



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 36/537 (2018.05); A61K 36/68 (2018.05); A61K 36/8962 (2018.05); A61K 35/583 (2018.05); A61P 29/00 (2018.05); A61P 37/02 (2018.05)

(21)(22) Заявка: 2016107782, 03.03.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.03.2016

Дата регистрации:
05.07.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 03.03.2016

(43) Дата публикации заявки: 07.09.2017 Бюл. № 25

(45) Опубликовано: 05.07.2018 Бюл. № 19

Адрес для переписки:
141700, Московская обл., г. Долгопрудный, а/я
43, ООО "АлексАнн", Давыденковой О.В.

(72) Автор(ы):

Давыденков Валерий Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"АлексАнн" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2278674 C2, 27.06.2006. CN
103110865 A, 22.05.2013. АТАБАЕВА Х.Н.,
УМАРОВА Н.С. Лекарственные средства
в ветеринарии. Ташкент. 2013, с.74-77.

R U 2 6 6 0 3 4 2 C 2

(54) ГОМЕОПАТИЧЕСКОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ВЕТЕРИНАРИИ, ОБЛАДАЮЩЕЕ
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИМ СВОЙСТВАМИ,
СПОСОБСТВУЮЩЕЕ ЭЛИМИНАЦИИ ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ И РЕГЕНЕРАЦИИ
ЭПИТЕЛИЯ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕЕ СНИЖЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА
СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В МОЛОКЕ ПРИ МАСТИТЕ У ПРОДУКТИВНЫХ ЖИВОТНЫХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области ветеринарии, а именно, к лекарственным средствам, обладающим противовоспалительным и иммуномодулирующим свойствами, способствующее элиминации патогенной микрофлоры и регенерации эпителия молочной железы и обеспечивающее снижение количества соматических клеток в молоке при мастите у продуктивных животных. Сущность изобретения заключается в том, что предложено лекарственное средство для ветеринарии, содержащее настойки Plantago major Ø, Salvia officinalis Ø, Lachesis D4, Allium sativum Ø, причем компоненты содержатся в микродозах в объем.

частях (%):

Настойка Plantago major Ø	0,0002 % – 0,02 %
Настойка Salvia officinalis Ø	0,0003 % – 0,03 %
Настойка Lachesis D4	0,0001 % – 0,01 %
Настойка Allium sativum Ø	0,0003 % – 0,03 %

Изобретение обеспечивает расширение арсенала ветеринарных лекарственных средств безопасных в применении, лишенных побочных действий и противопоказаний, способствующих элиминации патогенной микрофлоры и регенерации эпителия молочной железы и снижающих количество соматических клеток в молоке при мастите у продуктивных животных. 2 з.п. ф-лы, 6 табл., 2 пр.

R U 2 6 6 0 3 4 2 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19)

RU

(11)

2 660 342

⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 36/537 (2006.01)
A61K 36/68 (2006.01)
A61K 36/8962 (2006.01)
A61K 35/583 (2015.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 36/537 (2018.05); *A61K 36/68* (2018.05); *A61K 36/8962* (2018.05); *A61K 35/583* (2018.05); *A61P 29/00* (2018.05); *A61P 37/02* (2018.05)

(21)(22) Application: 2016107782, 03.03.2016

(24) Effective date for property rights:

03.03.2016

Registration date:
05.07.2018

Priority:

(22) Date of filing: 03.03.2016

(43) Application published: 07.09.2017 Bull. № 25

(45) Date of publication: 05.07.2018 Bull. № 19

Mail address:

141700, Moskovskaya obl., g. Dolgoprudnyj, a/ya
43, OOO "AleksAnn", Davydenkovoj O.V.

(72) Inventor(s):

Davydenkov Valerij Nikolaevich (RU)

(73) Proprietor(s):

Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"AleksAnn" (RU)

R U
2 6 6 0 3 4 2
C 2

(54) HOMEOPATHIC MEDICINAL FOR VETERINARY EXHIBITING ANTI-INFLAMMATORY AND IMMUNOMODULATING PROPERTIES, PROMOTING ELIMINATIONS OF PATHOGENIC MICROFLORA AND REGENERATION OF THE BREAST EPITHELIUM AND PROVIDING REDUCTION OF THE AMOUNT OF SOMATIC CELLS IN MILK AT MASTITIS IN PRODUCTIVE ANIMALS

(57) Abstract:

FIELD: veterinary science.

SUBSTANCE: invention relates to veterinary science, namely, to drugs that have anti-inflammatory and immunomodulating properties, promoting the elimination of pathogenic microflora and the regeneration of the epithelium of the mammary gland and providing a reduction in the number of somatic cells in milk with mastitis in productive animals. Essence of the invention consists in the fact that a medicinal product for veterinary medicine containing tinctures *Plantago major* Ø, *Salvia officinalis* Ø, *Lachesis* D4, *Allium sativum* Ø, and components are contained

in microdoses per vol. parts (%): tincture *Planto major* Ø 0.0002 %-0.02 %; tincture *Savia officinalis* Ø 0.0003 %-0.03 %; tincture *Lachesis* D4 0.0001 %-0.01 %; tincture *Allium sativum* Ø 0.0003 %-0.03 %.

EFFECT: expansion of the arsenal of veterinary medicinal products safe in use, devoid of side effects and contraindications, contributing to the elimination of pathogenic microflora and regeneration of the epithelium of the breast and reducing the number of somatic cells in milk in mastitis in productive animals.

3 cl, 6 tbl, 2 ex

Изобретение относится к лекарственным средствам для ветеринарии, обладающим противовоспалительным и иммуномодулирующим свойствами, способствующее элиминации патогенной микрофлоры и регенерации эпителия молочной железы и обеспечивающее снижение количества соматических клеток в молоке при мастите у 5 продуктивных животных.

В последние годы мастит получил очень широкое распространение во многих странах мира. Существенно сдерживаются темпы увеличения производства молока, снижается его качество, что наносит огромный экономический ущерб. При этом большую проблему представляет субклинический мастит, который не диагностируется

- 10 клиническими методиками, молоко от больных субклиническим маститом коров является плохим субстратом для развития молочнокислых микроорганизмов, используемых в молочной промышленности для заквасок. В 97,5% случаев такое молоко непригодно для сырорделия. Установлено, что при наличии в хозяйстве до 10% коров со скрытыми 15 маститами санитарное качество молока ухудшается вдвое. (В.И. Рубцов, 1977; Коган Г.Ф., Горинова Л.П., 1985; В.И. Слободянник, 1998). В последние годы в нашей стране и за рубежом ведутся интенсивные работы по созданию новых, высокоэффективных противомаститных лекарственных средств антимикробного и противовоспалительного действия. Однако антибиотикосодержащие лекарственные препараты выделяются с молоком. После температурной обработки продуктов животноводства и употребления 20 в пищу, антибиотики, содержащиеся в них, приобретают свойства сильнейших аллергенов (В.Г. Васильев и др., 1998; М.Г. Миролюбов, 1999; А.Н. Петров, 2000). Проводимые научные изыскания по этой проблеме не привели к существенному снижению заболеваемости коров данной патологией. В этой связи возрастаёт интерес к разработке и использованию нетрадиционных экологически безопасных методов 25 лечения коров при данной патологии, которые доступны к использованию в производственных условиях.

Лечение клинического мастита.

1. Персонал (операторы машинного доения, скотники) должны незамедлительно 30 извещать ветеринарных специалистов о случае мастита или даже о подозрении на

- мастит.
- 2. Лечение должно проводиться незамедлительно, с использованием самых эффективных препаратов, направленных как на подавление воспаления, так и на уничтожение патогенной микрофлоры.

- 3. Лечение должно быть адекватным степени развития патологии и особенностям 35 клинического проявления.

Лечение мастита должно начаться не позднее 4-6 ч с момента развития патологии. В противном случае оздоровление коровы может затянуться. При двухразовом доении весьма затруднительно, а то и вовсе невозможно отследить патологию с такой оперативностью. И хотя мастит не угрожает жизни животного, угроза потери 40 продуктивности с последующей выбраковкой очевидна.

Схемы лечения и используемые препараты могут быть разными - главное, чтобы при лечении врач преследовал вышеизложенные цели.

- В момент обнаружения мастита назначаем: внутримышечно 10 мл Дексафорта однократно. 20 мл Кобактана двукратно, с интервалом 24 ч. Внутрицистернально в 45 пораженные четверти Мастиет-Форте 4-кратно с интервалом 12 ч.

Лечение мастита рассчитано на 48 часов с последующей браковкой молока 6 доек. Добавление в данную схему новокаиновых блокад хорошо себя зарекомендовало и может с успехом назначаться.

При лечении легкой формы мастита, в большинстве случаев, достаточно будет ввести внутривымяно Мастиет-Форте два раза, с интервалом 12 ч.

При лечении субклинического мастита обычно хватает одного введения этого препарата.

⁵ Лечение тяжелых форм маститов одними внутривымяными инъекциями не поможет. Это может привести к удлинению времени лечения, браковке значительно большего количества молока, потере продуктивности при дальнейшей лактации, а то и вовсе к потере четверти.

Известен способ лечения субклинического мастита у коров (патент №2226105).

¹⁰ Способ обеспечивает повышение лечебной эффективности и исключение побочных действий на организм животного. Проводят введение фитопрепаратов, а именно 20 мл 50% раствора сока подорожника, содержащего фитонциды, вводят в пораженную долю вымени четырехкратно через 24 ч после вечернего доения.

Также известно средство для лечения клинического мастита (патент №2537244).

¹⁵ Изобретение относится к ветеринарии в частности к акушерству, гинекологии и биотехнологии размножения, и может быть использовано для лечения животных при клиническом мастите. Средство для лечения животных с клиническим маститом включает: тривит 10,0 мл, цефотаксим 750 мг, преднизолон 10,0 мг, нистатин 325,0 мл.

²⁰ Средство вводят больным животным интерцистернально в дозе 10,0 мл с интервалом 12 часов после доения.

Изобретение обеспечивает повышение эффективности лечения клинического мастита путем комплексного воздействия на все стороны патологического процесса.

²⁵ Наиболее близким аналогом является препарат - Мастинал (электронный реестр зарегистрированных лекарственных препаратов, №РУ 32-3-9.15-2839 № ПВР-3-8.0/02653)

Для лечения субклинического мастита широко применяют, как правило, дорогостоящие антибиотики при повышении уровня соматических клеток в молоке приносит мало пользы, зато приводит к выбраковке большого количества молока. Выбраковку молока при субклиническом мастите, особенно в крупных хозяйствах, можно существенно снизить. При внутримышечном применении эффект наступает медленней, но продолжается дольше. Именно поэтому внутримышечно применяют при хронических и субклинических маститах. Дозировка - 5 см³ на корову, но при массе коровы более 500 кг дозу следует увеличить до 7 см³.

³⁵ Курс лечения коров при субклиническом мастите - 2-3 инъекции с интервалом 48-72 часа.

⁴⁰ При клиническом мастите вводят подкожно в область воспаленной доли вымени. Однако, практически это сопряжено с определенными трудностями: корова достаточно болезненно реагирует на укол в область молочной железы. Ввиду этого, ветеринарные специалисты хозяйств опробовали и внедрили в повседневную практику введение непосредственно в сосковый канал.

⁴⁵ При начальных стадиях серозного и серозно-катарального мастита, когда отечность ткани выражена слабо или не выражена вообще, когда по внешнему виду молоко практически не изменено или обнаруживается незначительное количество казеиновых сгустков, возможно обойтись и без применения антибиотиков и, соответственно, без лишней выбраковки молока.

В более тяжелых случаях, возможно, потребуется дополнительное применение традиционных методов терапии (введение в сосковый канал специфических противомаститных препаратов, парентеральное введение антибиотиков, а при

необходимости - средства симптоматической терапии).

Совместное применение с традиционными препаратами позволит повысить эффективность лечения мастита и сократить срок лечения.

Недостатком данного лечения является то, что при более тяжелых формах мастита 5 препарат нужно вводить в область молочной железы или непосредственно в сосковый канал, также лечение данным препаратом сопровождается традиционной антибиотикотерапией, что приводит к увеличению периода ожидания и наносит большой экономический ущерб хозяйствам.

Задачей настоящего изобретения является создание лекарственного средства для

10 ветеринарии, обладающего противовоспалительным и иммуномодулирующим свойствами, способствующее элиминации патогенной микрофлоры и регенерации эпителия молочной железы и обеспечивающее снижение количества соматических клеток в молоке при мастите у продуктивных животных и лишенного побочных эффектов.

15 Технический результат заключается в расширении арсенала ветеринарных лекарственных средств безопасных в применении, лишенных побочных действий и противопоказаний, способствующих элиминации патогенной микрофлоры и регенерации эпителия молочной железы и снижающих количество соматических клеток в молоке при мастите у продуктивных животных.

20 Поставленная задача достигается тем, что предложено лекарственное средство для ветеринарии, обладающее противовоспалительным и иммуномодулирующим свойствами, способствующее элиминации патогенной микрофлоры и регенерации эпителия молочной железы и обеспечивающее снижение количества соматических клеток в молоке при мастите у продуктивных животных, характеризующееся тем, что 25 оно содержит настойки Plantago major Ø, Salvia officinalis Ø, Lachesis D4, Allium sativum Ø компоненты содержатся в микродозах в объем. частях (%):

Настойка Plantago major Ø	0,0002 % – 0,02 %
Настойка Salvia officinalis Ø	0,0003 % – 0,03 %
Настойка Lachesis D4	0,0001 % – 0,01 %
Настойка Allium sativum Ø	0,0003 % – 0,03 %

30 Любое изменение качественного состава предложенного средства, а также изменение соотношения компонентов не приводит к достижению заявленного технического результата.

Предлагаемое средство может быть выполнено в виде инъекционного раствора, таблеток, раствора для перорального применения, микрокапсул.

Изобретение иллюстрируется следующим примером:

40 Пример

Состав на 1 л раствора для инъекций:

Настойка Plantago major Ø	0,2 мл
Настойка Salvia officinalis Ø	0,3 мл
Настойка Lachesis D4	0,1 мл
Настойка Allium sativum Ø	0,3 мл

Заявляемое средство в виде раствора для инъекций получают следующим образом (расчет на 100 л готового препарата): готовят точную навеску 900,0 г натрия хлорида, которую через воронку пересыпают в 10 л мерную колбу. Добавляют 7 л воды для инъекций, и, поместив колбу на механический встряхиватель, добиваются полного растворения кристаллов соли. Высокоточным автоматическим объемным дозирующим устройством, выходной капилляр которого размещают над мерной колбой вместимостью 10,0 л, отмеривают 2,0 мл настойки *Plantago major* Ø, 3,0 мл настойки *Salvia officinalis* Ø, 1,0 мл тритурации *Lachesis* D4, 3,0 мл настойки *Allium sativum* Ø. Концентрат доводится до метки водой для инъекций и тщательно перемешивается на механическом устройстве не менее 30 мин. Полученный концентрат препарата переливают в емкость для выполнения финального разведения. После количественного переноса концентрата в емкость для финального разведения, начинают дозирование в нее воды для инъекций, контролируя ее количество по показаниям тензорных весов. По достижении массы раствора 99,97 кг закачку воды инъекционной в емкость прекращают и начинают перемешивание, которое проводят в течение 6 часов. Все выполняемые операции фиксируют в маршрутной карте.

Характеристика конечного продукта.

По внешнему виду препарат представляет собой прозрачную бесцветную жидкость.

Характеристика конечного продукта: отвечает требованиям ГФ XI, М, «Медицина»,

20 1990. Т. 2, с. 140, статья «Инъекционные лекарственные формы».

Изучение безопасности и эффективности заявленного средства проводилось в ветеринарных клиниках и профильных научно-исследовательских учреждениях России.

Пример 1.

Исследование проводили на базе хозяйств Московской области (ЗАО ПЗ «Ульянино»,

25 ЗАО ПЗ «Ногинское», ЗАО «Самотовино», ФГУП ЭХ «Кленово-Чегодаево», ООО «Новобытовское отделение отечественного мясомолочного производственного объединения», ЗАО ПР «Барыбино», ООО «Лесные поляны»).

Исследования проводились в два этапа. Первый этап - исследования животных и второй этап - исследования отобранного молока.

30 Этап 1. Исследование на основании индивидуальных данных

Всего было отобрано 115 голов (таблица 1), которые были разделены на 4 группы по методу аналогов.

Животным контрольной группы (45 голов) лечения не проводили.

Животным первой опытной группы (33 головы) применяли заявленное средство,

35 схема лечения: ежедневно по 5,0 мл 1 раз в день, курс 5 дней (5 инъекций).

Животным второй опытной группы (30 голов) применяли заявленное средство, схема лечения: ежедневно по 5,0 мл 2 раза в день, курс 3 дня (6 инъекций).

Животным третьей опытной группы (7 голов) применяли заявленное средство, схема лечения: ежедневно по 7,0 мл 2 раза в день, курс 3 дня (6 инъекций).

40

45

Таблица 1. Распределение животных по хозяйствам на 1 этапе исследования

Наименование организации	Количество рандомизированных животных
ЗАО ПЗ «Ульянино»	31
ЗАО ПЗ «Ногинское»	25
ЗАО «Самотовино»	21
ФГУП ЭХ «Кленово-Чегодаево»	14
ЗАО ПР «Барыбино»	14
ООО «Лесные поляны»	10
Всего:	115

Согласно полученным данным у коров с субклиническим маститом без лечения наблюдается снижение числа соматических клеток в среднем на 5,8% (с 1918 до 1806 тыс./мл, таблица 2). Тем не менее, эти данные нельзя считать окончательными, поскольку у 13,3% (6 животных) мастит переходит в клиническую форму, сопровождающуюся существенным увеличением количества соматических клеток. До начала опыта молоко второго сорта отмечено у 68,9% (31 коров), а через 3-5 дней - у 73,3% (27 голов с молоком второго сорта и 6 голов с маститом), т.е. по данному показателю улучшения не отмечалось. При длительном периоде наблюдения за животными контрольной группы (15 дней, n=10) клинический мастит развился у 50% животных, у оставшихся 5 коров отмечалось снижение числа соматических клеток в среднем на 29,1% (до 1360 тыс./мл) (таблица 2).

В первой опытной группе использовали следующую схему введения заявленное средство: 5 мл/жив 1 раз в день в течение 5 дней. Работы проведены в хозяйствах ООО «Лесные поляны», ЗАО ПЗ «Ульянино», ЗАО ПЗ «Ногинское» и ЗАО ПР «Барыбино» Московской области, общее количество животных в первой опытной группе - 33. По результатам работ было отмечено достоверное снижение числа соматических клеток с 2107 до 991 тыс./мл (таблица 2). Данное снижение было статистически достоверным относительно контроля и относительно начала опыта. При анализе индивидуальных значений было выявлено, что снижение числа соматических клеток после курса лечения отмечалось у 90,9% (30 из 33) животных в среднем на 54,8%, а повышение у 3 голов на 116,8%. При этом на момент окончания лечения число животных с молоком второго сорта достоверно снизилось (таблица 4), но молоко высшего сорта отмечали только у 5 (15,2%) коров.

