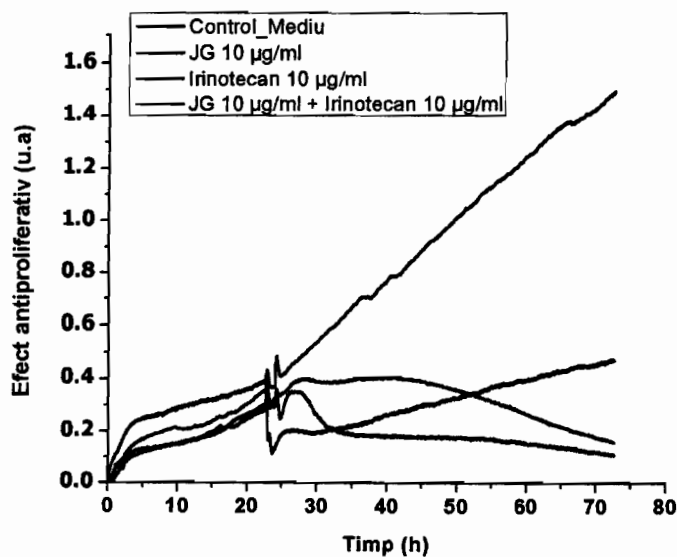


Fig.nr. 3. Activitatea antiproliferativă pe durata de 72h pentru celule SH-SY5Y incubate cu extract JG (*Juglans regia*) 10 µg/mL, irinotecan 10 µg/mL și mixul irinotecan 10 µg/mL - extract vegetal 10 µg/mL.