



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01338**

(22) Data de depozit: **07/12/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/11/2016** BOPI nr. **11/2016**

(41) Data publicării cererii:
28/06/2013 BOPI nr. **6/2013**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **CRIVINEANU MARIA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR. 210, BL. V40,
AP. 3, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PAPUC CAMELIA PUIA, BD.UVERTURII
NR.87, BL.O 14 A, SC.C, ET.3, AP.61,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **CRÎNGANU DAN,
STR. SERG. NIȚU VASILE NR. 33,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **NICORESCU VALENTIN RĂZVAN,
STR.VALEA OLTULUI NR.139-141, BL.A,
SC.2, AP.28, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **PREDESCU NICOLETA CORINA,
CALEA VĂCĂREȘTI NR. 207, BL.85B,
SC. A, ET. 7, AP. 28, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **NICORESCU ISABELA MĂDĂLINA,
STR. VALEA OLTULUI NR. 139-141, BL. A,
SC. 2, AP. 28, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 2011/0136751 A1; WO 03/057201 A2

(54) **EXTRACT POLIFENOLIC DE UZ VETERINAR UTILIZAT CA
ADJUVANT ÎN CHIMIOTERAPIA ANTICANCEROASĂ**



1 Invenția se referă la un extract polifenolic de uz veterinar, utilizat ca adjuvant în
chimioterapia anticanceroasă.

3 Din studiile *in vitro* prezentate în literatura de specialitate, se cunoaște faptul că poli-
fenolii prezintă abilitatea de a anihila speciile reactive de oxigen (radicalul hidroxil, anionul
5 superoxid, peroxidul de hidrogen, oxigenul singlet, anionul hipoclorit) și speciile reactive de
azot (oxidul nitric), inhibă procesul de oxidare a acizilor grași polinesaturați, acționează ca
7 și chelatori ai ionilor metalelor tranzitionale, în special ai ionului Fe^{2+} , considerat un generator
de radicali hidroxil în reacția Fenton.

9 Studiile *in vivo*, și anume, experimentele efectuate pe șobolani au demonstrat că, la
nivel hepatic, polifenolii îmbunătățesc activitatea enzimelor antioxidante catalaza (CAT),
11 glutation peroxidaza (GPx), superoxid dismutaza (SOD), cresc nivelul glutationului redus și
scad concentrația compușilor care reacționează cu acidul tiobarbituric (malondialdehida -
13 MDA).

Se cunoaște faptul că rezistența tumorilor la acțiunea citostaticelor constituie princi-
15 pala cauză a eșecurilor și ineficienței terapiei citostatice cu un chimioterapic sau concomitent
față de mai multe medicamente anticanceroase. Această rezistență, congenitală sau
17 dobândită, este cunoscută în literatura de specialitate sub denumirea de rezistență multidrog
(Mulți Drug Resistance - MDR).

19 La ora actuală sunt căutate strategii pentru evitarea, prevenirea sau depășirea
instalării rezistenței multidrog. Dintre strategiile abordate menționăm prevenirea apariției
21 MDR în cursul terapiei, prin utilizarea mai multor citostatice, alternativ și la doze maxim
tolerate, precum și administrarea de substanțe adjuvante, inclusiv antioxidanți naturali.

23 Astfel, se cunosc, din cererea de brevet **US 2011/0136751 A1**, compuși polifenolici
și utilizarea lor pentru tratamentul sau prevenirea cancerului la un subiect, precum și metode
25 pentru administrare a unei cantități eficiente de compuși polifenolici. Dintre compușii
polifenolici menționați fac parte petrostilbenul, rezveratrolul, catechina, acidul galic, acidul
27 cafeic, antocianina, quercetina și orice combinație a acestora.

De asemenea, se cunoaște, din cererea de brevet **WO 03057201 A2**, o formulare de
29 nutrient farmaceutic și utilizarea acesteia pentru tratamentul cancerului, mai specific sunt
redate la formulări farmaceutice pe bază de polifenoli selectați din grupul care constă din
31 galat de epigallocatechină, galat de epicatechină și catechină.