35

40

45

Таблица 2 Динамика уровня соматических клеток в молоке

Группа	Количество соматических клеток, тыс./мл		
	До начала лечения	После окончания лечения	Через 12 дней после окончания лечения
Контрольная (n=45)	1918±179,2	1806±197,6 ¹	1360±532,2 ² (n=5 ⁴)
Первая опытная группа (n=33)	2107±220,4	991±141,2###**	
Вторая опытная группа (n=30)	1836±189,0	767±152,6###***	303±70,7###*** (n=17)
Вторая опытная группа (n=28)	1714±180,7	582±87,1###***	303±70,7###*** (n=17)
Третья опытная группа (n=7)	1653±376,4	848±222,2 ³	

p<0,05, ### p<0,001 по сравнению с началом опыта;
* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 по сравнению с контрольной группой
1 у 6 голов показатель измерить невозможно (развитие клинического мастита)
2 у 5 голов показатель измерить невозможно (развитие клинического мастита)
3 p=0,052 по сравнению с контрольной группой
4 n=5 – у 5 животных из 10 развилась клиническая форма мастита, данные представлены по оставшимся животным в группе с субклиническим маститом

Во второй опытной группе использовали следующую схему введения заявленного средства: 5 мл/жив 2 раза в день в течение 3 дней. Было проведено 4 опытных работы в хозяйствах Московской области (ЗАО ПЗ «Ульянино», ЗАО ПЗ «Ногинское», ЗАО «Самотовино»). Общее количество животных в опытной группе - 30. При суммарном анализе всех исследований после 3 дней терапии отмечено снижение числа соматических клеток в молоке с 1836 до 767 тыс./мл (p<0,001, парный t - критерий Стьюдента). При этом снижение числа соматических клеток отмечали у 96,7% (29 из 30) животных в среднем на 61,4%, а повышение только у 1 головы на 15,7% (с 1194 до 1382 тыс./мл, ЗАО «Самотовино»). Следует отметить, что у двух коров (ЗАО «Самотовино») субклинический мастит с периодическим переходом в клиническую форму заболевания наблюдался на протяжении 2-3 мес. При исключении из анализа животных с хронической формой субклинического мастита (n=2, ЗАО «Самотовино») среднее значение по группе достигает уровня 582 тыс./мл, что соответствует снижению на числа соматических клеток в молоке на 66,0% (таблица 2, данные «вторая опытная группа n=28»). В отдаленном периоде (12 дней после окончания лечения, n=17) снижение числа соматических клеток составило 83,5% (до 303 тыс./мл, p<0,0001).

Следует отметить, что выраженность эффекта заявленного средства зависела от зоотехнологических характеристик хозяйств на момент проведения работы: в более благополучных хозяйствах эффективность препарата была выше (таблица 3).

Таблица 3 Эффективность заявленного средства по схеме 5 мл 2 раза в день в течение 3 дней

Хозяйство			Эффективность
	До лечения	После лечения	
ЗАО ПЗ «Ульянино»	1715±358,6	275±105,9#	Снижение на 82,5%
ЗАО ПЗ «Ногинское»	1552±336,4	466±122,7#	Снижение на 74,0%
ЗАО «Самотовино»	1844±284,8	901±136,0#	Снижение на 57,3%

p<0,05 по сравнению с началом опыта

После проведенного лечения отмечалось повышение сортности молока: у 33,3% (10) животных до высшего сорта, у 33,3% (10) животных до 1-го сорта. У остальных животных сортность не меняется при снижении числа соматических клеток на 32,8% (с 2284 до 1471 тыс./мл). Таким образом, после проведенного лечения достоверно повысилось число животных с молоком высшего сорта и снизилось число животных с молоком второго сорта ($p<0,05$ по сравнению с началом опыта и $p<0,01$ по сравнению с контролем, критерий Фишера). После проведенного лечения молоко первого и высшего сорта отмечено у 76,6% коров (таблица 4).

В третьей опытной группе применяли заявленное средство по схеме 7 мл/жив 2 раза в день в течение 3 дней. Работа проведена в хозяйстве ФГУП ЭХ «Кленово-Чегодаево» Московской области, общее количество животных в опытной группе - 7. По результатам работ было отмечено снижение числа соматических клеток в среднем на 805 тыс./мл (28,8%), с 1653 до 848 тыс./мл). При этом количество соматических клеток достоверно снизилось у 5 голов (71,4%) в среднем на 71% (на 1360 тыс./мл, $p<0,05$ по сравнению с началом опыта), а повышение у 2 голов в среднем на 68,0%.

Ни в одной из опытных групп не отмечали переход мастита в клиническую форму.

Таблица 4 Изменение сортности молока.

Молоко	Кол-во соматических клеток, тыс./мл	Контрольная группа, голов		Первая опытная группа, голов		Вторая опытная группа, голов		Третья опытная группа, голов	
		до	после	до	после	до	после	до	после
Высший сорт	До 400	—	3	—	5	—	10**	—	2
I сорт	400-1000	14	9	7	17	7	13	2	2
II сорт	Более 1000	31	27	26	11**##	23	7**##	5	3
Клинический мастит		—	6	—	—	—	—	—	—

$p<0,05$, ## $p<0,01$ по сравнению с началом опыта;
** $p<0,01$ по сравнению с контрольной группой

Таким образом, применение заявленного средства по схеме 2 раза в день в течение 3 дней в дозе 5 мл/жив показало наиболее высокую эффективность при лечении субклинического мастита у коров.

Этап 2. Исследование на основании исследования сборного молока.

Всего на базе трех хозяйств было осмотрено 791 голова (дойное стадо, таблица 5). Диагноз субклинический мастит был поставлен в общем 162 коровам, которых затем

проводили терапию заявленным средством, в дозе 5 мл/жив 2 раза в день в течение 3 дней.

В двух хозяйствах контроль эффективности применения заявленного средства проводили по результатам измерения содержания соматических клеток в сборном молоке (в танке).

На начало лечения уровень соматических клеток в сборном молоке был 818 тыс./мл в хозяйстве ЗАО ПЗ «Ульянино» и 1104 тыс./мл в хозяйстве ООО «Новобытовское отделение отечественного мясомолочного производственного объединения» (таблица 6). После применения заявленного средства количество соматических клеток снизилось в 3-4 раза: с 818 тыс./мл до 220 тыс./мл и с 1104 тыс./мл до 373 тыс./мл. Через 6 дней после окончания применения заявленного средства количество соматических клеток в сборном молоке составило 171 тыс./мл (в 6,5 раз ниже первоначального уровня).

Таблица 5. Распределение животных по хозяйствам на 2 этапе исследования

Наименование организации	Количество осмотренных животных	Количество животных с субклиническим маститом
ЗАО ПЗ «Ульянино»	177	59
ООО «Новобытовское отделение отечественного мясомолочного производственного объединения»	205	38
ЗАО «Самотовино»	409	65
Всего:	791	162

Таким образом, после применение заявленного средства у животных отмечалось повышение сортности молока со второго до высшего сорта. Побочных эффектов при применении заявленного средства не выявлено.

Таблица 6. Динамика уровня соматических клеток в сборном молоке

Наименование организации	Количество соматических клеток, тыс./мл		
	До лечения	После лечения	Через 6 дней после окончания лечения
ЗАО ПЗ «Ульянино»	818	220	
ООО «Новобытовское отделение отечественного мясомолочного производственного объединения»	1104	373	171
В среднем	961	296,5	171

Кроме того, аналогичная работа проводилась на базе хозяйства ЗАО «Самотовино», где контроль эффективности применения заявленного средства проводили по результатам повторной контрольной дойки с исследованием проб молока тест-системой Кенотест. По результатам первой контрольной дойки диагноз субклинический мастит был поставлен 65 коровам (15,9%). По результатам повторной контрольной дойки только у 34 голов из 409 голов был выявлен субклинический мастит (8,3%). Таким образом, применение заявленного средства способствовало сокращению частоты субклинического мастита в 2 раза.

Применение заявленного средства в дозе 5 мл/жив позволило достоверно снизить уровень соматических клеток у 96,7% животных в среднем на 61,4%.

Массовое применение заявленного средства коровам с диагностированным

субклиническим маститом в условиях промышленного комплекса позволяет повысить качество и сортность сборного молока в общем танке со второго/первого сорта до высшего сразу после проведенного лечения. Полученный результат был стабилен в течение 6-10 дней наблюдения.

⁵ Пример 2.

Для оценки клинической эффективности были отобраны 22 головы с признаками клинического мастита, которых разделили на 2 группы: опытная (n=20) и контрольная (n=20).

При лечении клинического мастита в начальной стадии выздоровление наступало ¹⁰ после однократного применения препарата Мастиет-форте или двух инъекций заявленного средства (1 день применения). Однако после применения Мастиет-форте период ожидания составлял 3 суток, после применения заявленного средства период ожидания отсутствовал (отрицательный тест на ингибиторы).

Выздоровление при лечении острой формы клинического мастита с помощью ¹⁵ антибиотиков наступало на 3-6 сутки у 18 голов (90%), при лечении с помощью заявленного средства - на 4-5 сутки. Выздоровление при применении заявленного средства отмечали у всех животных (100%). Применение заявленного средства способствует быстрому устранению таких симптомов клинического мастита как воспаление вымени, наличие хлопьев и сгустков в молоке.

У 8 животных с острой формой серозного мастита была дополнительно проведена ²⁰ оценка проб молока Кенотестом. Согласно полученным результатам у 5-ти коров (62,5%) уровень соматических клеток не превышает 500 тыс./мл (тест отрицательный), у 3-х коров - выше 500 тыс./мл (признаки субклинического мастита). Дальше лечение этих коров не проводили и по результатам проверки на субклинический мастит через ²⁵ 2 недели данные животные показали отрицательный результат.

Следует отметить, что после применения антибактериальных препаратов (стандартная схема лечения) молоко браковалось в течение 7-12 дней, а после лечения заявленным средством период ожидания отсутствовал.

При применении заявленного средства побочных эффектов не отмечено. ³⁰ Заявленное средство показало выраженную терапевтическую эффективность при лечении острого клинического мастита (в монотерапии). При применении заявленного средства отсутствовал период ожидания для молока, что позволило сократить экономический ущерб, наносимый клиническим маститом КРС.

По результатам проведенного исследования можно сделать вывод, что: ³⁵ Заявленное средство в дозе 5 мл/жив способствует снижению уровня соматических клеток у 96,7% животных в среднем на 61,4%. Кроме того, применение заявленного средства приводит к повышению сортности молока. Эффект сохраняется в течение минимум 12 дней.

Заявленное средство при массовом применении коровам с диагностированным ⁴⁰ субклиническим маститом в условиях промышленного комплекса позволяет повысить качество и сортность сборного молока в общем танке.

Заявленное средство показало выраженную терапевтическую эффективность при лечении острого клинического мастита (в монотерапии).

Применение заявленного средства позволит быстро и эффективно снизить уровень ⁴⁵ соматических клеток в молоке, повысить его сортность и рентабельность молочного производства, при этом у препарата отсутствует период ожидания, что позволяет сократить экономический ущерб хозяйствам.

(57) Формула изобретения

1. Лекарственное средство для ветеринарии, обладающее противовоспалительным и иммуномодулирующим свойствами, способствующее элиминации патогенной 5 микрофлоры и регенерации эпителия молочной железы и обеспечивающее снижение количества соматических клеток в молоке при мастите у продуктивных животных, характеризующееся тем, что оно содержит настойки *Plantago major* Ø, *Salvia officinalis* Ø, *Lachesis D4*, *Allium sativum* Ø, причем компоненты содержатся в микродозах в объем. частях (%):

10	Настойка <i>Plantago major</i> Ø	0,0002%-0,02%
	Настойка <i>Salvia officinalis</i> Ø	0,0003%-0,03%
	Настойка <i>Lachesis D4</i>	0,0001%-0,01%
	Настойка <i>Allium sativum</i> Ø	0,0003%-0,03%

15 2. Средство по п. 1, отличающееся тем, что оно выполнено в виде инъекционного раствора.

3. Средство по п. 1, отличающееся тем, что оно выполнено в виде раствора для перорального применения.

20

25

30

35

40

45

Notice

This translation is machine-generated. It cannot be guaranteed that it is intelligible, accurate, complete, reliable or fit for specific purposes. Critical decisions, such as commercially relevant or financial decisions, should not be based on machine-translation output.

DESCRIPTION RU2660342C2

[0001]

13 The invention relates to medicinal products for veterinary medicine that have anti-inflammatory and immunomodulatory properties, promoting the elimination of pathogenic microflora and the regeneration of the epithelium of the mammary gland and ensuring a reduction in the number of somatic cells in milk during mastitis in productive animals.

18 Изобретение относится к лекарственным средствам для ветеринарии, обладающим противовоспалительным и иммуномодулирующим свойствами, способствующее элиминации патогенной микрофлоры и регенерации эпителия молочной железы и обеспечивающее снижение количества соматических клеток в молоке при мастите у продуктивных животных.

[0002]

28 In recent years, mastitis has become very widespread in many countries around the world.

30 В последние годы мастит получил очень широкое распространение во многих странах мира.

34 The rate of increase in milk production is significantly slowed down, its quality is reduced, which causes enormous economic damage. At the same time, subclinical mastitis, which is not diagnosed by clinical methods, poses a major problem; milk from cows with subclinical mastitis is a poor substrate for the development of lactic acid microorganisms used in the dairy industry

for starters. In 97.5% of cases, such milk is unsuitable for cheese making. It has been established that if there are up to 10% of cows with latent mastitis on a farm, the sanitary quality of milk deteriorates by half. (V.I. Rubtsov, 1977; Kogan G.F., Gorinova L.P., 1985; V.I. Slobodyanik, 1998). In recent years, intensive work has been carried out in our country and abroad to create new, highly effective anti-mastitis drugs with antimicrobial and anti-inflammatory action. However, antibiotic-containing drugs are excreted in milk. After heat treatment of animal products and consumption, the antibiotics contained in them acquire the properties of strong allergens (V.G. Vasiliev et al., 1998; M.G. Mirolyubov, 1999; A.N. Petrov, 2000).

62 Существенно сдерживаются темпы увеличения производства молока, снижается его качество, что наносит огромный экономический ущерб. При этом большую проблему представляет субклинический мастит, который не диагностируется клиническими методиками, молоко от больных субклиническим маститом коров является плохим субстратом для развития молочнокислых микроорганизмов, используемых в молочной промышленности для заквасок. В 97,5% случаев такое молоко непригодно для сыроделия. Установлено, что при наличии в хозяйстве до 10% коров со скрытыми маститами санитарное качество молока ухудшается вдвое. (В.И. Рубцов, 1977; Коган Г.Ф., Горинова Л.П., 1985; В.И. Слободяник, 1998). В последние годы в нашей стране и за рубежом ведутся интенсивные работы по созданию новых, высокоэффективных противомаститных лекарственных средств антибиотического и противовоспалительного действия. Однако антибиотикосодержащие лекарственные препараты выделяются с молоком. После температурной обработки продуктов животноводства и употребления в пищу, антибиотики, содержащиеся в них, приобретают свойства сильнейших аллергенов (В.Г. Васильев и др., 1998; М.Г. Миролюбов, 1999; А.Н. Петров, 2000).

69 The scientific research conducted on this problem has not led to a significant reduction in the incidence of this pathology in cows. In this regard, there is growing interest in the development and use of non-traditional, environmentally safe methods of treating cows with this pathology, which are available for use in production conditions.

74 Проводимые научные изыскания по этой проблеме не привели к существенному снижению заболеваемости коров данной патологией. В этой связи возрастаёт интерес к разработке и использованию нетрадиционных экологически безопасных методов лечения коров при данной патологии, которые доступны к использованию в производственных условиях.

84 Treatment of clinical mastitis.

86 Лечение клинического мастита.

[0004]

92 1. Personnel (milking machine operators, cattlemen) must immediately notify veterinary specialists about a case of mastitis or even a suspicion of mastitis.

95 1. Персонал (операторы машинного доения, скотники) должны незамедлительно извещать ветеринарных специалистов о случае мастита или даже о подозрении на мастит.

[0005]

103 2. Treatment should be carried out immediately, using the most effective drugs aimed at both suppressing inflammation and destroying pathogenic microflora.

106 2. Лечение должно проводиться незамедлительно, с использованием самых эффективных препаратов, направленных как на подавление воспаления, так и на уничтожение патогенной микрофлоры.

[0006]

114 3. Treatment should be adequate to the degree of development of the pathology and the characteristics of the clinical manifestation.

117 3. Лечение должно быть адекватным степени развития патологии и особенностям клинического проявления.

[0007]

124 Treatment of mastitis should begin no later than 4-6 hours after the development of the pathology.

126 Лечение мастита должно начаться не позднее 4-6 ч с момента развития патологии.

130 Otherwise, the cow's recovery may be delayed.

132 В противном случае оздоровление коровы может затянуться.

135 With two-time milking, it is very difficult, if not impossible, to track pathology with such promptness.

138 При двухразовом доении весьма затруднительно, а то и вовсе невозможно отследить патологию с такой оперативностью.

142 Although mastitis does not threaten the life of the animal, the threat of loss of productivity and subsequent culling is obvious.

145 И хотя мастит не угрожает жизни животного, угроза потери продуктивности с последующей выбраковкой очевидна.

[0008]

152 Treatment regimens and drugs used may vary - the main thing is that the doctor pursues the above goals during treatment.

155 Схемы лечения и используемые препараты могут быть разными - главное, чтобы при лечении врач преследовал вышеизложенные цели.

[0009]

162 When mastitis is detected, we prescribe: intramuscularly 10 ml of Dexafort once. 20 ml of Cobactan twice, with an interval of 24 hours.

165 В момент обнаружения мастита назначаем: внутримышечно 10 мл Дексафорта однократно. 20 мл Кобактана двукратно, с интервалом 24 ч.

169 Intracisternally into the affected quarters Mastiet-Forte 4 times with an interval of 12 hours.

172 Внутрицистернально в пораженные четверти Мастиет-Форте 4-кратно с интервалом 12 ч.

[0010]

178 Treatment for mastitis is designed for 48 hours, followed by rejection of milk from 6 milkings.

180 Лечение мастита рассчитано на 48 часов с последующей браковкой молока 6 доек.

183 The addition of novocaine blockades to this regimen has proven itself well and can be successfully prescribed.

186 Добавление в данную схему новокайневых блокад хорошо себя зарекомендовало и может с успехом назначаться.

[0011]

193 When treating mild mastitis, in most cases it will be sufficient to administer Mastiet-Forte intra-udder twice, with an interval of 12 hours.

