



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2018 00717**

(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 DIN PARTEA AERIANĂ DE *EPILOBIUM
HIRSUTUM L.* CU EFECT DE POTENȚARE A ACTIVITĂȚII
ANTITUMORALE A IRINOTECANULUI**

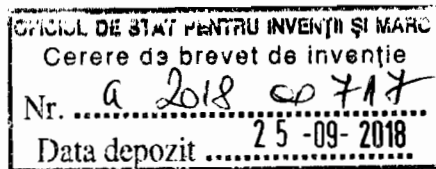
(57) **Rezumat:**

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui extract selectiv din partea aeriană de *Epilobium hirsutum L.* (pufuliță), cu efect de potențare a activității antitumorale a irinotecanului pe linii celulare tumorale. Procedeu conform invenției constă în extracția materialului vegetal uscat și mărunțit din herba de *Epilobium hirsutum* în alcool etilic 70%, timp de 1 h, la reflux, după care se filtrează prin filtru cu porozitate medie, rezultând extract de pufuliță brut, pentru care se

face dozarea conținutului de polifenoli totali GAE per ml extract, urmată de concentrarea soluției la presiune redusă până la stadiul de extract uscat, care se reia în etanol 40%, rezultând un extract selectiv, standardizat de pufuliță, având un conținut de polifenoli totali exprimați în acid galic de 5 ml GAE/ml extract.

Revendicări: 1
Figuri: 4





EXTRACT SELECTIV DIN PARTEA AERIANĂ DE *EPILOBIUM HIRSUTUM L.* CU EFECT DE POTENȚARE A ACTIVITĂȚII ANTITUMORALE A IRINOTECANULUI.

Invenția se referă la un extract selectiv, standardizat din partea aeriană de pufuliță cu flori mici (*Epilobium hirsutum L. herba*) cu activitate antitumorală și cu acțiune de potențare a activității antitumorale a irinotecanului pe liniile celulare tumorale de neuroblastom SH-SY5Y și de melanom malign B16F10 .

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 chimioterapia a prezentat o serie de dezavantaje esențiale care n-au fost rezolvate nici până 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 *in vitro* cât și în *in 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 sinergice 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 de *Epilobium hirsutum L. herba* are activitate antiproliferativă pe o serie de linii celulare tumorale (11,12).

In acest context, problema pe care o rezolvă invenția este că extractul selectiv, standardizat de *Epilobium hirsutum* conform invenției, este netoxic și potențează activitatea antitumorală a irinotecanului pe linia celulară umană de neuroblastom SH-SY5Y și pe linia celulară de melanom malign B16F10 și poate fi astfel folosit pentru obținerea unui noi agenți antitumorali, ce combină irinotecanul și extractul de *Epilobium hirsutum*, **cu activitate specifică superioară irinotecanului și farmacotoxicologie asemănătoare irinotecanului.**

Extractul vegetal de *Epilobium hirsutum* obținut conform invenției poate fi utilizat în prepararea unor

produse dermatocosmetice (topice) cu potențial de prevenire a modificărilor maligne la nivelul epidermei la om.

Extractul vegetal standardizat de *Epilobium hirsutum*, conform invenției, constă în aceea că se obține prin extracția materiei prime vegetale, pufuliță cu flori mici, cu alcool etilic 70% (v/v), în raport de extracție 1:15, timp de 1 oră, la reflux, după care pentru extractul de pufuliță brut, obținut după separarea materialului vegetal prin filtrare, 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 etanol 40% (v/v) astfel încât să se obțină un extract, selectiv, standardizat de pufuliță, cu un conținut în polifenoli totali exprimați în acid galic de 5 mg GAE/mL extract.

Procedeele de obținere a unui extract vegetal standardizat de *Epilobium hirsutum*, cu acțiune de potențare a activității antitumorale a irinotecanului, constă în aceea că se supun extracției 20g de material vegetal uscat și mărunțit de herba de *Epilobium hirsutum* în 300 mL alcool etilic 70%(v/v), timp de 1h, la reflux, după care se filtrează prin filtru de porozitate medie obținându-se extractul de pufuliță brut pentru care se face dozarea conținutului în polifenoli totali (GAE) per mL extract, urmată de concentrare la presiune redusă până la stadiul de extract uscat, extract uscat care în final se reia cu etanol 40%(v/v) astfel încât să se obțină un extract, selectiv, standardizat de pufuliță, cu un conținut în polifenoli totali exprimați în acid galic de 5 mg GAE/mL extract.