Soluțiile cunoscute din stadiul tehnicii prezintă dezavantajele de mai jos.

33 Datele din literatura de specialitate, referitoare la efectul polifenolilor asupra statusului
antioxidant al animalelor supuse chimioterapiei, asupra rezistenței multidrog, precum și
35 asupra reducerii toxicității chimioterapicelor, sunt insuficiente. Cercetătorii au studiat fie
caracterul antioxidant al unor extracte din plante, fie efectul rezistenței multidrog, fie toxi-
37 citatea chimioterapicelor citostatice. Cele 3 probleme majore apărute în terapia antican-
ceroasă nu au fost studiate în interacțiune.

39 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în îmbunătățirea statusului
antioxidant al animalelor supuse chimioterapiei, cu ajutorul unei compoziții fitoterapeutice cu
41 efect adjuvant.

Astfel, obiectivul invenției constă în obținerea și utilizarea unui produs natural,
43 constituit în principal din polifenoli, cu efect puternic antioxidant.

Acest produs prezintă două acțiuni majore:

45 1. Anihilarea radicalilor liberi care apar în urma acțiunii stresului oxidativ, instituit de
starea psihică, tratamentul medicamentos, procesele de multiplicare a celulelor maligne,
47 precum și chelatarea ionilor metalelor tranzitionale (acțiune antioxidantă).

La pacienții cu diferite forme de cancer s-a constatat că radicalii liberi rezultați în urma diferitelor procese oxidative, ca și în urma acțiunii chimioterapicelor anticanceroase, induc stres oxidativ, care generează procese secundare, cum ar fi modificarea permeabilității membranelor celulare. Aceste procese oxidative se repercutează asupra stării de sănătate a pacienților, determinând agravarea acesteia, sau, în cazul chimioterapiei, pot contribui la instalarea rezistenței față de medicamentul administrat.

Studiile efectuate au demonstrat că agenții antineoplazici induc, din cauza toxicității lor, reducerea capacității organismului de a anihila radicalii liberi și, în consecință, favorizează peroxidarea lipidică la nivelul acizilor grași din membranele celulare. Procesele de peroxidare la nivelul fosfolipidelor din constituția citomembranelor se repercutează asupra funcțiilor de transport citotransmembranar, afectând permeabilitatea acestora.

2. Modularea activității unor proteine și enzime implicate în procesele de transport și metabolizare a citostaticelor.

Invenția constă dintr-un extract polifenolic de uz veterinar, utilizat ca adjuvant în tratamentul cu chimioterapice citostatice la animale, care este constituit dintr-un concentrat polifenolic extras dintr-un material vegetal constituit din fructe de afin (*Vaccinium myrtillus*), fructe de cătină (*Hippophae rhamnoides*), fructe de păducel (*Crataegus monogyna*), părți aeriene de sunătoare (*Hypericum perforatum*) și părți aeriene de rostopască (*Chelidonium majus*), în raport masic 2:1:1:0,5:0,5, cu o concentrație în polifenoli de 5 g echivalent acid galic/100 ml și un conținut de zaharoză de 40%.

Extractul polifenolic, conform invenției, este condiționat ca un produs natural sub formă de sirop, ce are un conținut în polifenoli de 5 g echivalent acid galic (EAG)/100 ml.

Extractul polifenolic, conform invenției, are următoarele avantaje:

- prezintă activitate antioxidantă (anihilează radicalii liberi generați de boala canceroasă și de chimioterapie) și reglează activitatea enzimelor antioxidante;
- reduce toxicitatea citostaticelor;
- reduce chimioresistența tumorilor;
- are efect hepatoprotector;
- nu interferează în linia metabolică a altor medicamente;
- este netoxic și nu are efecte adverse.