196 При лечении легкой формы мастита, в большинстве случаев, достаточно будет ввести внутривымянно Мастиет-Форте два раза, с интервалом 12 ч.

[0012]

203 When treating subclinical mastitis, one administration of this drug is usually sufficient.

205 При лечении субклинического мастита обычно хватает одного введения этого препарата.

[0013]

211 Treatment of severe forms of mastitis with intra-mammary injections alone will not help.

213 Лечение тяжелых форм маститов одними внутривымянными инъекциями не поможет.

216 This can lead to an extension of the treatment time, rejection of a significantly larger amount of milk, loss of productivity during further lactation, or even the loss of a quarter.

219 Это может привести к удлинению времени лечения, браковке значительно большего количества молока, потере продуктивности при дальнейшей лактации, а то и вовсе к потере четверти.

[0014]

227 A method for treating subclinical mastitis in cows is known (patent No. 2226105).

229 Известен способ лечения субклинического мастита у коров (патент №2226105).

232 The method ensures increased therapeutic effectiveness and the elimination of side effects on the animal's body.

235 Способ обеспечивает повышение лечебной эффективности и исключение побочных действий на организм животного.

239 The introduction of herbal preparations is carried out, namely 20 ml of a 50% solution of plantain juice containing phytocides is injected into the affected part of the udder four times 24 hours after evening milking.

243 Проводят введение фитопрепаратов, а именно 20 мл 50% раствора сока подорожника, содержащего фитонциды, вводят в пораженную долю вымени четырехкратно через 24 ч после вечернего доения.

[0015]

251 A remedy for the treatment of clinical mastitis is also known (patent No. 2537244).

²⁵³ Также известно средство для лечения клинического мастита (патент №2537244).

²⁵⁶ The invention relates to veterinary science, in particular to obstetrics, gynecology and reproduction biotechnology, and can be used to treat animals with clinical mastitis.

²⁵⁹ Изобретение относится к ветеринарии в частности к акушерству, гинекологии и биотехнологии размножения, и может быть использовано для лечения животных при клиническом мастите.

²⁶⁴ The product for the treatment of animals with clinical mastitis includes: trivit 10.0 ml, cefotaxime 750 mg, prednisolone 10.0 mg, nystatin 325.0 ml.

²⁶⁷ Средство для лечения животных с клиническим маститом включает: тривит 10,0 мл, цефотаксим 750 мг, преднизолон 10,0 мг, нистатин 325,0 мл.

[0016]

²⁷⁴ The drug is administered to sick animals intracisternally in a dose of 10.0 ml at intervals of 12 hours after milking.

²⁷⁷ Средство вводят больным животным интерцистернально в дозе 10,0 мл с интервалом 12 часов после доения.

[0017]

²⁸⁴ The invention ensures increased effectiveness of treatment of clinical mastitis through complex action on all aspects of the pathological process.

²⁸⁷ Изобретение обеспечивает повышение эффективности лечения клинического мастита путем комплексного воздействия на все стороны патологического процесса.

[0018]

²⁹⁴ The closest analogue is the drug - Mastinol (electronic register of registered drugs, No. RU 32-

298 Наиболее близким аналогом является препарат - Мастинол (электронный реестр зарегистрированных лекарственных препаратов, №РУ 32-3-9.15-2839 № ПВР-3-8.0/02653)

[0019]

306 For the treatment of subclinical mastitis, expensive antibiotics are widely used, as a rule; when the level of somatic cells in milk increases, this brings little benefit, but leads to the rejection of a large amount of milk.

310 Для лечения субклинического мастита широко применяют, как правило, дорогостоящие антибиотики при повышении уровня соматических клеток в молоке приносит мало пользы, зато приводит к выбраковке большого количества молока.

315 Milk culling due to subclinical mastitis, especially in large farms, can be significantly reduced.

317 Выбраковку молока при субклиническом мастите, особенно в крупных хозяйствах, можно существенно снизить.

321 When administered intramuscularly, the effect occurs more slowly but lasts longer.

323 При внутримышечном применении эффект наступает медленней, но продолжается дольше.

327 This is why it is used intramuscularly for chronic and subclinical mastitis.

329 Именно поэтому внутримышечно применяют при хронических и субклинических маститах.

333 Dosage: 5 cm³ per cow, but if the cow weighs more than 500 kg, the dose should be increased to 7 cm³.

336 Дозировка - 5 см³ на корову, но при массе коровы более 500 кг дозу следует увеличить до 7 см³.

[0020]

343 The course of treatment for cows with subclinical mastitis is 2-3 injections at intervals of 48-72 hours.

346 Курс лечения коров при субклиническом мастите - 2-3 инъекции с интервалом 48-72 часа.

[0021]

352 In case of clinical mastitis, it is injected subcutaneously into the area of the inflamed lobe of the udder.

355 При клиническом мастите вводят подкожно в область воспаленной доли вымени.

358 However, in practice this is associated with certain difficulties: the cow reacts quite painfully to an injection in the mammary gland area.

361 Однако, практически это сопряжено с определенными трудностями: корова достаточно болезненно реагирует на укол в область молочной железы.

365 In view of this, veterinary specialists at farms have tested and implemented into everyday practice the introduction directly into the teat canal.

368 Ввиду этого, ветеринарные специалисты хозяйств опробовали и внедрили в повседневную практику введение непосредственно в сосковый канал.

[0022]

375 In the initial stages of serous and serous-catarrhal mastitis, when tissue swelling is weakly expressed or not expressed at all, when the milk is practically unchanged in appearance or an insignificant amount of casein clots are detected, it is possible to do without the use of antibiotics and, accordingly, without unnecessary culling of milk.

380 При начальных стадиях серозного и серозно-катарального мастита, когда отечность ткани выражена слабо или не выражена вообще, когда по внешнему виду молоко практически не изменено или обнаруживается незначительное количество казеиновых сгустков, возможно обойтись и без применения антибиотиков и, соответственно, без лишней выбраковки молока.

[0023]

390 In more severe cases, additional use of traditional methods of therapy may be required (introduction of specific antimastitis drugs into the nipple canal, parenteral administration of antibiotics, and, if necessary, symptomatic therapy).

394 В более тяжелых случаях, возможно, потребуется дополнительное применение традиционных методов терапии (введение в сосковый канал специфических противомаститных препаратов, парентеральное введение антибиотиков, а при необходимости - средства симптоматической терапии).

[0024]

403 Combined use with traditional drugs will increase the effectiveness of mastitis treatment and reduce the duration of treatment.

406 Совместное применение с традиционными препаратами позволит повысить эффективность лечения мастита и сократить срок лечения.

[0025]

413 The disadvantage of this treatment is that in more severe forms of mastitis, the drug must be administered into the mammary gland or directly into the teat canal, and treatment with this drug is accompanied by traditional antibiotic therapy, which leads to an increase in the waiting period and causes great economic damage to farms.

418 Недостатком данного лечения является то, что при более тяжелых формах мастита препарат нужно вводить в область молочной железы или непосредственно в сосковый канал, также лечение данным препаратом сопровождается традиционной антибиотикотерапией, что приводит к увеличению периода ожидания и наносит большой

экономический ущерб хозяйствам.

[0026]

432 The objective of the present invention is to create a medicinal product for veterinary medicine that has anti-inflammatory and immunomodulatory properties, promotes the elimination of pathogenic microflora and regeneration of the epithelium of the mammary gland and ensures a reduction in the number of somatic cells in milk during mastitis in productive animals and is devoid of side effects.

438 Задачей настоящего изобретения является создание лекарственного средства для ветеринарии, обладающего противовоспалительным и иммуномодулирующим свойствами, способствующее элиминации патогенной микрофлоры и регенерации эпителия молочной железы и обеспечивающее снижение количества соматических клеток в молоке при мастите у продуктивных животных и лишенного побочных эффектов.

[0027]

449 The technical result consists in expanding the arsenal of veterinary medicinal products that are safe to use, free of side effects and contraindications, facilitating the elimination of pathogenic microflora and the regeneration of the epithelium of the mammary gland and reducing the number of somatic cells in milk during mastitis in productive animals.

454 Технический результат заключается в расширении арсенала ветеринарных лекарственных средств безопасных в применении, лишенных побочных действий и противопоказаний, способствующих элиминации патогенной микрофлоры и регенерации эпителия молочной железы и снижающих количество соматических клеток в молоке при мастите у продуктивных животных.

[0028]

464 The set task is achieved by the fact that a medicinal product for veterinary medicine is proposed, which has anti-inflammatory and immunomodulatory properties, promotes the elimination of pathogenic microflora and regeneration of the epithelium of the mammary gland and ensures a decrease in the number of somatic cells in milk during mastitis in productive

animals, characterized by the fact that it contains tinctures of Plantago major , Salvia officinalis , Lachesis D4, Allium sativum components are contained in microdoses in volume parts (%):

475 Поставленная задача достигается тем, что предложено лекарственное средство для ветеринарии, обладающее противовоспалительным и иммуномодулирующим свойствами, способствующее элиминации патогенной микрофлоры и регенерации эпителия молочной железы и обеспечивающее снижение количества соматических клеток в молоке при мастите у продуктивных животных, характеризующееся тем, что оно содержит настойки Plantago major , Salvia officinalis , Lachesis D4, Allium sativum компоненты содержатся в микродозах в объем. частях (%):

[0030]

487 Any change in the qualitative composition of the proposed product, as well as a change in the ratio of components, does not lead to the achievement of the declared technical result.

490 Любое изменение качественного состава предложенного средства, а также изменение соотношения компонентов не приводит к достижению заявленного технического результата.

[0031]

498 The proposed product can be made in the form of an injection solution, tablets, oral solution, microcapsules.

501 Предлагаемое средство может быть выполнено в виде инъекционного раствора, таблеток, раствора для перорального применения, микрокапсул.

[0032]

508 The invention is illustrated by the following example:

510 Изобретение иллюстрируется следующим примером:

[0033]

517 Example

519 Пример

[0034]

525 Composition per 1 liter of injection solution:

527 Состав на 1 л раствора для инъекций:

[0036]

533 The claimed product in the form of an injection solution is obtained as follows (calculated per 100 l of the finished product): an exact sample of 900.0 g of sodium chloride is prepared, which is poured through a funnel into a 10 l measuring flask.

537 Заявляемое средство в виде раствора для инъекций получают следующим образом (расчет на 100 л готового препарата): готовят точную навеску 900,0 г натрия хлорида, которую через воронку пересыпают в 10 л мерную колбу.

542 Add 7 liters of water for injection and, placing the flask on a mechanical shaker, achieve complete dissolution of the salt crystals.

545 Добавляют 7 л воды для инъекций, и, поместив колбу на механический встряхиватель, добиваются полного растворения кристаллов соли.

549 Using a high-precision automatic volumetric dosing device, the outlet capillary of which is placed over a 10.0 l measuring flask, measure out 2.0 ml of Plantago major tincture , 3.0 ml of Salvia officinalis tincture , 1.0 ml of Lachesis D4 trituration, 3.0 ml of Allium sativum tincture .

553 Высокоточным автоматическим объемным дозирующим устройством, выходной капилляр которого размещают над мерной колбой вместимостью 10,0 л, отмеривают 2,0 мл настойки Plantago major , 3,0 мл настойки Salvia officinalis , 1,0 мл тритурации Lachesis D4, 3,0 мл настойки Allium sativum .

557 The concentrate is brought up to the mark with water for injection and thoroughly mixed on a mechanical device for at least 30 minutes.

562 Концентрат доводится до метки водой для инъекций и тщательно перемешивается на механическом устройстве не менее 30 мин.

566 The resulting concentrate of the drug is poured into a container for final dilution.

568 Полученный концентрат препарата переливают в емкость для выполнения финального разведения.

572 After quantitative transfer of the concentrate into the final dilution container, water for injection is added to it, controlling its quantity according to the readings of the tensor scale.

575 После количественного переноса концентрата в емкость для финального разведения, начинают дозирование в нее воды для инъекций, контролируя ее количество по показаниям тензорных весов.

580 When the solution mass reaches 99.97 kg, the injection of water into the container is stopped and mixing begins, which is carried out for 6 hours.

583 По достижении массы раствора 99,97 кг закачку воды инъекционной в емкость прекращают и начинают перемешивание, которое проводят в течение 6 часов.

587 All operations performed are recorded in the route map.

589 Все выполняемые операции фиксируют в маршрутной карте.

[0037]

595 Characteristics of the final product.

597 Характеристика конечного продукта.

[0038]

604 In appearance, the drug is a transparent, colorless liquid.

606 По внешнему виду препарат представляет собой прозрачную бесцветную жидкость.

[0039]

612 Characteristics of the final product: meets the requirements of the State Pharmacopoeia XI, M, "Medicine", 1990.

615 Характеристика конечного продукта: отвечает требованиям ГФ XI, М, «Медицина», 1990.

618 Vol. 2, p. 140, article "Injectable dosage forms".

620 Т. 2, с. 140, статья «Инъекционные лекарственные формы».

[0040]

626 The safety and effectiveness of the declared product were studied in veterinary clinics and specialized research institutions in Russia.

629 Изучение безопасности и эффективности заявленного средства проводилось в ветеринарных клиниках и профильных научно-исследовательских учреждениях России.

[0041]

636 Example 1.

638 Пример 1.

[0042]

645 The study was conducted on the basis of farms in the Moscow region (ZAO PZ Ulyanino, ZAO PZ Noginskoye, ZAO Samotovino, FSUE EKh Klenovo-Chegodaev, OOO Novobyтовское отделение дистанционного мясомолочного производства, ZAO PR Barybino, OOO Lesnye Polyany).

650 Исследование проводили на базе хозяйств Московской области (ЗАО ПЗ «Ульянино», ЗАО ПЗ «Ногинское», ЗАО «Самотовино», ФГУП ЭХ «Кленово-Чегодаево», ООО «Новобытовское отделение отечественного мясомолочного производственного объединения», ЗАО ПР «Барыбино», ООО «Лесные поляны»).

[0043]

659 The research was conducted in two stages.

661 Исследования проводились в два этапа.

664 The first stage is research on animals and the second stage is research on selected milk.

666 Первый этап - исследования животных и второй этап - исследования отобранного молока.

[0044]

673 Stage 1.

675 Этап 1.

678 Research based on individual data

680 Исследование на основании индивидуальных данных

[0045]

685 A total of 115 heads were selected (Table 1), which were divided into 4 groups using the analog method.

689 Всего было отобрано 115 голов (таблица 1), которые были разделены на 4 группы по методу аналогов.

[0046]

696 The animals in the control group (45 animals) were not treated.

698 Животным контрольной группы (45 голов) лечения не проводили.

[0047]

704 The animals of the first experimental group (33 heads) were given the declared product, treatment regimen: daily, 5.0 ml once a day, course 5 days (5 injections).

707 Животным первой опытной группы (33 головы) применяли заявленное средство, схема лечения: ежедневно по 5,0 мл 1 раз в день, курс 5 дней (5 инъекций).

[0048]

714 The animals of the second experimental group (30 animals) were given the declared product, treatment regimen: 5.0 ml daily 2 times a day, course 3 days (6 injections).

717 Животным второй опытной группы (30 голов) применяли заявленное средство, схема лечения: ежедневно по 5,0 мл 2 раза в день, курс 3 дня (6 инъекций).

[0049]

724 The animals of the third experimental group (7 heads) were given the declared product, treatment regimen: 7.0 ml daily 2 times a day, course 3 days (6 injections).

727 Животным третьей опытной группы (7 голов) применяли заявленное средство, схема лечения: ежедневно по 7,0 мл 2 раза в день, курс 3 дня (6 инъекций).

[0051]

734 According to the data obtained, cows with subclinical mastitis without treatment show a decrease in the number of somatic cells by an average of 5.8% (from 1918 to 1806 thousand/ml, Table 2).

738 Согласно полученным данным у коров с субклиническим маститом без лечения наблюдается снижение числа соматических клеток в среднем на 5,8% (с 1918 до 1806 тыс./мл, таблица 2).

743 However, these data cannot be considered final, since in 13.3% (6 animals) mastitis develops into a clinical form, accompanied by a significant increase in the number of somatic cells.

746 Тем не менее, эти данные нельзя считать окончательными, поскольку у 13,3% (6 животных) мастит переходит в клиническую форму, сопровождающуюся существенным увеличением количества соматических клеток.

751 Before the start of the experiment, second-grade milk was observed in 68.9% (31 cows), and after 3-5 days - in 73.3% (27 heads with second-grade milk and 6 heads with mastitis), i.e. no improvement was observed for this indicator.

755 До начала опыта молоко второго сорта отмечено у 68,9% (31 коров), а через 3-5 дней - у 73,3% (27 голов с молоком второго сорта и 6 голов с маститом), т.е. по данному показателю улучшения не отмечалось.

760 During a long-term observation period of animals in the control group (15 days, n=10), clinical mastitis developed in 50% of the animals; in the remaining 5 cows, a decrease in the number of somatic cells by an average of 29.1% (to 1360 thousand/ml) was observed (Table 2).

764 При длительном периоде наблюдения за животными контрольной группы (15 дней, n=10) клинический мастит развился у 50% животных, у оставшихся 5 коров отмечалось снижение числа соматических клеток в среднем на 29,1% (до 1360 тыс./мл) (таблица 2).

[0052]

772 In the first experimental group, the following scheme of administration of the declared drug was used: 5 ml/live 1 time per day for 5 days.

775 В первой опытной группе использовали следующую схему введения заявленное средство: 5 мл/жив 1 раз в день в течение 5 дней.

779 The work was carried out on the farms of Lesnye Polyany LLC, Ulyanino PZ CJSC, Noginskoye PZ CJSC and Barybino PR CJSC in the Moscow Region; the total number of animals in the first experimental group was 33.

783 Работы проведены в хозяйствах ООО «Лесные поляны», ЗАО ПЗ «Ульянино», ЗАО ПЗ «Ногинское» и ЗАО ПР «Барыбино» Московской области, общее количество животных в первой опытной группе - 33.

788 The results of the work showed a significant decrease in the number of somatic cells from 2107 to 991 thousand/ml (Table 2).

791 По результатам работ было отмечено достоверное снижение числа соматических клеток с 2107 до 991 тыс./мл (таблица 2).

795 This decrease was statistically significant relative to the control and relative to the beginning of the experiment.

798 Данное снижение было статистически достоверным относительно контроля и относительно начала опыта.

802 When analyzing individual values, it was found that a decrease in the number of somatic cells after the course of treatment was observed in 90.9% (30 out of 33) animals by an average of 54.8%, and an increase in 3 animals by 116.8%.

806 При анализе индивидуальных значений было выявлено, что снижение числа соматических клеток после курса лечения отмечалось у 90,9% (30 из 33) животных в среднем на 54,8%, а повышение у 3 голов на 116,8%.

811 At the same time, at the end of treatment, the number of animals with second-grade milk significantly decreased (Table 4), but premium-grade milk was observed in only 5 (15.2%) cows.