Principalele caracteristici ale extractului vegetal de *Epilobium hirsutum* conform invenției sunt:

1.Are un conținut bogat în polifenoli; studiile HPTLC asupra extractului selectiv în etanol 40% (v/v) din herba de pufuliță au indicat prezența certă a acidului clorogenic (s2), a acidului galic (s7) plus cel puțin patru derivați ai miricetinului (s3, s4, s5 și s6). - 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, concentrațiile care au afectat celulele tumorale, nu manifestă citotoxicitate

asupra celulelor normale, în condițiile experimentului de față. - vezi **Figura 2**.

3. Prezintă activitate antiproliferativă evidențiată pe celule umane de neuroblastom SH-SY5Y și pe celule de melanom malign B16F10 - vezi **Figurile 3 și 4**.

4. Are efect de mărire a activității antiproliferative a irinotecanului evidențiat pe celule umane de neuroblastom SH-SY5Y și pe celule de melanom malign B16F10 - vezi **Figurile 3 și 4**.

Avantajele invenției

1. Extractul vegetal de *Epilobium hirsutum*, conform invenției, are efect de mărire a activității antiproliferative a irinotecanului evidențiat pe liniile celulare de neuroblastom uman SH-SY5Y și de melanom malign B16F10.

2. Prin combinarea irinotecanului cu extractul de *Epilobium hirsutum L. herba* 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 *Epilobium hirsutum L. herba*, conform invenției.

Exemplu 1

20 g de material vegetal constituit din herba de pufuliță cu flori mici, *Epilobium hirsutum L.*, uscată și măcinată, se supun extracției cu 300 ml alcool etilic 70% v/v, timp de o oră, la reflux, sub agitare continuă. Extractul hidroalcoolic brut obținut se separă de masa vegetală prin filtrare la cald, prin filtru de hârtie cu porozitate medie, la presiune atmosferică și se analizează în ceea ce privește conținutul în polifenoli totali exprimați ca acid galic (GAE). Se obțin 210 mL extract hidroalcoolic brut de 2,25 mg GAE/ml. Extractul hidroalcoolic rezultat se concentrează la rotavapor la stadiul de extract uscat, care se reia cu soluție hidroalcoolică 40% (v/v) în așa fel încât să rezulte un extract final standardizat conținând 5 mg GAE /mL. (În exemplul 1 rezultă $210 \times 2,25 : 5 = 94,5$ mL extract final standardizat de 5 mg GAE/mL).

Extractul de pufuliță herba astfel obținut a fost testat privind activitatea antiproliferativă, precum și

efectul de potențare a activității antiproliferative a irinotecanului pe liniile celulare tumorale de neuroblastom SH-SY5Y și de melanom malign B16F10, prin metoda RTCA (vezi **Figurile 3 și 4**).

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. Granica, S., Piwowarski, J.P., Czerwińska, M.E., Kiss, A.K., Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): A review, *Journal of Ethnopharmacology* 156, 316-346, 2014
12. Stolarczyk, M., Naruszewicz, M., Kiss, A.K., Extracts from *Epilobium* sp. herbs induce apoptosis in human hormone-dependent prostate cancer cells by activating the mitochondrial pathway., *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65, 1044–1054, 2013

REVENDICĂRI

*1. Activitatea de potențare a extractului selectiv, standardizat de *Epilobium hirsutum* L. herba, caracterizat prin aceea că se obține prin extracția materiei prime vegetale, pufuliță cu flori mici, cu alcool etilic 70% (v/v), în raport de extracție 1:15, timp de 1 oră, la reflux, după care pentru extractul de pufuliță brut, obținut după separarea materialului vegetal prin filtrare, 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 etanol 40%(v/v) astfel încât să se obțină un extract, selectiv, standardizat de pufuliță, cu un conținut în polifenoli totali exprimați în acid galic de 5 mg GAE/mL extract, asupra activității antitumorale a irinotecanului, demonstrată pe liniile celulare tumorale de neuroblastom SH-SY5Y și de melanom malign B16F10 și care poate fi astfel folosit în combinație cu irinotecanul pentru obținerea unor noi agenți antitumorali.*

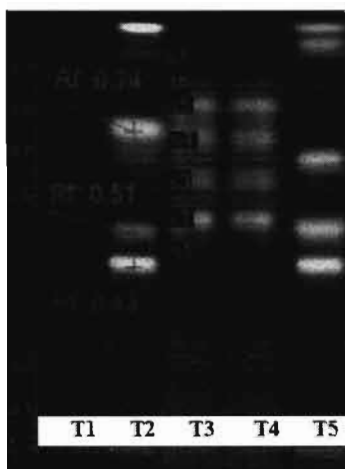


Figura 1. Aspectul (HP)TLC al extractului alcoolic din *herba* de pufuliță cu flori mici, *Epilobium hirsutum* L. (T3-T4) comparativ cu substanțele de referință (T1, T2, T5).