Forma aleasă de prezentare a preparatului, respectiv, sirop alcoolic, are ca avantaj absorbția eficientă la nivelul tubului digestiv a substanțelor active conținute, asigurând o biodisponibilitate crescută a principiilor active asociate în acest produs, precum și administrarea facilă la animale, având în vedere faptul că preparatul este de uz veterinar.

Alegerea plantelor menționate este susținută de datele existente în literatura de specialitate. Astfel, se cunoaște faptul că fructele de afin sunt bogate în polifenoli (flavonoide și antociani) cu efect puternic antioxidant, care oferă protecție membranelor lipozomale contra proceselor oxidative. Antocianii din fructele de afin au efect hipoglicemiant, cardioprotectiv, neuroprotectiv, antiinflamator, genoprotectiv și anticancerigen. Studiile efectuate au demonstrat că polifenolii extrași din fructe de cătină au efect antioxidant puternic, antiinflamator și antiproliferativ în cancerul de colon și ficat. Polifenolii extrași din fructele de păducel au efect antioxidant, hepatoprotectiv, gastroprotectiv, diuretic, radioprotectiv, imunostimulator, anticancerigen și antidepresiv. Părțile aeriene de sunătoare sunt bogate în flavonoide, rutină, quercitină, kaempferol și hipericină. Acești compuși polifenolici au activitate antioxidantă, antidepresivă și anticancerigenă. Părțile aeriene de rostopască au în conținut polifenoli și alcaloizi cu proprietăți terapeutice. Apigenina, polifenol extras din rostopască, prezintă activitate anticancerigenă, antioxidantă și modulează rezistența multidrog.

Produsul natural realizat conform invenției nu interferează în linia metabolică a altor medicamente, nu prezintă efecte secundare și nu creează reacții adverse. Doza recomandată este între 5 și 10 mg EAG polifenoli/kg.

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a invenției.

Exemplu de realizare a produsului

Materialul vegetal utilizat constă din fructe de arin (*Vaccinium myrtillus*), fructe de cătină (*Hippophae rhamnoides*), fructe de păducel (*Crataegus monogyna*), părți aeriene de sunătoare (*Hypericum perforatum*) și părți aeriene de rostopască (*Chelidonium majus*), amestecate în proporție de 2:1:1:0,5:0,5 (m/m/m/m/m) - raport masic, în stare uscată și măcinată. Materialul vegetal se supune unei extracții prin agitare la reflux timp de 3 h, cu alcool etilic 60%. După răcire, soluția extractivă se separă prin filtrare la presiune normală. După obținere, soluția extractivă este concentrată la presiune scăzută (150 mm col. Hg), până la evaporarea completă a etanolului. Reziduul obținut se dizolvă într-o soluție de zaharoză 40%, preparată în etanol 60%, până la o concentrație în polifenoli de 5 g echivalent acid galic (EAG)/100 ml.

Se prezintă în continuare un exemplu de utilizare a produsului.

Exemplu de utilizare a produsului

Utilizarea produsului natural din extract polifenolic, conform invenției, este realizată în schemele de tratament cu chimioterapice la câini cu tumori mamare.

Testări farmaco-clinice. Protocolul experimental care s-a aplicat în cazul cățelelor cu tumori mamare surprinse în stadiile de evoluție T₁ și T₂ este prezentat în tabelul 1.

Tabelul 1

Schema de tratament cu citostatice și extract polifenolic, conform invenției, la cățele cu tumori mamare surprinse în stadiile T1 și T2

Săptămâna	Tratament cu chimioterapice și extract polifenolic conform invenției		Tratament cu chimioterapice	
	Chimioterapic	extract polifenolic conform invenției (mg EAG/kg)	Chimioterapic	extract polifenolic conform invenției (mg EAG/kg)
1	Ciclofosfamidă - 50 mg/m ² /zi, 4 zile consecutiv Covinan (proligeston) - 1 ml (100 mg)/10 kg, o administrare în prima zi	5 mg/kg zilnic	Ciclofosfamidă - 50 mg/m ² /zi, 4 zile consecutiv Covinan (proligeston) - 1 ml (100 mg)/10 kg, o administrare în prima zi	-
2	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
Intervenție chirurgicală (mastectomie)				
3	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
4	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
5	Holoxan (ifosfamidă) - 200 mg/m ² /zi, 2 zile consecutiv	5 mg/kg zilnic	Holoxan (ifosfamidă) - 200 mg/m ² /zi, 2 zile consecutiv	-