815 При этом на момент окончания лечения число животных с молоком второго сорта достоверно снизилось (таблица 4), но молоко высшего сорта отмечали только у 5 (15,2%) коров.

[0054]

823 In the second experimental group, the following scheme for administering the declared agent was used: 5 ml/live 2 times a day for 3 days.

826 Во второй опытной группе использовали следующую схему введения заявленного средства: 5 мл/жив 2 раза в день в течение 3 дней.

830 Four experimental works were carried out in farms of the Moscow region (ZAO PZ Ulyanino, ZAO PZ Noginskoye, ZAO Samotovino).

833 Было проведено 4 опытных работы в хозяйствах Московской области (ЗАО ПЗ «Ульянино», ЗАО ПЗ «Ногинское», ЗАО «Самотовино»).

837 The total number of animals in the experimental group was 30.

839 Общее количество животных в опытной группе - 30.

842 In a summary analysis of all studies after 3 days of therapy, a decrease in the number of somatic cells in milk was noted from 1836 to 767 thousand/ml ($p<0.001$, paired Student's t-test).

846 При суммарном анализе всех исследований после 3 дней терапии отмечено снижение числа соматических клеток в молоке с 1836 до 767 тыс./мл ($p<0,001$, парный t - критерий Стьюдента).

851 Moreover, a decrease in the number of somatic cells was noted in 96.7% (29 out of 30) of animals by an average of 61.4%, and an increase in only 1 head by 15.7% (from 1194 to 1382

thousand/ml, ZAO Samotovino).

857 При этом снижение числа соматических клеток отмечали у 96,7% (29 из 30) животных в среднем на 61,4%, а повышение только у 1 головы на 15,7% (с 1194 до 1382 тыс./мл, ЗАО «Самотовино»).

862 It should be noted that in two cows (ZAO Samotovino), subclinical mastitis with periodic transition to the clinical form of the disease was observed for 2-3 months.

865 Следует отметить, что у двух коров (ЗАО «Самотовино») субклинический мастит с периодическим переходом в клиническую форму заболевания наблюдался на протяжении 2-3 мес.

870 When excluding animals with chronic subclinical mastitis (n=2, ZAO Samotovino) from the analysis, the average value for the group reaches 582 thousand/ml, which corresponds to a decrease in the number of somatic cells in milk by 66.0% (Table 2, data for the “second experimental group n=28”).

875 При исключении из анализа животных с хронической формой субклинического мастита (n=2, ЗАО «Самотовино») среднее значение по группе достигает уровня 582 тыс./мл, что соответствует снижению на числа соматических клеток в молоке на 66,0% (таблица 2, данные «вторая опытная группа n=28»).

881 In the late period (12 days after the end of treatment, n=17), the reduction in the number of somatic cells was 83.5% (up to 303 thousand/ml, p<0.0001).

884 В отдаленном периоде (12 дней после окончания лечения, n=17) снижение числа соматических клеток составило 83,5% (до 303 тыс./мл, p<0,0001).

[0055]

891 It should be noted that the severity of the effect of the declared product depended on the zootechnological characteristics of the farms at the time of the work: in more prosperous farms, the effectiveness of the drug was higher (Table 3).

895 Следует отметить, что выраженность эффекта заявленного средства зависела от зоотехнологических характеристик хозяйств на момент проведения работы: в более

благополучных хозяйствах эффективность препарата была выше (таблица 3).

[0057]

905 After the treatment, an increase in milk grade was noted: in 33.3% (10) of animals to the highest grade, in 33.3% (10) of animals to the 1st grade.

908 После проведенного лечения отмечалось повышение сортности молока: у 33,3% (10) животных до высшего сорта, у 33,3% (10) животных до 1-го сорта.

912 In the remaining animals, the grade does not change with a decrease in the number of somatic cells by 32.8% (from 2284 to 1471 thousand/ml).

915 У остальных животных сортность не меняется при снижении числа соматических клеток на 32,8% (с 2284 до 1471 тыс./мл).

919 Thus, after the treatment, the number of animals with premium milk increased significantly and the number of animals with second-grade milk decreased ($p<0.05$ compared to the beginning of the experiment and $p<0.01$ compared to the control, Fisher's test).

923 Таким образом, после проведенного лечения достоверно повысились число животных с молоком высшего сорта и снизилось число животных с молоком второго сорта ($p<0,05$ по сравнению с началом опыта и $p<0,01$ по сравнению с контролем, критерий Фишера).

928 After the treatment, first and premium grade milk was observed in 76.6% of cows (Table 4).

930 После проведенного лечения молоко первого и высшего сорта отмечено у 76,6% коров (таблица 4).

[0058]

937 In the third experimental group, the declared product was used according to the regimen of 7 ml/liver 2 times a day for 3 days.

940 В третьей опытной группе применяли заявленное средство по схеме 7 мл/жив 2 раза в

день в течение 3 дней.

945 The work was carried out at the farm of the Federal State Unitary Enterprise "Klenovo-Chegodaev" in the Moscow Region; the total number of animals in the experimental group was 7.

949 Работа проведена в хозяйстве ФГУП ЭХ «Кленово-Чегодаево» Московской области, общее количество животных в опытной группе - 7.

953 The results of the work showed a decrease in the number of somatic cells by an average of 805 thousand/ml (28.8%), from 1653 to 848 thousand/ml).

956 По результатам работ было отмечено снижение числа соматических клеток в среднем на 805 тыс./мл (28,8%), с 1653 до 848 тыс./мл).

960 In this case, the number of somatic cells significantly decreased in 5 heads (71.4%) by an average of 71% (by 1360 thousand/ml, p<0.05 compared to the beginning of the experiment), and increased in 2 heads by an average of 68.0%.

964 При этом количество соматических клеток достоверно снизилось у 5 голов (71,4%) в среднем на 71% (на 1360 тыс./мл, p<0,05 по сравнению с началом опыта), а повышение у 2 голов в среднем на 68,0%.

[0059]

972 In none of the experimental groups was mastitis observed to develop into a clinical form.

974 Ни в одной из опытных групп не отмечали переход мастита в клиническую форму.

[0061]

980 Thus, the use of the claimed product according to the regimen 2 times a day for 3 days at a dose of 5 ml/live showed the highest efficiency in the treatment of subclinical mastitis in cows.

983 Таким образом, применение заявленного средства по схеме 2 раза в день в течение 3

дней в дозе 5 мл/жив показало наиболее высокую эффективность при лечении субклинического мастита у коров.

[0062]

992 Stage 2.

994 Этап 2.

997 Research based on the study of bulk milk.

999 Исследование на основании исследования сборного молока.

[0063]

1005 A total of 791 heads (milking herd, table 5) were examined on three farms.

1007 Всего на базе трех хозяйств было осмотрено 791 голова (дойное стадо, таблица 5).

1010 A total of 162 cows were diagnosed with subclinical mastitis and then treated with the claimed product at a dose of 5 ml/animal 2 times a day for 3 days.

1013 Диагноз субклинический мастит был поставлен в общем 162 коровам, которых затем проводили терапию заявленным средством, в дозе 5 мл/жив 2 раза в день в течение 3 дней.

[0064]

1021 In two farms, the effectiveness of the declared product was monitored based on the results of measuring the somatic cell count in the collected milk (in the tank).

1024 В двух хозяйствах контроль эффективности применения заявленного средства проводили по результатам измерения содержания соматических клеток в сборном молоке (в танке).

[0065]

1032 At the beginning of treatment, the level of somatic cells in the collected milk was 818 thousand/ml at the farm of ZAO PZ Ulyanino and 1104 thousand/ml at the farm of OOO Novobyтовское отделение отечественного мясомолочного производственного объединения (Table 6).

1036 На начало лечения уровень соматических клеток в сборном молоке был 818 тыс./мл в хозяйстве ЗАО «Ульянин» и 1104 тыс./мл в хозяйстве ООО «Новобытовское отделение отечественного мясомолочного производственного объединения» (таблица 6).

1042 After using the declared product, the number of somatic cells decreased by 3-4 times: from 818 thousand/ml to 220 thousand/ml and from 1104 thousand/ml to 373 thousand/ml.

1045 После применения заявленного средства количество соматических клеток снизилось в 3-4 раза: с 818 тыс./мл до 220 тыс./мл и с 1104 тыс./мл до 373 тыс./мл.

1049 Six days after the end of the use of the declared product, the number of somatic cells in the collected milk was 171 thousand/ml (6.5 times lower than the initial level).

1052 Через 6 дней после окончания применения заявленного средства количество соматических клеток в сборном молоке составило 171 тыс./мл (в 6,5 раз ниже первоначального уровня).

[0067]

1060 Thus, after using the declared product, animals showed an increase in the quality of milk from the second to the highest grade.

1063 Таким образом, после применение заявленного средства у животных отмечалось повышение сортности молока со второго до высшего сорта.

1067 No side effects were identified when using the stated product.

1069 Побочных эффектов при применении заявленного средства не выявлено.

[0069]

1075 In addition, similar work was carried out at the ZAO Samotovino farm, where the effectiveness of the declared product was monitored based on the results of repeated control milking with the study of milk samples using the Kenotest test system.

1079 Кроме того, аналогичная работа проводилась на базе хозяйства ЗАО «Самотовино», где контроль эффективности применения заявленного средства проводили по результатам повторной контрольной дойки с исследованием проб молока тест-системой Кенотест.

1084 Based on the results of the first control milking, subclinical mastitis was diagnosed in 65 cows (15.9%).

1087 По результатам первой контрольной дойки диагноз субклинический мастит был поставлен 65 коровам (15,9%).

1091 According to the results of repeated control milking, subclinical mastitis was detected in only 34 heads out of 409 heads (8.3%).

1094 По результатам повторной контрольной дойки только у 34 голов из 409 голов был выявлен субклинический мастит (8,3%).

1098 Thus, the use of the claimed product contributed to a 2-fold reduction in the incidence of subclinical mastitis.

1101 Таким образом, применение заявленного средства способствовало сокращению частоты субклинического мастита в 2 раза.

[0070]

1108 The use of the declared product at a dose of 5 ml/live allowed to reliably reduce the level of somatic cells in 96.7% of animals by an average of 61.4%.

1111 Применение заявленного средства в дозе 5 мл/жив позволило достоверно снизить уровень соматических клеток у 96,7% животных в среднем на 61,4%.

[0071]

1118 Mass application of the declared product to cows diagnosed with subclinical mastitis in the conditions of an industrial complex allows to increase the quality and grade of bulk milk in a common tank from the second/first grade to the highest immediately after the treatment.

1122 Массовое применение заявленного средства коровам с диагностированным субклиническим маститом в условиях промышленного комплекса позволяет повысить качество и сортность сборного молока в общем танке со второго/первого сорта до высшего сразу после проведенного лечения.

1128 The obtained result was stable during 6-10 days of observation.

1130 Полученный результат был стабилен в течение 6-10 дней наблюдения.

[0072]

1136 Example 2.

1138 Пример 2.

[0073]

1144 To evaluate clinical efficacy, 22 heads with signs of clinical mastitis were selected and divided into 2 groups: experimental ($n=20$) and control ($n=20$).

1147 Для оценки клинической эффективности были отобраны 22 головы с признаками клинического мастита, которых разделили на 2 группы: опытная ($n=20$) и контрольная ($n=20$).

[0074]

1156 In the treatment of clinical mastitis in the initial stage, recovery occurred after a single use of Mastiet-forte or two injections of the declared drug (1 day of use).

1159 При лечении клинического мастита в начальной стадии выздоровление наступало после однократного применения препарата Местиет-форте или двух инъекций заявленного средства (1 день применения).

1164 However, after using Mastiet-forte, the waiting period was 3 days; after using the declared product, there was no waiting period (negative test for inhibitors).

1167 Однако после применения Местиет-форте период ожидания составлял 3 суток, после применения заявленного средства период ожидания отсутствовал (отрицательный тест на ингибиторы).

[0075]

1175 Recovery during treatment of acute clinical mastitis with antibiotics occurred on days 3-6 in 18 heads (90%), and during treatment with the declared agent - on days 4-5.

1178 Выздоровление при лечении острой формы клинического мастита с помощью антибиотиков наступало на 3-6 сутки у 18 голов (90%), при лечении с помощью заявленного средства - на 4-5 сутки.

1183 Recovery after using the declared product was observed in all animals (100%).

1185 Выздоровление при применении заявленного средства отмечали у всех животных (100%).

1189 The use of the claimed product helps to quickly eliminate such symptoms of clinical mastitis as inflammation of the udder, the presence of flakes and clots in milk.

1192 Применение заявленного средства способствует быстрому устранению таких симптомов клинического мастита как воспаление вымени, наличие хлопьев и сгустков в молоке.

[0076]

1199 In 8 animals with acute serous mastitis, milk samples were additionally assessed using Kenotest.

1202 У 8 животных с острой формой серозного мастита была дополнительно проведена оценка проб молока Кенотестом.

1206 According to the obtained results, in 5 cows (62.5%) the somatic cell level does not exceed 500 thousand/ml (negative test), in 3 cows - above 500 thousand/ml (signs of subclinical mastitis).

1210 Согласно полученным результатам у 5-ти коров (62,5%) уровень соматических клеток не превышает 500 тыс./мл (тест отрицательный), у 3-х коров - выше 500 тыс./мл (признаки субклинического мастита).

1215 These cows were not treated further and, according to the results of testing for subclinical mastitis after 2 weeks, these animals showed a negative result.

1218 Дальше лечение этих коров не проводили и по результатам проверки на субклинический мастит через 2 недели данные животные показали отрицательный результат.

[0077]

1225 It should be noted that after the use of antibacterial drugs (standard treatment regimen), milk was rejected within 7-12 days, but after treatment with the declared agent, there was no waiting period.

1229 Следует отметить, что после применения антибактериальных препаратов (стандартная схема лечения) молоко браковалось в течение 7-12 дней, а после лечения заявленным средством период ожидания отсутствовал.

[0078]

1237 No side effects were observed when using the stated product.

1238 При применении заявленного средства побочных эффектов не отмечено.

[0079]

1245 The claimed agent has demonstrated pronounced therapeutic efficacy in the treatment of acute clinical mastitis (in monotherapy).

1248 Заявленное средство показало выраженную терапевтическую эффективность при лечении острого клинического мастита (в монотерапии).

1252 When using the claimed product, there was no waiting period for milk, which made it possible to reduce the economic damage caused by clinical mastitis in cattle.

1255 При применении заявленного средства отсутствовал период ожидания для молока, что позволило сократить экономический ущерб, наносимый клиническим маститом КРС.

[0080]

1262 Based on the results of the study, it can be concluded that:

1264 По результатам проведенного исследования можно сделать вывод, что:

[0081]

1270 The declared product at a dose of 5 ml/animal helps to reduce the level of somatic cells in 96.7% of animals by an average of 61.4%.

1273 Заявленное средство в дозе 5 мл/жив способствует снижению уровня соматических клеток у 96,7% животных в среднем на 61,4%.

1277 In addition, the use of the claimed product leads to an increase in the quality of milk.

1279 Кроме того, применение заявленного средства приводит к повышению сортности

молока.

1284 The effect lasts for at least 12 days.

1286 Эффект сохраняется в течение минимум 12 дней.

[0082]

1292 The declared product, when used on a large scale in cows diagnosed with subclinical mastitis in industrial complex conditions, allows for an increase in the quality and grade of bulk milk in a common tank.

1296 Заявленное средство при массовом применении коровам с диагностированным субклиническим маститом в условиях промышленного комплекса позволяет повысить качество и сортность сборного молока в общем танке.

[0083]

1304 The claimed agent has demonstrated pronounced therapeutic efficacy in the treatment of acute clinical mastitis (in monotherapy).

1307 Заявленное средство показало выраженную терапевтическую эффективность при лечении острого клинического мастита (в монотерапии).

[0084]

1314 The use of the declared product will allow to quickly and effectively reduce the level of somatic cells in milk, increase its grade and profitability of dairy production, while the drug has no waiting period, which allows to reduce economic damage to farms.

1318 Применение заявленного средства позволит быстро и эффективно снизить уровень соматических клеток в молоке, повысить его сортность и рентабельность молочного производства, при этом у препарата отсутствует период ожидания, что позволяет сократить экономический ущерб хозяйствам.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau



WIPO | PCT



(10) International Publication Number

WO 2016/147142 A1

(43) International Publication Date

22 September 2016 (22.09.2016)

(51) International Patent Classification:

A61K 8/97 (2006.01) A61K 36/54 (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01) A61K 36/282 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01)

BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number:

PCT/IB2016/051506

(22) International Filing Date:

17 March 2016 (17.03.2016)

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

62/134,840 18 March 2015 (18.03.2015) US

(71) Applicant: ANJON BIOLOGICS, INC. [US/US]; 9005 W Sahara Ave., Las Vegas, 89117 (US).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

(72) Inventor: RONEN, Raziel; 51 Magdil Rd., 4534258 Hod Hasharon (IL).

(74) Agents: KESTEN, Dov et al.; Yigal Alon 55, 6789115 Tel Aviv (IL).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,



WO 2016/147142 A1

(54) Title: ANTI-PATHOGENIC COMPOSITIONS

(57) Abstract: Antimicrobial, antiviral and antifungal composition and methods of use thereof are provided.

ANTI-PATHOGENIC COMPOSITIONS

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to, inter alia, compositions comprising Aaronsohnia factorovskyi extracts, and methods of use thereof, such as for treating viral and/or microbial infections.

BACKGROUND

Many of the commonly used anti-bacterial, anti-viral and anti-fugal agents are synthetic compounds. In recent years, there has been an increased interest in developing and promoting the use of natural materials for use as anti-microbial, both in food preservation and in agricultural practices. One incentive for eliminating the use of synthetic compounds is emergence of anti-microbial drug resistance in human pathogens.

There is an unmet need for improved natural anti-pathogenic compositions effective against a broad-spectrum of pathogens.

15

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides, in some embodiments, compositions comprising Aaronsohnia factorovskyi extracts alone or combined with various components including but not limited to additional vegetative extracts. In some embodiments, said compositions have antimicrobial activity, such as antiviral, antibacterial and antifungal activity.

According to one aspect, there is provided a composition comprising an Aaronsohnia factorovskyi extract, and one or more carriers and/or excipients. In some embodiments, the composition further comprises one or more extracts selected from the group consisting of: Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus, Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens, Foeniculum vulgare, Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark and Neroli. In additional embodiments, the composition further comprises one or more extracts selected from the group consisting of: Citrus bergamia, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus officinalis and Melaleuca alternifolia.

According to another aspect, there is provided an article comprising the composition described herein.

According to another aspect, there is provided a method of inhibiting or reducing a formation of load of a microorganism and/or a formation of a biofilm or biofouling on and/or within an article,

- 5 the method comprising incorporating or coating the composition of the invention on and/or within said article.