Tracks: T1– acid clorogenic, T2– rutin, acid clorogenic, hiperozida, apigenin-7-O-glucozida/cosmosiin, quercetin; T5- rutin, apiin, acid clorogenic, hiperozida, acid rosmarinic, apigenina) au indicat prezența certă a acidului clorogenic (s2), a acidului galic (s7) plus cel puțin patru derivați ai miricetinului (s3, s4, s5 și s6).

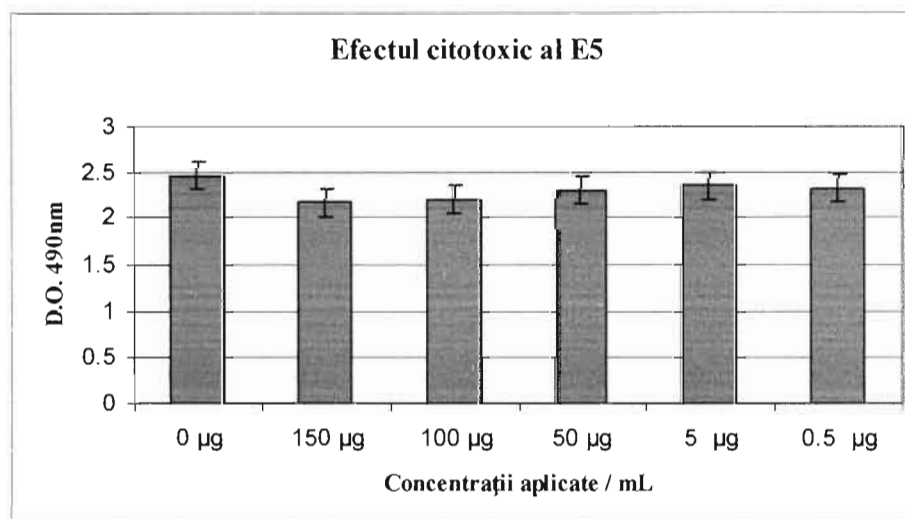


Fig.nr. 2. Rezultate obținute la testul MTS de viabilitate clulară (linia celulară de fibroblaste murine 3T3) în prezența extractului de *Epilobium hirsutum* L. (E5)

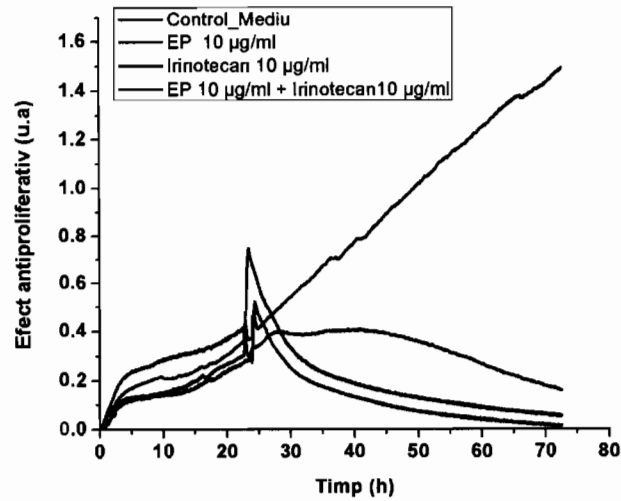


Fig.nr. 3. Activitatea antiproliferativă pe durata de 72h pentru celule SH-SY5Y incubate cu extract EP (*Epilobium hirsutum*) 10 µg/mL, irinotecan 10 µg/mL și mixul irinotecan 10 µg/mL - extract vegetal 10 µg/mL.

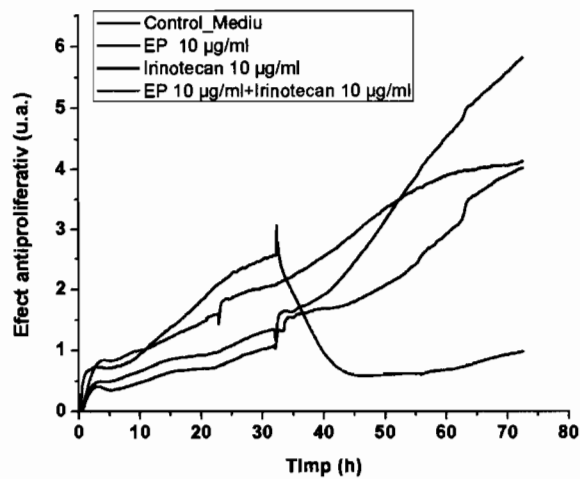


Fig.nr. 4. Activitatea antiproliferativă pe durata de 72h pentru celule de melanom malign B16F10 incubate cu extract EP (*Epilobium hirsutum*) 10 µg/mL, irinotecan 10 µg/mL și mixul irinotecan 10 µg/mL - extract vegetal 10 µg/mL