Tabelul 1 (continuare)

Săptămăna	Tratament cu chimioterapice și extract polifenolic conform invenției		Tratament cu chimioterapice	
	Chimioterapic	extract polifenolic conform invenției (mg EAG/kg)	Chimioterapic	extract polifenolic conform invenției (mg EAG/kg)
6	Gemcitabină - 200 mg/m ² o administrare	5 mg/kg zilnic	Gemcitabină - 200 mg/m ² o administrare	-
7	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
8	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
9	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
10	Holoxan (ifosfamidă) - 200 mg/m ² /zi, 2 zile consecutiv	5 mg/kg zilnic	Holoxan (ifosfamidă) - 200 mg/m ² /zi, 2 zile consecutiv	-
11	Gemcitabină - 200 mg/m ² o administrare	5 mg/kg zilnic	Gemcitabină - 200 mg/m ² o administrare	-

Îmbunătățirea statusului antioxidant sub influența produsului natural pe bază de extract polifenolic conform invenției

Administrarea preparatului polifenolic la câini cu tumori mamare, tratați cu citostatice și supuși mastectomiei (conform tabelului 1), a determinat creșterea valorilor enzimelor antioxidante eritrocitare superoxid dismutaza (r-SOD), catalaza (r-CAT), glutatión peroxidaza (r-GPx), scăderea concentrației malondialdehidei eritrocitare (r-MDA) și creșterea concentrației glutatiónului redus (r-GSH). La câinii care nu au beneficiat de preparatul pe bază de extract polifenolic, conform invenției, activitatea enzimelor antioxidante eritrocitare (r-SOD, r-CAT, r-GPx) a scăzut, iar nivelul malondialdehidei a crescut. O scădere semnificativă a fost înregistrată și la nivelul glutatiónului redus din eritrocite (tabelul 2). Aceste rezultate demonstrează scăderea nivelului procesului de oxidare a lipidelor la nivelul membranei eritrocitare, și îmbunătățirea statusului antioxidant la animalele la care s-a administrat extractul polifenolic.

Activitatea superoxid dismutazei eritrocitare (r-SOD), catalazei eritrocitare (r-CAT), glutation peroxidazei eritrocitare (r-GPx), concentrația malondialdehidei eritrocitare și a glutationului redus (r-GSH)

	Câini cu tumori mamare, tratați cu citostatice și extract polifenolic conform invenției					Câini cu tumori mamare, tratați cu citostatice				
	r-SOD (U/g Hb)	r-CAT (U/g Hb)	r-GPx (U/g Hb)	r-MDA (μmol/g Hb)	r-GSH (mg/g Hb)	r-SOD (U/g Hb)	r-CAT (U/g Hb)	r-GPx (U/g Hb)	r-MDA (μmol/g Hb)	r-GSH (mg/g Hb)
Control	125,3	400,2	39,3	0,31	3,51	125,3	400,2	39,3	0,31	3,51
ziua 0 (înainte de tratament)	99,5	378,2	30,9	0,47	2,14	88,5	380,2	27,1	0,55	2,11
săptămâna 2	99,4	377,3	31,0	0,47	2,01	89,1	380,3	27,5	0,57	1,92
săptămâna 6	101,3	387,1	31,9	0,41	1,97	89,1	380,2	27,1	0,46	1,91
săptămâna 7	101,2	388,9	32,1	0,39	2,28	87,3	372,5	26,7	0,48	1,78
săptămâna 11	109,7	390,0	34,1	0,35	2,43	84,2	364,5	26,0	0,65	1,65

*Valorile prezentate sunt media a 5 determinări

Efectul hepatoprotector al produsului natural pe bază de extract polifenolic conform invenției