According to another aspect, there is provided a method of treating, preventing or ameliorating an infection or microbial-associated inflammatory condition in a subject in need thereof, the method comprising contacting or administering to the subject a therapeutically acceptable amount of the composition of the invention, thereby treating, preventing or ameliorating 10 the infection or microbial-associated inflammatory condition in said subject.

According to another aspect, there is provided the composition of the invention, for use in treating an infection in a subject in need thereof.

According to another aspect, there is provided use of the composition of the invention, for 15 preparation of a medicament for treating an infection in a subject in need thereof.

This summary is provided to introduce a selection of concepts in a simplified form that are further described below in the detailed description. This summary is not intended to identify key features or essential features of the claimed subject matter, nor is it intended to be used to limit the scope of the claimed subject matter.

20

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figures 1A-F show the effectiveness of a composition of the present invention against *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Candida albicans*, and *Pseudomonas aeruginosa* after 24h and 48h. Figures 1C and 1F are respective controls.

25 **Figure 2** is a graph showing somatic cell count before and after treating calf mastitis with an embodiment of the composition of the invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides, in some embodiments, compositions comprising Aaronsohnia factorovskyi extracts alone or combined with additional vegetative extracts. In some embodiments, said compositions have anti-pathogenic and anti-microbial activity.

5 The present invention is based, in part, on the surprising finding that a composition comprising Aaronsohnia factorovskyi extract exhibits increased antimicrobial activity. It has been further discovered that compositions comprising combinations of A. factorovskyi extract together with extracts from additional vegetative sources showed increased antimicrobial activity, such as in terms of activity and/or range of susceptible pathogens. In some embodiments, the activity of
10 the combination disclosed herein is synergistic, i.e., its activity is more than the sum of the activity of each individual component.

In some embodiments, the present invention relates to crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Aaronsohnia factorovskyi. In one embodiment, said extract is prepared from at least one plant material selected from the group consisting of: leaves, flowers,
15 and seeds of Aaronsohnia factorovskyi. In some embodiments, said Aaronsohnia factorovskyi extract comprises at least one of Guaiazulene and azulon.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Artemisia, including but not limited to extracts prepared from the leaves and/or seeds of Artemisia.

20 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Salvia officinalis (sage), including but not limited to extracts prepared from the leaves and/or seeds of Salvia officinalis.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Citronella, including but not limited to extracts prepared
25 from the leaves and/or seeds of Citronella.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Geranium, including but not limited to extracts prepared from the leaves and/or seeds of Geranium.

30 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from F. Spearmint, Lamiaceae (mentha), including but not limited to extracts prepared from the leaves and/or seeds of mentha.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Thyme, including but not limited to extracts prepared from the leaves and/or seeds of Thyme.

5 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Illicium verum* (star anise), including but not limited to extracts prepared from the leaves and/or seeds of *Illicium verum*.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Ocimum basilicum* (basil), including but not limited to extracts prepared from the leaves and/or seeds of *Ocimum basilicum*.

10 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Cymbopogon* (lemongrass), including but not limited to extracts prepared from the leaves and/or seeds of *Cymbopogon*.

15 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Laurus nobilis* (bay leaves), including but not limited to extracts prepared from the fruit and/or seeds of *Laurus nobilis*.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Pimenta racemosa* (Mill.), including but not limited to extracts prepared from the leaves, fruits and/or seeds of *Pimenta racemosa*.

20 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Carum carvi* (caraway), including but not limited to extracts prepared from the leaves, fruits and/or seeds of *Carum carvi*.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Cinnamomum*, including but not limited to extracts prepared from the leaves and/or bark of *Cinnamomum*.

25 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Zeylanicum* Nees (i.e., Ceylon cinnamon or *Cinnamomum zeylanicum* Blume), including but not limited to extracts prepared from the leaves, fruits and/or seeds of *Zeylanicum* Nees.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Syzygium aromaticum*, including but not limited to extracts prepared from the clove buds, leaves, fruits and/or seeds of *Syzygium aromaticum*.

5 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Pistacia lentiscus* (mastic tree), including but not limited to extracts prepared from the bark and/or leaves of *Pistacia lentiscus*.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Cymbopogon nardus* (Rendle; F. poaceae), including but not limited to extracts prepared from the leaves of *Cymbopogon nardus*.

10 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from F. rutaceae, including but not limited to extracts prepared from the peel of F. rutaceae.

15 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Eugenia caryophyllata* thumb, including but not limited to extracts prepared from the seeds and/or fruits of *Eugenia caryophyllata*.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Cuminum*, including but not limited to extracts prepared from the seeds and/or leaves of *Cuminum*.

20 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Apium graveolens* (celery), including but not limited to extracts prepared from the leaves, seeds and/or roots of *Apium graveolens*.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Foeniculum vulgare* (fennel), including but not limited to extracts prepared from the flower, seeds and/or leaves of *Foeniculum vulgare*.

25 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Myristica fragrans*, including but not limited to extracts prepared from the seeds of *Myristica fragrans*.

30 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from *Melissa officinalis*, including but not limited to extracts prepared from the leaves of *Melissa officinalis*.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Lavender, including but not limited to extracts prepared from the leaves and/or seeds of Lavender.

5 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Sandelwood, including but not limited to extracts prepared from Sandelwood bark.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Neroli, including but not limited to extracts prepared from the fruits and/or seeds of Neroli.

10 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Citrus bergamia, including but not limited to extracts prepared from the peel of Citrus bergamia.

15 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Origanum, including but not limited to extracts prepared from the leaves of Origanum.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Eucaliptus, including but not limited to extracts prepared from the leaves and/or bark of Eucaliptus.

20 In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Rosmarinus officinalis, including but not limited to extracts prepared from the leaves and/or flowers of Rosmarinus officinalis.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Melaleuca alternifolia (tee tree), including but not limited to extracts prepared from the leaves and/or seeds of Melaleuca alternifolia, such as tea tree oil.

25 In some embodiments, the compositions of the invention comprise A. factorovskyi extract and one or more extracts selected from the group consisting of: Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus, Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens, Foeniculum vulgare, Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark and Neroli.

In some embodiments, the present invention relates to crude extracts, fractions and/or isolated compounds derived from Aaronsohnia factorovskyi and chamomile, optionally with one or more extracts selected from the group consisting of: Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus, Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens, Foeniculum vulgare, Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark and Neroli.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise A. factorovskyi extract and one or more extracts selected from the group consisting of: Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus, Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens, Foeniculum vulgare, Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark, Neroli, Citrus bergamia, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus officinalis and Melaleuca alternifolia.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise A. factorovskyi extract and a plurality of extracts selected from the group consisting of: Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus, Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens, Foeniculum vulgare, Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark, Neroli, Citrus bergamia, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus officinalis and Melaleuca alternifolia. In the context of this embodiment, the term plurality refers to at least 2, at least 3, at least 4, at least 5, at least 6, at least 7, at least 8, at least 9, at least 10, at least 11, at least 12, at least 13, at least 14, at least 15, at least 16, at least 17, at least 18, at least 19, at least 20, at least 21, at least 22, at least 23, at least 24 or at least 25 extracts, wherein each possibility represent a separate embodiment of the invention.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise or consists of a plurality of extracts derived from Aaronsohnia factorovskyi, Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus, Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens, Foeniculum

vulgare, Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandalwood bark and Neroli. In the context of this embodiment, the term plurality refers to at least 2, at least 3, at least 4, at least 5, at least 6, at least 7, at least 8, at least 9, at least 10, at least 11, at least 12, at least 13, at least 14, at least 15, at least 16, at least 17, at least 18, at least 19, at least 20, at least 21, at least 22, at least 23, at least 24 or at least 25 extracts, wherein each possibility represent a separate embodiment of the invention.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise or consists of a plurality of extracts derived from Aaronsohnia factorovskyi, Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus, Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens, Foeniculum vulgare, Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandalwood bark, Neroli, Citrus bergamia, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus officinalis and Melaleuca alternifolia. In the context of this embodiment, the term plurality refers to at least 2, at least 3, at least 4, at least 5, at least 6, at least 7, at least 8, at least 9, at least 10, at least 11, at least 12, at least 13, at least 14, at least 15, at least 16, at least 17, at least 18, at least 19, at least 20, at least 21, at least 22, at least 23, at least 24 or at least 25 extracts, wherein each possibility represent a separate embodiment of the invention.

In some embodiments, the compositions of the invention comprise one or more extracts derived from the group consisting of: Salvia, Citrus bergamia, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus officinalis and Melaleuca alternifolia. In some embodiments, the compositions of the invention comprise Salvia, Citrus bergamia, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus officinalis and Melaleuca alternifolia. According to some embodiments, a composition comprising extracts selected from Salvia, Citrus bergamia, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus officinalis and Melaleuca alternifolia enables penetration of the compositions described herein through a pathogen's membrane. According to another embodiment, said composition provides an in-vivo anti-microbial effect of the compositions described herein.

In some embodiments, the compositions of the invention further comprise one or more crude extracts, fractions and/or isolated compounds selected from the group consisting of croton lechleri, Medicago sativa (alfalfa), Thymus serpyllum, myrrh, ginger, chamomile, Sesamum indicum or combination thereof. In some embodiments, the compositions of the invention further comprise

one or more ingredients selected from the group consisting of citric acid, ascorbic acid, tocopherol, vitamin A or combination thereof.

In some embodiments, the compositions of the invention further comprise one or more algae extract selected from the group consisting of Rhodophyta (red algae), Phaeophyceae Laminaria 5 (brown algae) and Porphyra, or combination thereof.

In some embodiments, the compositions of the invention further comprise one or more ingredients selected from the group consisting of starch, carob powder, glycerin, cellulose, or combination thereof.

In some embodiments, said carrier of the compositions of the invention is selected from the 10 group consisting of vegetable oil, such as coconut oil, cottonseed oil, pine oil, safflower oil, linseed oil, palm oil, peanut oil or combination thereof. In some embodiments, said carrier is selected from the group consisting of gum arabic, guar gum, and locust bean gum, or combination thereof.

The crude extracts, fractions and/or isolated compounds provide antibacterial, antifungal and anti-parasitic (e.g., helminthic) activity. The extracts may be used in the prevention and treatment 15 of bacterial, viral, fungal and/or parasitic (e.g., helminthic) infections in a subject.

Extraction methods

Those skilled in the art will appreciate that there are a number of methods for preparing extracts from crude plant material. These methods include, among others, cutting, chopping, macerating and/or grinding raw or dried plant material and adding at least one solvent in order to 20 obtain a plant extract. It will also be appreciated that the crude plant material may be fresh material or dry plant material.

As used herein the term "crude extract" refers to a preparation of a plant extract obtained by removing secondary metabolites from the plant material with the aid of a suitable solvent. This may be done, for example, by submerging the crude plant material in a suitable solvent, removing 25 the solvent and consequently evaporating all or nearly all of the solvent. As used herein the term "purified extract" refers to an extract obtained by separating the constituent parts of a crude extract from each other.

In some embodiments, crude extract is prepared by combining of the plant material (e.g., A. factorovskyi) with an extracting material (e.g., ethanol, oil, or water). In one embodiment, about 1 30 Kg of plant material is combined with 10 L of an extracting material. In an embodiment wherein said extraction material is ethanol or oil, the extraction period lasts for about 1- 20 days, about 2-

18 days, 5-15 days, or about 10 days. In an embodiment wherein the extraction is water, the extraction period lasts for about 10 minutes in 100°C. Thereafter, the liquids may be filtered using 200 mesh filter. One skilled in the art will appreciate that additional extraction methods and filtering steps may be used.

5 A variety of plant parts may be used to arrive at the requisite extract. Suitable plant parts include roots, bulbs, tubers, leaves, basal leaves, stems, stem nodes, stem internodes, galls, stalks, woody parts, flowers, inflorescences, fruits, infructescences, seeds and combinations thereof. The plant part may be fresh, dried, frozen, or lyophilized. The plant part may be ground or pulverized into a plant material using a homogenizer, a blender, a mortar and pestle, a sonicator, or a similar
10 apparatus.

The plant extract typically is prepared by contacting the plant material with a solvent for an appropriate period of time. Non-limiting examples of suitable alcohol solvents include methanol, ethanol, propanol, butanol, acetone, dichloromethane, chloroform, glycerine, hexane, ethyl acetate, propylene glycol, water or combinations thereof. The concentration of solvent that is contacted
15 with the plant material may range from about 1% to about 100%. In embodiments in which ethanol is the solvent, the concentration of ethanol may range from about 1% to about 20%, from about 20% to about 40%, from about 40% to about 60%, from about 60% to about 80%, or from about 80% to about 100%.

Additional methods for preparing the extracts disclosed herein include but are not limited to
20 the use of oil (e.g., herbal/botanical), glycerin, steam, decoction, pressure, acids and alkaline liquids, or combinations thereof.

The period of time the plant material is contacted with the solvent may range from about 1 hour to about 5 days. In various embodiments, the plant material may be contacted with the solvent for about 1-24 hours, for about 24-48 hrs, for about 48-72 hours, for about 72-96 hours, or for
25 about 96-120 hours. Upon removal of the extract from the plant material, the plant material may be extracted one or more additional times with fresh alcohol solvent.

The solvent may be removed from the plant extract to form a dry plant extract. Those of skill in the art are familiar with suitable techniques to remove the alcohol solvent including, without limit, evaporation, distillation, and lyophilization.

30 In some embodiments, the composition of the invention may further comprise at least one pharmaceutically acceptable excipient. Non-limiting examples of suitable excipients include

diluents, binders, fillers, buffering agents, pH modifying agents, disintegrants, dispersing agents, stabilizers, preservatives, and coloring agents. The amount and types of excipients may be selected according to principles known to one skilled in the art.

In one embodiment, the excipient may include at least one diluent. Non-limiting examples 5 of suitable diluents include microcrystalline cellulose (MCC), cellulose derivatives, cellulose powder, cellulose esters (i.e., acetate and butyrate mixed esters), ethyl cellulose, methyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, hydroxypropyl methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, corn starch, phosphated corn starch, pregelatinized corn starch, rice starch, potato starch, tapioca starch, starch-lactose, starch-calcium carbonate, sodium starch glycolate, glucose, fructose, lactose, 10 lactose monohydrate, sucrose, xylose, lacitol, mannitol, sorbitol, xylitol, maltodextrin, and trehalose.

In another embodiment, the excipient may comprise a binder. Suitable binders include, but are not limited to, starches, pregelatinized starches, gelatin, polyvinylpyrrolidone, cellulose, methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, ethylcellulose, polyacrylamides, 15 polyvinyloxoazolidone, polyvinylalcohols, C12-C18 fatty acid alcohol, polyethylene glycol, polyols, saccharides, oligosaccharides, polypeptides, oligopeptides, and combinations thereof.

In another embodiment, the excipient may include filler. Suitable fillers include, but are not limited to, carbohydrates, inorganic compounds, and polyvinylpyrrolidone. By way of non-limiting example, the filler may be calcium sulfate, both di- and tri-basic, starch, calcium carbonate, 20 magnesium carbonate, microcrystalline cellulose, dibasic calcium phosphate, magnesium carbonate, magnesium oxide, calcium silicate, talc, modified starches, lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol.

In still another embodiment, the excipient may comprise a buffering agent. Representative examples of suitable buffering agents include, but are not limited to, MOPS, HEPES, TAPS, 25 Bicine, Tricine, TES, PIPES, MES, Tris buffers or buffered saline salts (e.g., Tris buffered saline or phosphate buffered saline).

In various embodiments, the excipient may include a pH modifier. By way of non-limiting example, the pH modifying agent may be sodium carbonate or sodium bicarbonate.

In another alternate embodiment, the excipient may also include a preservative. Non-limiting 30 examples of suitable preservatives include antioxidants, such as alpha-tocopherol or ascorbate.

In a further embodiment, the excipient may include a disintegrant. Suitable disintegrants include, but are not limited to, starches such as corn starch, potato starch, pregelatinized and modified starches thereof, sweeteners, clays, such as bentonite, micro-crystalline cellulose, alginates, sodium starch glycolate, gums such as agar, guar, locust bean, karaya, pectin, and 5 tragacanth.

In yet another embodiment, the excipient may include a dispersion enhancer. Suitable dispersants may include, but are not limited to, starch, alginic acid, polyvinylpyrrolidones, guar gum, kaolin, bentonite, purified wood cellulose, sodium starch glycolate, isoamorphous silicate, and microcrystalline cellulose.

10 In a further embodiment, the excipient may include a lubricant. Non-limiting examples of suitable lubricants include minerals such as talc or silica; and fats such as vegetable stearin, magnesium stearate or stearic acid.

15 In still another embodiment, it may be desirable to provide a coloring agent. Suitable color additives include, but are not limited to, food, drug and cosmetic colors, drug and cosmetic colors, or external drug and cosmetic colors.

In some embodiments, the compositions of the invention further comprise purified shellac. In some embodiments, the compositions of the invention further comprise a detergent such as a pH based detergent.

The weight fraction of the excipient(s) in the composition may be about 98% or less, about 20 95% or less, about 90% or less, about 85% or less, about 80% or less, about 75% or less, about 70% or less, about 65% or less, about 60% or less, about 55% or less, about 50% or less, about 45% or less, about 40% or less, about 35% or less, about 30% or less, about 25% or less, about 20% or less, about 15% or less, about 10% or less, about 5% or less, about 2%, or about 1% or less of the total weight of the composition.

25 In one embodiment, the compositions disclosed herein comprise 0.1- 10 wt % of said Aaronsohnia factorovskyi extract. In another embodiment, the compositions disclosed herein comprise 0.1- 5 wt % of said Aaronsohnia factorovskyi extract. In another embodiment, said composition is used for external treatments.

30 In another embodiment, the compositions disclosed herein include a content ranging from 0.2 to 20 wt % of said extracts. In another embodiment, the compositions disclosed herein include

a content ranging from 0.5 to 20 wt % of said extracts. In another embodiment, said composition is used for in vivo treatment.

In another embodiment, the composition disclosed herein comprises a substantially equal amount of a first group of extracts and a second group of extracts, wherein the first group of extracts 5 comprises extracts selected from the group consisting of: Aaronsohnia factorovskyi, Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Zeylanicum Nees, Clove bud, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus, Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens, Foeniculum vulgare, Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark and Neroli; and wherein the second group of extracts 10 comprises extracts selected from the group consisting of: Salvia, Citrus bergamia, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus officinalis and Melaleuca alternifolia. In another embodiment, the ratio between the first group of extracts and the second group of extracts is ranges from 60:40 to 50:50, 70:30- to 60:40 or 80:20 – 70:30, respectively.

15 In another embodiment, there is provided a composition comprising one or more extracts derived from Salvia, Citrus bergamia, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus officinalis and Melaleuca alternifolia. According to some embodiments, said composition enables penetration of the compositions described herein through a pathogen's membrane. According to another embodiment, said composition provides an in-vivo anti-microbial effect of the compositions 20 described herein.

The concentration of the extracts in the composition can and will vary depending on the requested activity, target and/or substrate type and whether the extract is provided alone (e.g. A. factorovskyi) or in combination with additional extracts. In general, the composition is diluted to receive a final concentration of about 0.1% - 50, 0.1% - 40, 0.1% - 30, 0.1% - 20%, 0.1% - 15, 25 0.1% - 10, or alternatively 0.1% - 5. In one embodiment, higher concentrations are used for external use. In another embodiment, a concentration of 0.1% - 20 is used for pharmaceutical use (e.g. oral, intravenous and the like).

In one embodiment, the composition comprises or consists of extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid and vegetable oil.

In another embodiment, the composition comprises or consists of extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, vegetable oil, vegetable oil fatty acids and Gum Arabic.

In another embodiment, the composition comprises or consists of extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, detergents, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark and Tea Tree Oil.

In another embodiment, the composition comprises or consists of extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, detergents, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass-Cymbopogon, Pimenta racemosa, Caraway, Citric Acid and Ascorbic Acid.

In another embodiment, the composition comprises or consists of extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass-Cymbopogon, Pimenta racemosa, Caraway, Citric Acid, Ascorbic Acid, Artemisia, Ocimum basilicum and Laurus nobilis.

In another embodiment, the composition comprises or consists of extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass-Cymbopogon, Pimenta racemosa, Caraway, Citric Acid, Ascorbic Acid, Artemisia, Ocimum basilicum, Laurus nobilis, Cinnamon bark, Ceylon, Cinnamomum, Zeylanicum Nees, Clove bud, Mastic tree, Cymbopogon nardus Rendle, Pine Oil, Ginger, Ilicium, Guar gum and Detergent.

In another embodiment, the composition comprises or consists of extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass (Cymbopogon), Pimenta racemosa, Caraway, Citric Acid, Ascorbic Acid, Artemisia, Ocimum basilicum, Laurus nobilis, Cinnamon bark, Ceylon, Cinnamomum, Zeylanicum Nees, Clove bud, Mastic tree, Cymbopogon nardus Rendle, Pine Oil, Ginger, Ilicium, Guar gum, Myrrh, Citrus peel, Eugenia caryophyllata Thunb and Cumin.

In another embodiment, the composition comprises or consists of extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass-Cymbopogon, Pimenta racemosa, Caraway, Citric Acid, Ascorbic Acid, 5 Artemisia, Ocimum basilicum, Laurus nobilis, Cinnamon bark, Ceylon. Cinnamomum, Zeylanicum Nees, Clove bud, Mastic tree, Cymbopogon nardus Rendle, Pine Oil, Ginger, Ilicium, Guar gum, Myrrh, Citrus peel, Eugenia caryophyllata Thunb, Cumin, Shellac, Fennel, Myristica fragrans, Foeniculum vulgare Mill, Melissa, Lavender and Neroli.

In another embodiment, the composition comprises or consists of extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass-Cymbopogon, Pimenta racemosa, Caraway, Citric Acid, Ascorbic Acid, Artemisia, Ocimum basilicum, Laurus nobilis, Cinnamon bark, Ceylon. Cinnamomum, Zeylanicum Nees, Clove bud, Mastic tree, Cymbopogon nardus Rendle, Pine Oil, Ginger, Ilicium, 15 Guar gum, Myrrh, Citrus peel, Eugenia caryophyllata Thunb, Cumin ,Shellac, Fennel, Myristica fragrans, Foeniculum vulgare Mill, Melissa, Lavender and Neroli.

In another embodiment, the composition comprises or consists of extracts derived from A. factorovsky, Artemisia, Ocimum basilicum L Basil, Laurus nobilis L Bay, Cinnamon bark, Ceylon, Cinnamomum, Zeylanicum Nees, Clove bud, Mastic tree, Cymbopogon nardus Rendle, Pine Oil, 20 Ginger, Ilicium, Guar gum, Myrrh, Citrus peel, Eugenia caryophyllata Thunb, Cumin, Fennel sweet flowers, Myristica fragrans, Foeniculum vulgare Mill, Melissa, Lavender, Sandelwood bark, Neroli, Tea Tree Oil, Vegetable oil fatty acids and Gum Arabic.

In another embodiment, the composition comprises or consists of extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass-Cymbopogon, Pimenta racemosa, Caraway, Citric Acid, Ascorbic Acid,Citric Acid, Ascorbic Acid, Artemisia, Ocimum basilicum, Laurus nobilis, Cinnamon bark, Ceylon, Cinnamomum, Zeylanicum Nees, Clove bud, Mastic tree, Cymbopogon nardus Rendle, Pine Oil, Ginger, Ilicium, Guar gum, Myrrh, Citrus peel, Eugenia caryophyllata Thunb, Cumin ,Shellac, Fennel, Myristica fragrans, Foeniculum vulgare Mill, Melissa, Lavender, Neroli, Celery, 30 Salvia officinalis, Bergamot peel, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus officinalis L, Tea Tree Oil, Carob powder , Locust bean gum, Cellulose, Glycerin, Gum Arabic and Guar gum.

In some embodiments, *Aaronsohnia factorovskyi* is extracted by the use of ethanol, IPA, oil, herbal powders, propylene glycol, polyethylene glycol, water (e.g., mineral water), acids, triglycerides, or combinations thereof. In some embodiments, *Salvia officinalis*, *Citronella*, *Geranium*, *Thyme*, *Star anise*, *Citric acid* and *Vegetable oil* can be independently, extracted by infusion, decoction, squeezing or a combination thereof. In some embodiments, mineral water, acids, *Star anise*, *citric acid*, *Gum Arabic*, detergents, ascorbic acid, *Ginger*, *Ilicium*, *Guar gum*, *Citrus peel* and *Cumin* can be independently, extracted by either mineral water, pressure, filtering, infusion, decoction, squeezing or a combination thereof.

In some embodiments, *Shellac* is extracted by the use of IPA. In some embodiments, *Artemisia*, *Thyme*, *Caraway*, *Cinnamon*, *Clove bud*, *Mastic tree* and *Laurus nobilis L.* can be independently, extracted by ethanol. In some embodiments, *Salvia officinalis L*, *Citronella*, *Mentha*, *Ocimum basilicum L* *Basil*, *Lemon Grass-Cymbopogon*, *Caraway*, *Cymbopogon nardus Rendle*, *Celery*, *Myristica fragrans* and *Clove bud* can be independently, extracted by oils and herbal powders.

In some embodiments, *Cinnamon bark*, *Ceylon*, *Cinnamomum*, *Zeylanicum Nees*, *Clove bud*, *Mastic tree*, *Foeniculum vulgare Mill* and *Sandelwood bark* can be independently, extracted by either triglycerides and polyethylene glycol or a combination thereof.

In some embodiments, *Salvia officinalis L*, *Bergamot*, *Origanum*, *Eucaliptus*, *Rosmarinus officinalis L*, *Tea Tree Oil*, *Locust bean gum*, *cellulose*, *Glycerin*, *Gum Arabic* and *Guar gum* can be independently, extracted using mineral salts.

In some embodiments, *A. factorovsky*, *Salvia officinalis*, *Citronella*, *Geranium*, *Thyme*, *Star anise*, *Citric Acid*, *Vegetable oil*, *Vegetable oil fatty acids*, *Gum Arabic*, *Mentha*, *Lemon Grass*, *Sandelwood bark*, *Tea Tree Oil*, *Thyme*, *Lemon Grass* (i.e., *Cymbopogon*), *Pimenta racemosa*, *Caraway*,*Citric Acid*, *Ascorbic Acid*,*Citric Acid*, *Ascorbic Acid*, *Artemisia*, *Ocimum basilicum*, *Laurus nobilis*, *Cinnamon bark*, *Ceylon*, *Cinnamomum*, *Zeylanicum Nees*, *Clove bud*, *Mastic tree*, *Cymbopogon nardus Rendle*, *Pine Oil*, *Ginger*, *Ilicium*, *Guar gum*, *Myrrh*, *Citrus peel*, *Eugenia caryophyllata Thunb*, *Cumin* ,*Shellac*, *Fennel*, *Myristica fragrans*, *Foeniculum vulgare Mill*, *Melissa*, *Lavender*, *Neroli*, *Celery*, *Sage* (*Salvia officinalis*), *Bergamot* *peel*, *Origanum*, *Eucaliptus*, *Rosmarinus officinalis L*, *Tea Tree Oil*, *Carob powder* , *Locust bean gum*, *Cellulose*, *Glycerin*, *Gum Arabic* and *Guar gum* can be extracted by either pressure or filtering or a combination thereof.

Pharmaceutical compositions

As described herein the crude extracts, fractions and/or isolated compounds of the invention are suitable for oral, nasal, topical (including buccal and sublingual), rectal, vaginal, aerosol, intravenous, cutaneous or subcutaneous use on a subject. The subject may include a plant, a living animal, including a mammal such as a human.

The crude extracts, fractions and/or isolated compounds can be prepared in any desired delivery form known in the art of pharmaceuticals for example, the extract may be prepared as a tablet, capsule, tincture, powder, inhalant, syrup, spray, lozenge, solutions, gargles, colloidal dispersions, emulsions (oil-in-water or water-in-oil), suspensions, sprays, aerosol, granule and/or liquid. Other conventional formulations, including known carriers and additives, will be readily apparent to those skilled in the art.

In some embodiments, the pharmaceutical composition of the invention is formulated for aerosol administration, such as for administration by inhalation by a subject in need thereof.

The extracts, compounds and compositions of the invention are prepared so that they may be administered orally, dermally, parenterally, nasally, ophthalmically, sublingually, rectally or vaginally. Dermal administration includes topical application or transdermal administration. Parenteral administration includes intravenous, intraarticular, intramuscular, and subcutaneous injections, as well as use of infusion techniques. In some embodiments, the composition of the invention is administered by intranasal or intraoral administration, using appropriate solutions, such as nasal solutions or sprays, aerosols or inhalants. Nasal solutions are usually aqueous solutions designed to be administered to the nasal passages in drops or sprays. Typically, nasal solutions are prepared so that they are similar in many respects to nasal secretions. Thus, the aqueous nasal solutions usually are isotonic and slightly buffered to maintain a pH of 5.5 to 6.5. In addition, antimicrobial preservatives, similar to those used in ophthalmic preparations and appropriate drug stabilizers, if required, may be included in the formulation. Various commercial nasal and oral preparations for inhalation, aerosols and sprays are known and include, for example, antibiotics and antihistamines and are used for asthma prophylaxis. One or more compounds of the invention may be present in association with one or more non-toxic pharmaceutically acceptable ingredients to form the composition. These compositions can be prepared by applying known techniques in the art such as those taught in Remington - The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition (2005), Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,

11th Edition (2005) and Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (8th Edition), edited by Allen et al., Lippincott Williams & Wilkins, (2005).

5 The crude extracts, fractions and/or isolated compounds may be formulated as a pharmaceutical composition, by methods known to those skilled in the art. Pharmaceutically acceptable ingredients may be used. The term "pharmaceutically acceptable" refers to properties and/or substances which are acceptable for administration to a subject from a pharmacological or toxicological point of view. Further "pharmaceutically acceptable" refers to factors such as formulation, stability, patient acceptance and bioavailability which will be known to a manufacturing pharmaceutical chemist from a physical/chemical point of view.

10 The "suitable forms" of the pharmaceutical composition may be combined with "pharmaceutically acceptable carriers" and other elements known in the art to produce tablets, capsules, tinctures, powders, inhalants and/or liquids. The pharmaceutical composition may further be combined with other ingredients which promote the absorption of the extract(s) into the body.

15 Anti-pathogenic use

In some embodiments, the invention provides methods of treating an infection or lowering the risk of infection in a subject, wherein the method comprises administering an effective amount of the composition described herein to a subject. In one embodiment, the infection is selected from the group consisting of fungal, bacterial, viral and/or parasitic infections. In another embodiment, 20 the subject may be a mammal, such as a human. Alternatively, the subject may be from a botanic source, such as a plant or a tree.

Also provided herein are methods for inhibiting or reducing the formation of load of a microorganism and/or a formation of a biofilm or biofouling. In some embodiments said load of microorganism is maintained substantially reduced over a period of up to at least six months.

25 In some embodiments, the invention provides methods of inhibiting or reducing a formation of load of a microorganism and/or a formation of a biofilm or biosouling in water. In some embodiments, the invention provides methods of inhibiting or reducing a formation of load of a microorganism and/or a formation of a biofilm or biofouling in soil and/or sand.

30 In some embodiments, the invention provides methods of inhibiting or reducing a formation of load of a microorganism and/or a formation of a biofilm or biofouling on and/or within an article,

the method comprising incorporating or coating the composition described herein on and/or within said article.

In some embodiments, the composition of the invention further comprises a substrate, wherein said composition is incorporated or coated on at least a portion of said substrate. In some 5 embodiments, the substrate is or forms a part of an article. In some embodiments, said substrate comprises or is made of a polymer, wood, a metal, glass, carbon, a biopolymer and/or silicon.

According to some embodiments, there is provided an article comprising the composition of the invention.

In some embodiments of the compositions, article or methods described herein, said 10 microorganism or pathogens are selected from the group consisting of: viruses, fungi, parasites, yeast, bacteria, and protozoa.

The dosage of any compositions of the present invention will vary depending on the symptoms, age and body weight of the subject/patient, the nature and severity of the disorder to be treated or prevented, the route of administration, and the form of the subject composition. Any of 15 the subject compositions may be administered in a single dose or in divided doses. Dosages for the compositions of the present invention may be readily determined by techniques known to those of skill in the art or as taught herein. It will be appreciated that the crude extract, fraction, isolated compound and/or pharmaceutical composition comprising the crude extracts, fractions and/or isolated compounds may be used in applications for human, animal and/or veterinary products. 20 Further due to the nature of the compounds of the present invention it will be appreciated that the subject may also be a non-human organism, such as a plant.

The term "preventing", when used in relation to an infectious disease, or other medical disease or condition, is well understood in the art, and includes administration of a composition which reduces the frequency of, or delays the onset of, symptoms of a medical condition in a 25 subject relative to a subject which does not receive the composition. Prevention of an infection includes, for example, reducing the number of diagnoses of the infection in a treated population versus an untreated control population, and/or delaying the onset of symptoms of the infection in a treated population versus an untreated control population.

The term "prophylactic or therapeutic" treatment is well known to those of skill in the art and 30 includes administration to a subject of one or more of the subject compositions. If the composition is administered prior to clinical manifestation of the unwanted condition (e.g., disease or other

unwanted state of the subject) then the treatment is prophylactic, i.e., it protects the host against developing the unwanted condition, whereas if it is administered after manifestation of the unwanted condition, the treatment is therapeutic (i.e., it is intended to diminish, ameliorate, or stabilize the existing unwanted condition or side effects thereof).

5 The term "treating" is recognized by those of skill in the art and refers to curing, as well as ameliorating at least one symptom of a condition or disorder

The use of the crude extracts, fractions, isolated compounds and/or pharmaceutical compositions containing the compound of the invention entails administration of an effective amount of the crude extract, fraction, isolated compound and/or pharmaceutical composition 10 containing the compound to a subject in order to prevent or treat a condition.

The term "effective amount" or "effective dose" in the context of preventing or treating a condition refers to the administration of an amount of the active plant extract to an individual in need of treatment, either a single dose or several doses of the extract or pharmaceutical composition containing the extract, fraction and/or isolated compound. As will be appreciated by 15 those of ordinary skill in this art, the effective amount of a composition may vary depending on such factors as the desired biological endpoint, the drug to be delivered, the composition of any additional active or inactive ingredients, the target tissue and several other factors. The precise time of administration and amount of any particular subject composition that will yield the most effective treatment in a given patient will depend upon the activity, pharmacokinetics, and 20 bioavailability of the subject composition, physiological condition of the patient (including age, disease type and stage, general physical condition, responsiveness to a given dosage, sex and type of medication), route of administration, and other factors which are known to those in the art. The guidelines presented herein may be used to optimize the treatment, e.g., determining the optimum time and/or amount of administration, which will require no more than, routine experimentation 25 consisting of monitoring the subject and adjusting the dosage and/or timing.

Toxicity and therapeutic efficacy of compositions of the invention may be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, such as by determining the LD₅₀ and the ED₅₀. Data obtained from the cell cultures and/or animal studies may be used to formulating a dosage range for use in humans. The dosage of any subject composition 30 lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ which has little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed

and the route of administration utilized. For compositions of the present invention, the therapeutically effective dose may be estimated initially from cell culture assays.

The compounds obtained from an extract may be further purified and/or modified by means of synthetic organic chemistry methods which are well-known in the art. The compositions of the 5 invention may also be produced by synthetic organic chemistry methods well-known in the art.

The invention also relates in part to a method of treating an infection in a subject comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a compound or composition of the present invention.

It will be appreciated that the compounds of the present invention have antimicrobial and 10 anti-parasitic (e.g., antihelminthic) activity. As used herein the term "antimicrobial" includes bacteria, fungi, protozoans and viruses.

The infection may be a bacterial infection caused by a bacteria selected from, but not limited to, the following genera Acinetobacter, Actinobacillus, Actinomycetes, Aeromonas, Bacillus, Bordetella, Borrelia, Brucella, Campylobacter, Chlamydia, Clostridium, Corynebacterium, 15 Enterobacter, Enterococcus, Erwinia, Erysipelothnx, Escherichia, Francisella, Klebsiella, Haemophilus, Legionella, Leptospira, Listeria, Moraxella, Mycobacterium, Mycoplasma, Neisseria, Nocardia, Pasteurella, Pseudomonas, Rickettsia, Salmonella, Shigella, Spirillum, Staphylococcus, Streptobacillus, Streptococcus, Streptomyces, Treponema, Vibrio, Yersinia and Xanthomonas. Specifically, the bacterial infection may be caused by a bacterium selected from the 20 following species Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Mycobacterium aurum, Mycobacterium bovis, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium smegmatis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus and Salmonella typhi and/or Helicobacter pillory.

Alternatively, the infection may be a fungal infection caused by a fungus selected from, but not limited to, the group consisting of Alternaria, Aspergillus, Candida, Cercospora, 25 Cladosporium, Colletotrichum, Cryptococcus, Diplodia, Fusarium, Guignardia, Monilinia, Penicillium, Phytophthora, Plasmopara, Podosphaera, Puccinia, Pythium, Rhizoctonia, Rhizopus, Sclerotinia, Sphaerotheca, Trichoderma, Venturia and Verticillium. Specifically, the fungal infection may be selected from the group of species consisting of Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Aspergillus parasiticus, Aspergillus terreus, Aspergillus hennebergii, 30 Aspergillus amsteloda.rni, Aspergillus flavus, Candida albicans, Colletotrichum gloeosporioides, Cryptococcus neoformans, Fusarium oxysporum, Fusarium culmorum, Fusarium javanicum, Fusarium merismoides, Cladosporium herbarum, Discula pinicola, Paecilomyces variotti,

Sporidesmirum cladosporioides, Penicillium digitum, Penicillium expansum, Penicillium italicum, Penicillium janthinellum, Trichoderma harzianum, Trichosporium cheteromorphum, Rhizoctonia solani, Altemaria humicola, Altemaria tenuis, Penicillium brevi-compactum, Penicillium chrysogenum, Fusarium moniliforme, Fusarium poa, Penicillium ochro- chloron, Phialophora fastigiata, Verticillium marguandi, Leptographium lundbergii, Penicillium cyclopium and Pullularia pullulans

In a further embodiment, the infection may be a helminthic infection caused by a helminth selected from, but not limited to, the group consisting of Ascaris, Ancylostoma, Haemonchus, Trichostrongylos, Necator, Trichuris and Uncinaria.