Introducerea în schema de tratament a produsului pe bază de extract polifenolic conform invenției, conform tabelului 1, a determinat reducerea efectelor toxice ale citostaticelelor la nivelul ficatului. Datorită efectului hepatoprotector exercitat de produsul extract polifenolic conform invenției, activitatea enzimelor serice fosfataza alcalină (ALP), aspartat-aminotransferaza (AST), alanil-aminotransferaza (ALT) și lactat-dehidrogenaza (LDH) a fost îmbunătățită. La câinii care nu au beneficiat de extract polifenolic conform invenției, activitatea enzimelor serice menționate a crescut, ceea ce demonstrează intensificarea procesului de citoliză la nivel hepatic (tabelul 3).

Astfel, se observă că valorile activității acestor enzime sunt crescute de 3...4 ori față de cele normale, în cazul pacienților cu tumori mamare tratați numai cu citostatice, spre deosebire de pacienții cărora li s-au administrat, pe lângă citostatice, și extracte polifenolice vegetale, la care valorile activității acestor enzime sunt peste limitele normale, ajungând doar până la dublul valorilor normale, și aceasta numai în cazul anumitor parametri. Aceste observații indică faptul că polifenolii extrași din plante, prin acțiunea lor antioxidantă, reduc toxicitatea hepatică a chimioterapicelor citostatice.

Tabelul 3

Activitatea enzimelor markeri ai citolizei hepatice: fosfataza alcalină (ALP), aspartat transaminaza (AST), alanil transaminaza (ALT) și lactat dehidrogenaza (LDH) la pacienții cu tumori mamare

	Câini cu tumori mamare, tratați cu citostatice și extract polifenolic conform invenției				Câini cu tumori mamare, tratați cu citostatice			
	ALP (U/l)	AST (U/l)	ALT (U/l)	LDH (U/l)	ALP (U/l)	AST (U/l)	ALT (U/l)	LDH (U/l)
Control	88,5	21,0	27,9	148,3	88,5	21,0	27,9	148,3
ziua 0 (înainte de tratament)	93,2	24,2	34,2	238,5	96,9	29,6	42,7	265,2
săptămâna 2	107,2	28,9	47,5	245,2	115,6	39,2	61,3	297,6
săptămâna 6	142,6	34,5	76,5	294,2	137,5	53,2	96,2	324,7
săptămâna 7	140,2	40,1	90,7	307,2	179,2	65,4	120,5	370,5
săptămâna 11	135,4	41,2	72,5	320,5	210,2	95,6	131,2	440,7

*Valorile prezentate sunt media a 5 determinări

Reducerea rezistenței multidrog sub influența produsului natural extract polifenolic conform invenției

Ca rezultat important obținut consecutiv strategiei terapeutice abordate, s-a evidențiat clinic o regresie a tumorii, respectiv, o remisiune clinică din stadiul T_4 sau T_3 în stadiul T_2 sau T_1 . După tratamentul cu citostatice asociate cu mix polifenolic, într-unul dintre cazuri tumora a involuat din stadiul $T_4N_2M_1$ în stadiul $T_2N_1M_x$, analizele de sânge punând în evidență o ușoară remisiune a constantelor hematologice și a enzimelor studiate.

Extract polifenolic de uz veterinar, utilizat ca adjuvant în tratamentul cu chimioterapice citostatice la animale, **caracterizat prin aceea că** este constituit dintr-un concentrat polifenolic extras dintr-un material vegetal constituit din fructe de afin (*Vaccinium myrtillus*), fructe de cătină (*Hippophae rhamnoides*), fructe de păducel (*Crataegus monogyna*), părți aeriene de sunătoare (*Hypericum perforatum*) și părți aeriene de rostopască (*Chelidonium majus*), în raport masic 2:1:1:0,5:0,5, cu o concentrație în polifenoli de 5 g echivalent acid galic/100 ml, și un conținut de zaharoză de 40%.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 526/2016