According to another aspect, there is provided cosmetic products comprising the extracts or compositions of the invention. In some embodiments, the cosmetic products are in a form, such as creams, gels, powders, lotions, ointment, sunscreens, lipstick, body wash, foams, sprays, and/or herbal extracts.

Another aspect of the invention is the use of the extracts or compositions comprising the same to provide an antimicrobial effect to a patient in need thereof.

Another aspect of the invention is the use of the extracts or compositions comprising the same to provide an antimicrobial effect to a food or cosmetic composition.

Another aspect of the invention is the use of the extracts or compositions comprising the same to provide an antimicrobial effect to a surface. The effect may be produced by exposing the surface with the extracts or compositions of the invention or by laminating or embedding the extracts or compositions of the invention onto the surface itself. Another aspect of the invention are products with a surface which comprise the extracts or compositions of the invention which include, but are not limited to counter tops, doors, windows, handles, surgical equipment, medical tools, contact surfaces that can contaminate humans, animals, etc.

Another aspect of the invention is the use of the extracts or composition as an antimicrobial composition for coating a medical device. In one embodiment, the medical device is in the form of an implantable medical device. In another embodiment, the medical device is in the form of a fiber, mesh, powder, microspheres, flakes, sponge, foam, fabric, nonwoven, woven mat, a film, suture anchor device, suture, catheter, staple, stent, surgical tack, clips, plate and screw, drug delivery device, adhesion prevention barrier, and tissue adhesive.

Another aspect of the invention is the use of the extracts or composition as an antimicrobial agent in foods to improve preservation. In some embodiment, food preservation is the process of treating and handling food in a way that preserves its edibility and nutrition value.

Another aspect of the invention is the use of the extracts or composition as antimicrobial agents for the prevention and/or control of pre-harvest crop diseases comprising contacting an intended surface with the extracts or composition. In other embodiments, the extracts or composition are used as antimicrobial agents for the prevention and/or control of post-harvest rot in fruits and/or vegetables comprising contacting the fruits and/or vegetables with the extracts or composition. In other embodiments, the extracts or composition are used as antimicrobial agents for the prevention and/or control of post-harvest rot in fruits and/or vegetables and to prolong their shelf life (during the phases of storage, transport and sale), comprising contacting the fruits and/or vegetables with the extracts or composition.

Another aspect of the invention is the use of the extracts or composition as antimicrobial agents for treating animal diseases comprising administering the extracts or composition to an animal in need thereof. In other embodiments, the extracts or composition are used as antimicrobial agents for treating mastitis. In other embodiments, the extracts or composition are used as antimicrobial agents for treating gastrointestinal tract diseases.

Another aspect of the invention is the use of the extracts or composition as antimicrobial agents for treating infections in humans. In another embodiment, the extracts or compositions of the invention are used to treat a urinary tract infection (UTI). In another embodiment, the extracts or compositions of the invention are used to treat human stomach ulcers. In another embodiment, the extracts or compositions of the invention are used to treat human foot ulcers and/ or calluses. In another embodiment, the extracts or compositions of the invention are used to treat neuropathy. In another embodiment, the extracts or compositions of the invention are used to treat peripheral arterial disease (PAD). In another embodiment, the extracts or compositions of the invention are used as anti-viral gel. In another embodiment, the anti-viral gel is used to treat a viral disease caused by the herpes simplex virus. In another embodiment, the anti-viral gel is used to treat blisters and/or ulcers caused by herpes simplex virus.

Another aspect of the invention is the use of the extracts or composition as antimicrobial mouth rinses. In another embodiment, the antimicrobial mouth rinse reduces the bacterial count and inhibits the bacterial activity in dental plaque. In another embodiment, the extract or composition is sprayed into the mouth of a subject. In another embodiment, a gargling solution

comprising the composition is used to treat microbial infections in a mouth of a subject. In another embodiment, the composition is useful in treating mouth ulcers (known as aphthous stomatitis).

Another aspect of the invention is the use of the extracts or composition as antimicrobial agent for treating an infection, including but not limited to an infected throat, such as by contacting 5 (e.g. spraying, rinsing) the composition disclosed herein to the inflamed area, thereby treating the infected throat.

In some embodiments, there is provided pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of the extract(s) as described herein and a pharmaceutically acceptable carrier.

10 As used herein, "pharmaceutically-acceptable" means that drugs, medicaments or inert ingredients which the term describes are suitable for use in contact with the tissues of humans and lower animals without undue toxicity, incompatibility, instability, irritation, allergic response, and the like, commensurate with a reasonable benefit/risk ratio. For example, the term "pharmaceutically acceptable" can mean approved by a regulatory agency of the Federal or a state 15 government or listed in the U. S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans.

As used herein, "safe and effective amount" means an amount of compound or composition sufficient to significantly induce a positive modification in the condition to be treated, but low enough to avoid serious side effects (at a reasonable benefit/risk ratio), within the scope of sound 20 medical judgment. The safe and effective amount of the compound or composition will vary with the particular condition being treated, the age and physical condition of the patient being treated, the severity of the condition, the duration of the treatment, the nature of concurrent therapy, the specific compound or composition employed, the particular pharmaceutically-acceptable carrier utilized, and like factors within the knowledge and expertise of the attending physician.

25 If the topical pharmaceutical compositions of the present invention are formulated as an aerosol and applied to the skin as a spray-on, a propellant is added to a solution composition. A more complete disclosure of propellants useful herein can be found in Sagarin, Cosmetics Science and Technology, 2nd Edition, Vol. 2, pp. 443-465 (1972).

In the discussion unless otherwise stated, adjectives such as "substantially" and "about" 30 modifying a condition or relationship characteristic of a feature or features of an embodiment of the invention, are understood to mean that the condition or characteristic is defined to within

tolerances that are acceptable for operation of the embodiment for an application for which it is intended. Unless otherwise indicated, the word “or” in the specification and claims is considered to be the inclusive “or” rather than the exclusive or, and indicates at least one of, or any combination of items it conjoins.

5 In the description and claims of the present application, each of the verbs, “comprise,” “include” and “have” and conjugates thereof, are used to indicate that the object or objects of the verb are not necessarily a complete listing of components, elements or parts of the subject or subjects of the verb.

10

EXAMPLES

Materials and Methods

Plate count method validation

Tests were conducted by Pacific BioLabs (PBL) according to the lab’s standard operating procedures (SOPs). A suspension of challenged microorganisms (the composition tested and 15 *Salmonella enteric* or *Escherichia coli*) was prepared and maintained. Dilutions of the suspensions were prepared such that the resulting suspension levels contained approximately 1×10^3 colony forming units (CFU) per milliliter (mL). Next, the suspension was diluted in D/E broth to achieve 1:10 product dilution. 1 mL and 0.1 mL of 1:10 dilution were placed into duplicate appropriately labeled petri dishes. Less than 100 colony forming unit (CFU) of each of the 20 microorganism suspension was individually inoculated into the plates. In parallel two control plates were prepared by inoculating the same volume of the suspension dilution. A second set of phosphate buffer control was prepared for each organism to serve as neutralizing efficacy by inoculating the same volume of suspension dilution. Approximately 15-20 mL of molten TSA agar was then poured into plates. The plates were swirled to mix and allowed to harden, then were 25 placed in a 30-35°C incubator for not more than 24 hours. The plates were removed from the incubator and the number of colonies present on each plate was counted.

In vitro time kill assay

Tests were conducted by Pacific BioLabs (PBL) according to the lab’s standard operating procedures (SOPs). A suspension of challenged microorganisms (*Salmonella enteric* and 30 *Escherichia coli*) was prepared and maintained such that the resulting suspension levels contained approximately 1×10^8 colony forming units (CFU) per mL. 2% solution comprising the tested

compositions and 98% sterile water was prepared. 10 mL of the solution (comprising 2% of the composition) was placed into a sterile tube. 0.1 mL of the challenged organism was inoculated into the test sample container at a target inoculation level of $1*10^6$ CFU/mL. A duplicate plate count was performed on each inoculum immediately prior to inoculation. These were the positive control counts. The average of the two plates was used to calculate the log reduction at each time point for each microorganism. The inoculated test article was immediately vortexed following inoculation using a sterile instrument. A plate count was then performed on the inoculated sample after 30 seconds, 60 seconds and 5 minutes. The plate count was performed as follows: 1 mL of the inoculated test article placed into 9 mL of the neutralizing diluent validated for use in the efficacy study as described above under plate count method validation. This was the 10^{-1} dilution. 1 mL of the 10^{-1} dilution was placed into 9 mL of the neutralizing diluent. This was the 10^{-2} dilution. This dilution scheme was continued through a 10^{-5} dilution. 1 mL of each dilution was placed into duplicate appropriately labeled petri dishes and poured with molten TSA agar. 1 mL of the neutralizing diluent was plated in duplicate with molten TSA agar for use as a negative control. All plates were allowed to harden then were incubated in 30-35°C for not less than 48 hours. The plates were removed from the incubator and the number of colonies present on each plate was counted. The dilution that has 25-250 colonies was utilized for calculation purposes. The duplicate plates of each dilution were averaged for calculation purposes. The total number of survivor at each time point was then calculated by multiplying the average count obtained by the dilution factor. An overall log reduction for each test microorganism was calculated for each exposure time point using the initial inoculums titer.

Minimal Inhibitory concentration analyses

Tests were conducted by Pacific BioLabs (PBL) according to the lab's standard operating procedures (SOPs). A suspension of challenged microorganisms (*Salmonella enteric* and *Escherichia coli*) was prepared and maintained such that the resulting suspension levels contained approximately $1*10^6$ colony forming units (CFU) per mL. 2% solution comprising the tested compositions and 98% sterile water was prepared. The solution was diluted in Tryptic Soy Broth (TSB) to obtain 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16 dilution of the 2% composition. A positive control tube and a negative control tube were prepared, each containing 1 mL TSB. 1 mL of the organism suspension containing approximately $1*10^6$ CFU per mL was added to each of the composition dilution tubes and the positive control tube. The negative control tube remained un-inoculated. The tubes were incubated in 30 -35°C for 18-24 hours then examined for growth. 1 mL from each from

each test tube was transferred to 9 mL of DEB. This product dilution was immediately mixed using a vortex. Subsequently, 1 mL was transferred onto TSA. The plates were incubated for minimum 24 hours and then examined for growth. The slightest evidence of growth was recorded as a positive test sample. No growth was recorded as a negative test sample. The minimal inhibitory 5 concentration was the highest product dilution that tests negative as detected by the results on the TSA plate.

General cell count

These test were conducted by the association of public health labs according to israeli's standard no 885/3. A concentration of 5% of the composition was tested in the presence of 10^6 or 10 10^7 Escherichia coli, the positive control contained 10^6 Escherichia coli and water and a the negative control contained the 5% concentration of the composition. General plate count was performed.

Effectiveness and activity of the compositions of the invention

15 **(i) Tree rehabilitation and restoration:**

Compositions comprising extracts of Aaronsohnia factorovskyi were used to test their effectiveness for tree rehabilitation. These tests were conducted by Shelef Agro Lab and included different types of trees such as Eucaliptus, Citrus, Oak and other types of trees. The composition was first diluted in water to obtain a concentration of 0.5% -5% of the composition. For treating 20 the trees, 5-10 liters of diluted composition were planted in the soil proximal to the trees, sprayed on the branches of the trees or a combination thereof.

Surprisingly, a significant portion of the trees rehabilitated within a time frame of 30 days. Within 30 days, new leaves and branches started to grow on treated trees. A person with skill in the art can recognize different this treatment can be applied on different types of trees.

25 Further experiments were set to test tree rehabilitation and restoration using a second composition comprising the above components as well as ingredients: Salvia officinalis, Geranium, Star anise. A significant portion of the trees rehabilitated within a time frame of 15 days.

Tests were designed to examine the biocide effectiveness of the composition in respect of 30 the pine wood protection against the affect of various groups of wood coloring and mold fungi. 27

fungi species representing 3 different ecological systematic groups (9 micromycetic species each) were used as infectious agents. The first group (I) comprised Aspergillus niger, Aspergillus terreus, Altemaria humicola, Penicillium brevi-compactum, Penicillium chrysogenum, Fusarium moniliforme, Fusarium poa, Penicillium ochro-chloron and Phialophora fastigiata. The second group (II) comprised: Aspergillus hennebergii, Cladosporium herbarum, Fusarium javanicum, Fusarium merismoides, Discula pinicola, Paecilomyces variotti, Sporidesmium cladosporioides, Trichosporium cheteromorphum and Verticillium marguandi. The third group (III) comprised: Aspergillus amsteloda.rni, Aspergillus flavus, Altemaria tenuis, Fusarium culmorum, Leptographium lundbergii, Penicillium cyclopium, Pullularia pullulans and Trichodenna harzianum.

Mean area of the fungi affection of the surface as well as the stage of fungi development were evaluated visually after 5, 10, 15 days. The growth data on the control specimens indicates the high level of infectious background that shows test result reliability in evaluating test specimens. Biostest species from the second ecological systemic group are aggressive for the pine wood. The wood of test and control specimens is mostly spored by Penecillium and Aspergillus. Test results reveal that antiseptic solutions 0.2% supplied by the customer has not shown 100% fungicidal activity in suppression of biotests. 0.5% antiseptic solution showed relatively high fungicidal activity, and evidently can be used for the further development of the preparation effectiveness addition of effective preservation antiseptic. Test results show that 0.5% solution can be used as a part of a mixed preparation in conditions of relatively low moisture capacity of wood. Results are summarized in table 1.

Table 1. Biocide effectiveness of the composition in respect of the pine wood protection against the affect of various groups of wood coloring and mold fungi

Biostests (groups)	Exposure (days)	The composition of the invention							
		0.2%		0.5%					
		Affection of inoculated and control specimens (% of affected area and fungi development stage in marks)							
		% mark		%		Mark			
		test	control	test	control	test	control	test	control
I	5	35	5	1	0	30	0	1	0
	10	75	20	3	2	70	10	2	0
	15	95	30	5	3	100	20	5	2
II	5	20	10	1	0	15	5	1	0
	10	45	30	2	2	30	15	3	1
	15	100	55	4	3	100	35	4	3
III	5	30	5	1	0	35	0	1	0

	10	60	15	3	2	50	10	3	1
	15	90	35	5	3	90	20	5	2
Association culture (1+2+3)	5	30	15	2	0	35	0	2	0
	10	70	20	3	2	80	10	4	1
	15	100	35	5	4	100	15	5	2

6-marj scale:
 0 – completely clean specimens, absence of conidium's germs and colony development (visually and under the microscope);
 1 - visually clean specimens, however small mycelium nidi in the form of spots are visible, spores are absent;
 2 – superficial mycelium development in the form numerous spots, no spores;
 3 – abundant mycelium overgrowth on the specimen surface, beginning of the spore formation;
 4 - visual examination shows dense mycelium growth and spore formation;
 5 – deep mycelium affection of the whole specimen area with intense spore formation.

(ii) Effectiveness against nematode:

5 A composition comprising extracts derived from *A. factorovskyi*, *Salvia officinalis*, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil was tested for its effectiveness against nematode. This composition showed good results against nematode. The composition was used to treat soil with nematodes; the soil was tested 24 hours post treatment of the soil with irrigation water comprising 0.02% to 0.05% of the composition. The soil was sampled and 100 gram of treated soil and untreated soil were examined by Shelef Agro Lab. The result presented 92% decrease in nematode presence from the untreated soil sample to the treated soil. As summarized on table 2, the composition used was effective for treating nematodes.

Table 2. Nematodes in presence treated and untreated soil.

Sample origin	Nematodes presence	Nematode level from 1-10
Untreated soil	Meloidogyne	10 (very high)
Treated soil	Meloidogyne	1 (low)

15 **(iii) Effectiveness against pathogenic bacterium and yeast:**

The antimicrobial effectiveness of a composition comprising extracts derived from *A. factorovskyi*, *Salvia officinalis*, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, against bacterium and yeast was tested. Figures 1A-B show antibiogram results of the compositions described herein against *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Candida albicans*, and *Pseudomonas aeruginosa* after 24h and Figures 1D-E show the corresponding activity after 48h. Figures 1C and 1F are respective controls.

(iv) Effectiveness as poultry hatcheries disinfectant:

Currently, formalin or formaldehyde is used as poultry hatcheries disinfectant, such as for washing eggs, equipment and incubators. A composition comprising: A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, Detergents, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil was examined and surprisingly shown to be effective as poultry hatchery disinfectant. Tests were conducted by Anjon Biologics. Table 3 summarizes the results of in-vitro time kill assay, demonstrating the effectiveness of the composition for treating bacterial and viral infections in human and animals.

Table 3. Evaluation of antimicrobial properties using in vitro time kill.

Challenge organism	Product inoculation	CFU/mL of sample	Log 10 reduction	Time to kill
S. enterica	$5.9*10^5$	<1	>5.8	<30 seconds
E. coli	$7.1*10^5$	<1	>5.9	<30 seconds
P. aeruginosa	$5.9*10^5$	<1	>5.8	<30 seconds
Staphylococcus aureus	$6.2*10^5$	<1	>5.9	<30 seconds
Klebsiella pneumoniae	$6.8*10^5$	<1	>5.9	<30 seconds
Resistant bacteria successfully treated with Scour Stopper in trials Beta lactamases (EBSLs) enzyme producing E. coli A clostridium difficile Carbapenem-resistant Klebsiella pneumonia				

(v) Effectiveness preventing animal feed oxidation damage:

The effectiveness of a composition comprising extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, Detergents, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass (Cymbopogon), Pimenta racemosa, Caraway, Citric Acid, and Ascorbic Acid, for preventing animal feed oxidation damage was tested.

The feed oxidation test was conducted for 30 days, at 35°C and 75% relative humidity. The performance of the composition of the invention was similar to that of known popular antioxidants in preventing animal feed oxidation damage.

(vi) **Effectiveness against Legionella pneumophila**

Legionella pneumophila is a gram-negative bacterium found naturally in the environment, usually in water. Legionella pneumophila is a human pathogen that can cause Legionnaires disease.

5 The effectiveness of a composition comprising extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass-Cymbopogon, Pimenta racemosa, Caraway,Citric Acid, Ascorbic Acid, Citric Acid, Ascorbic Acid, Artemisia, Ocimum basilicum, Laurus nobilis, for treating Legionella Pneumophila was
10 examined.

The lab experiments were conducted by Hylabs Inc. Two portions of tap water were spiked with Legionella pneumophila. 1.5 gram of the composition was added to the test samples. Water samples were filtered through a microbiological membrane filter, and the two membranes were aseptically translated to two Hy Legionella Medium Selective B.C.Y.E. plates respectively and
15 incubated as appropriate, next plate count was performed. Results summarized in Table 4, demonstrate that the composition inhibits the growth of Legionella pneumophila.

Table 4. Legionella pneumophila growth

Inocula control Hy Legionella Medium Selective B.C.Y.E.	Growth on reference membrane (water+inocula without tested composition) Hy Legionella Medium Selective B.C.Y.E.	Growth on reference membrane (water+inocula+ tested composition) Hy Legionella Medium Selective B.C.Y.E.
250 CFU	128 CFU	0 CFU

In another experiment the composition was added to water pipes, water samples were tested
20 for the presence of Legionella pneumophila prior and post treatment. Results are summarized in Table 5.

Table 5. Results of water examination

Specimen description	Sampling time	Sampling temperature °C	pH	Turbidity NTU	General Chlorine ppm	Remaining chlorine ppm	Results	
							Lagionela CFU/1000cc	Lagionela identification

(i)	Prior treatment	9:05	23.1	8.15	0.82	0.08	0.06	<1	
	Post treatment	9:10	60.1	8.21	0.85	0.09	0.07	<1	
(ii)	Prior treatment	9:15	21.2	8.22	0.7	0.1	0.08	2130	Lp1
	Post treatment	9:20	58.4	8.18	0.62	0.06	0.05	8	Lp1
(iii)	Prior treatment	9:25	31.1	8.2	0.72	0.09	0.07	<1	
	Post treatment	9:30	59.1	8.22	0.75	0.1	0.08	<1	

(vii) Effectiveness against Salmonella enteric and Escherichia coli Bacterium

The effectiveness of a composition comprising extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass-Cymbopogon, Pimenta racemosa, Caraway,Citric Acid, Ascorbic Acid, Citric Acid, Ascorbic Acid, Artemisia, Ocimum basilicum, Laurus nobilis, Cinnamon bark, Ceylon. Cinnamomum, Zeylanicum Nees, Clove bud, Mastic tree, Cymbopogon nardus Rendle, Pine Oil, Ginger, Ilicium, Guar gum, Detergent against two microorganism strains, Salmonella enteric and Escherichia coli was tested.

A time kill evaluation utilizing direct inoculation of the composition and determination of microbial survival was conducted as described in the materials and methods. The exposure time for evaluating microbial lethality were 30 seconds, 60 seconds or 5 minutes following inoculation. Results demonstrate the efficiency of the composition against Salmonella enteric and Escherichia coli. The total number of survivor at each time point for both Salmonella enteric and Escherichia coli was very low (<10). In addition the calculated overall log reduction for Salmonella enteric and Escherichia coli each exposure time point was >5.7 and >5 respectively (Table 6). A water solution comprising 2% of the composition was demonstrated to be sufficient to inhibit Salmonella enteric and Escherichia coli growth, as determined using the minimum Inhibitory concentration method described in the materials and methods. As shown in table 7 when further diluting the composition the inhibition effect is lost. The effect of the composition of the invention on Escherichia coli growth was also examined by general count of the number of colonies present on each plate using 5% composition and two concentrations of Escherichia coli by the association of public health the number of colonies present on each plate was counted (table 8).

25 **Table 6. Minimal Inhibitory Concentration analyses**

Organism	Salmonella enteric		Escherichia coli	
inoculum	5.4×10^6		1×10^6	
Time point	Average Sample CFU/mL	Log10 reduction	Average Sample CFU/mL	Log10 reduction
30 seconds	<10	>5.7	<10	>5
60 seconds	<10	>5.7	<10	>5
5 minutes	<10	>5.7	<10	>5

Table 7. In vitro time kill assay

Organism	Salmonella enteric	Escherichia coli
Inoculum	5.4×10^6	1×10^6
1:1 undiluted water solution comprising 2% of the composition	No Growth	No Growth
1:2 dilution	Growth	Growth
1:4 dilution	Growth	Growth
1:8 dilution	Growth	Growth
1:16 dilution	Growth	Growth
Positive control	Growth	Growth
Negative control	No Growth	No Growth

Table 8. General cell count

Product	Result for 1 gram of product
1mL of 5% composition with 10^7 E. coli	0
1mL of 5% composition with 10^6 E. coli	0
1mL of 5% composition (negative control)	0
1mL water with 10^6 E. coli (positive control)	The plate is full with colonies

5

(viii) Effectiveness for sand sterilization and biofilm treatment

The effectiveness of an embodiment of the composition of the invention was tested for its use for sand sterilization and biofilm treatment. The tested composition comprised extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, Mentha, Lemon Grass, Sandalwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass-Cymbopogon, Pimenta racemosa, Caraway, Citric Acid, Ascorbic Acid, Artemisia, Ocimum basilicum, Laurus nobilis, Cinnamon bark, Ceylon. Cinnamomum, Zeylanicum Nees, Clove bud, Mastic tree, Cymbopogon nardus Rendle, Pine Oil, Ginger, Illicium, Guar gum, Myrrh, Citrus peel, Eugenia caryophyllata Thunb and Cumin. Four square meters were treated with 8 liters of water comprising 400mL of the composition (8% of the composition). Sand samples were collected prior and post treatment and analyzed in an

independent lab (Bactochem) for the presence of Escherichia coli. Results demonstrate a decrease from 560000 Escherichia coli per gram (MPN) prior treatment to 240 Escherichia coli per gram (MPN) post treatment.

(ix) Effectiveness for treating plant diseases

5 Rhizopus is a genus of common saprobic fungi on plants and specialized parasites on animals. They are found on a wide variety of organic substrates, including fruits and vegetables. The effectiveness of a composition of the invention for treating Rhizopus in tomatoes was examined. The tested composition comprisesd extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass-Cymbopogon, Pimenta racemosa, Caraway,Citric Acid, Ascorbic Acid,Citric Acid, Ascorbic Acid, Artemisia, Ocimum basilicum, Laurus nobilis, Cinnamon bark, Ceylon. Cinnamomum, Zeylanicum Nees, Clove bud, Mastic tree, Cymbopogon nardus Rendle, Pine Oil, Ginger, llicium, Guar gum, Myrrh, Citrus peel, Eugenia caryophyllata Thunb, Cumin ,Shellac, Fennel, Myristica fragrans, Foeniculum vulgare Mill, Melissa, Lavender and Neroli.

10

15

Leaves and tomatoes infected with Rhizopus fungi were treated with the composition for 9 days. The leaves and tomatoes as well as cropped tomatoes were each sprayed twice over nine days with a dilution comprising 0.5%-2% of the composition diluted in water or a control. A significant inhibition of fungal growth was observed after 5 days, resulting in healthy cropped tomatoes. A 20 significant inhibition of fungal growth on the tomato plants was observed after 9 days, resulting in healthy tomatoes plants. A person with skill in the art can recognize the potential of the composition to treat other fruits and vegetables as well as other fungi species.

Phytophthora infestans is an oomycete that can infect potatoes, tomatoes and other members of the Solanaceae, it is considered a difficult disease to control today by ordinary methods. Tests 25 were conducted in order to examine the effectiveness of the composition for treating Phytophthora infestans. . Tomatoes plants infected with Phytophthora infestans were treated by spraying the plants with different dilutions comprising 0.05%, 0.2%, 0.3%, 0.4% of the compositions diluted in water or a control. Result after 7 days demonstrate the inhibition of Phytophthora infestans growth is best achieved by using 0.4% dilution of the composition, resulting in healthy plants.

30

(x) Effectiveness for treating Mastitis

Mastitis in dairy cattle is the persistent, inflammatory reaction of the udder tissue. This potentially fatal mammary gland infection is a very common disease in dairy cattle. Mastitis can occur as a result of chemical, mechanical, or thermal injury or by invasion of bacteria. When mastitis is caused by bacterial infection, the bacterial toxins can damage the milk-secreting tissue, 5 and various ducts throughout the mammary gland.

The effectiveness of a composition comprising extracts derived from *A. factorovskyi*, *Salvia officinalis*, *Citronella*, *Geranium*, *Thyme*, *Star anise*, *Citric Acid*, *Vegetable oil*, *Vegetable oil fatty acids*, *Gum Arabic*, *Mentha*, *Lemon Grass*, *Sandelwood bark*, *Tea Tree Oil*, *Thyme*, *Lemon Grass (Cymbopogon)*, *Pimenta racemosa*, *Caraway*, *Citric Acid*, *Ascorbic Acid*, *Citric Acid*, *Ascorbic Acid*, *Artemisia*, *Ocimum basilicum*, *Laurus nobilis*, *Cinnamon bark*, *Ceylon Cinnamomum*, *Zeylanicum Nees*, *Clove bud*, *Mastic tree*, *Cymbopogon nardus Rendle*, *Pine Oil*, *Ginger*, *Ilicium*, *Guar gum*, *Myrrh*, *Citrus peel*, *Eugenia caryophyllata Thunb*, *Cumin*, *Shellac*, *Fennel*, *Myristica fragrans*, *Foeniculum vulgare Mill*, *Melissa*, *Lavender* and *Neroli* was examined as a treatment for cattle mastitis.

15 A first dose of 75mL of the composition caused restimulation of the epithelia in the utters, and an undesired increase in somatic cells. Next, less components were used, a composition comprising extracts derived from *A. factorovskyi*, *Artemisia*, *Ocimum basilicum L Basil*, *Laurus nobilis L Bay leaves*, fruits and seeds, *Cinnamon bark*, *Ceylon Cinnamomum leaves and bark*, *Zeylanicum Nees leaves*, fruits and seeds, *Clove bud leaves*, fruits and seeds, *Mastic tree bark*, 20 *sapp and leaves*, *Cymbopogon nardus Rendle Leave extracts*, *Pine Oil*, *Ginger*, *Ilicium*, *Guar gum*, *Myrrh*, *Citrus peel*, *Eugenia caryophyllata Thunb*, *Cumin*, *Fennel sweet flowers*, seeds and leaves, *Myristica fragrans seeds* *Foeniculum vulgare Mill seeds*, *Melissa leaves*, *Lavender leaves and seeds*, *Sandelwood bark*, *Neroli seeds and fruit extract*, *Tea Tree Oil seeds and leaves*, *Vegetable oil fatty acids* and *Gum Arabic* was found to decrease somatic cells.

25 After laboratory testing of the composition, the composition was submitted for preliminary field tests to determine the efficacy and suitability of the treatment in field conditions. Tests were performed by Anjon Biologics. Infections ranged from subclinical infection to critical clinical disease levels. The three primary pathogens detected were *S.enterica*, *Staphylococcus areus*, *Serratia* and *Escherichiac coli*. Treatments were applied using intramammary infusion. 30 Applications were made using a single application of 30 mL. Significant reductions in the somatic cell counts (SCC) were achieved using the composition of the invention with one test case with a pre treatment SCC of 9,949,000 levels increased within 48 hours after treatment. Somatic cell

counts were tested at 24, 48, 96 hours and 5 days and 10 days after treatment with six test cases showing significant reduction in somatic cell count as shown in figure 2.

(xi) Effectiveness for treating gastrointestinal tract disease

5 The therapeutic effectiveness of a composition comprising extracts derived from A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic, Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass-Cymbopogon, Pimenta racemosa, Caraway, Citric Acid, Ascorbic Acid, Artemisia, Ocimum basilicum, Laurus nobilis, Cinnamon bark, Ceylon, Cinnamomum, 10 Zeylanicum Nees, Clove bud, Mastic tree, Cymbopogon nardus Rendle, Pine Oil, Ginger, Ilicium, Guar gum, Myrrh, Citrus peel, Eugenia caryophyllata Thunb, Cumin, Shellac, Fennel, Myristica fragrans, Foeniculum vulgare Mill, Melissa, Lavender, Neroli, Celery, Salvia officinalis, Bergamot peel extract, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus officinalis L, Tea Tree Oil, Carob powder, Locust bean gum, Cellulose, Glycerin, Gum Arabic, Gum Arabic and Guar gum, was demonstrated for 15 treating gastrointestinal tract diseases in piglets and calves. The composition of the invention was used on calves with diverse stages of the gastrointestinal tract disease caused by Klebsiella infection. Results showed that within 24 hours of the first application of the composition of the invention, bowel discharge had returned to near normal with a medium brown color and mucous discharge has stopped. Calves showing signs of distress with progressive loose yellow discharge, 20 that were still eating but not on regular basis, had returned to normal eating and drinking in 24-48 after the initial treatment. Calves with higher level of infection, showing thick mucus discharge, that stopped eating or drinking, returned to near normal bowel function over the 24-48 hours after the initial treatment. Intake of fluids started within 24-48 hours period with clearing of all symptoms within 3 days.

25

(xii) Effectiveness for treating human stomach ulcers caused by helicobacter pylori

Helicobacter pylori is a gram negative bacteria it is typically found in the epithelial cells underneath the mucus lining of the human stomach. Helicobacter pylori can cause ulcers in 30 the lining of the stomach or the upper part of the small intestine and is also linked to the development of duodenal ulcers.

The efficiency of a composition comprising A. factorovsky, Salvia officinalis, Citronella, Geranium, Thyme, Star anise, Citric Acid, Vegetable oil, Vegetable oil fatty acids, Gum Arabic,

Mentha, Lemon Grass, Sandelwood bark, Tea Tree Oil, Thyme, Lemon Grass-Cymbopogon, Pimenta racemosa, Caraway, Citric Acid, Ascorbic Acid,Citric Acid, Ascorbic Acid, Artemisia, Ocimum basilicum, Laurus nobilis, Cinnamon bark, Ceylon. Cinnamomum, Zeylanicum Nees, Clove bud, Mastic tree, Cymbopogon nardus Rendle, Pine Oil, Ginger, Illicium, Guar gum, Myrrh,
5 Citrus peel, Eugenia caryophyllata Thunb, Cumin ,Shellac, Fennel, Myristica fragrans, Foeniculum vulgare Mill, Melissa, Lavender and Neroli, Celery leaves, seeds and roots, Sage - Salvia officinalis, Bergamot peel extract, Origanum leaves, Eucaliptus leaves and bark, Rosmarinus officinalis L leaves and flowers, Tea Tree Oil seeds and leaves, Carob powder, Locust bean gum, Cellulose, Glycerin, Gum Arabic, Gum Arabic, Guar gum for treating human stomach ulcers, was
10 examined. Subjects suffering from pain related to stomach ulcers and/ or duodenal ulcers were treated with the composition, using at least 5 drops of the composition in half a glass of water for 7-10 days. In the conclusion of 7-10 days of a daily treatment, tested subjects reported relief in symptoms including pain.

15

(xiii) Effectiveness for treating human urinary tract infection

Urinary tract infection (UTI) is an infection that affects part of the urinary tract. UTI can be caused by Escherichia coli or other bacteria, viruses or fungi.

The efficiency of a composition of the invention for treating human urinary tract infection
20 was examined. The tested composition comprised A. factorovsky, Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum (Star anise), Ocimum basilicum, Cymbopogon (Lemon Grass), Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Clove bud, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus (Mastic tree), Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens (Celery), Foeniculum vulgare (Fennel), Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark and Neroli.
25

Subjects were treated with the composition, using at least 5 drops of the composition in a glass of water per day for 3-7 days. Following 3 daily treatments, tested subjects reported relief in symptoms.

30

(xiv) Effectiveness for treating peripheral arterial disease (PAD), neuropathy, calluses and foot ulcers in humans

Peripheral arterial disease is a circulatory problem in which narrowed arteries reduce blood flow to the foot/feet, resulting in oxygen deprivation of cells. This condition makes the skin more vulnerable to injury and slows the feet ability to heal. Peripheral neuropathy is nerve damage in the feet or lower legs, subjects suffering from peripheral neuropathy and/or peripheral arterial disease commonly suffer from open sores in the foot (foot ulcers) and toughened area of skin (calluses).

Subjects suffering from calluses and foot ulcers caused by peripheral arterial disease and/or Peripheral neuropathy were treated with a composition comprising A. factorovsky, Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum (Star anise), Ocimum basilicum, Cymbopogon (Lemon Grass), Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Clove bud, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus (Mastic tree), Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens (Celery), Foeniculum vulgare (Fennel), Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark and Neroli. In 5 to 7 weeks 90% of subjects show recovery of blood circulation, feet sensation and feet temperature and report better mobility of the legs. In addition the severity of foot ulcers and calluses were improved.

(xv) **Effectiveness for treating herpes simplex**

Herpes simplex is a viral disease caused by the herpes simplex virus. Infections are categorized based on the part of the body infected. Oral herpes involves the face or mouth and may result in small blisters or may cause a sore throat. Genital herpes, often simply known as herpes, may have minimal symptoms or form blisters that break open and result in small ulcers.

A gel comprising a composition comprising A. factorovsky, Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum (Star anise), Ocimum basilicum, Cymbopogon (Lemon Grass), Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Clove bud, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus (Mastic tree), Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens (Celery), Foeniculum vulgare (Fennel), Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark and Neroli was found to be effective for treating herpes simplex virus.

Descriptions of embodiments of the invention in the present application are provided by way of example and are not intended to limit the scope of the invention. The described embodiments comprise different features, not all of which are required in all embodiments of the invention. Some embodiments utilize only some of the features or possible combinations of the features. Variations 5 of embodiments of the invention that are described, and embodiments of the invention comprising different combinations of features noted in the described embodiments, will occur to persons of the art. The scope of the invention is limited only by the claims.

CLAIMS

1. A composition comprising an extract of Aaronsohnia factorovskyi, and one or more carriers and/or excipients.
2. The composition of claim 1 comprising 0.1-10 wt % of said Aaronsohnia factorovskyi
5 extract.
3. The composition of claim 1, further comprising one or more extracts selected from the group consisting of: Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Clove bud, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus, Cymbopogon nardus
10 F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens, Foeniculum vulgare, Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark and Neroli.
4. The composition of claim 1, further comprising one or more extracts selected from the group consisting of: Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Clove bud Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus, Cymbopogon nardus
15 F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens, Foeniculum vulgare, Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark, Neroli, Citrus bergamia, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus officinalis and Melaleuca alternifolia.
5. The composition of claim 1, comprising an extract derived from Aaronsohnia factorovskyi
20 and at least twenty extracts selected from the group consisting of: Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus, Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens, Foeniculum vulgare, Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark, Neroli, Citrus bergamia, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus
25 officinalis and Melaleuca alternifolia.
6. The composition of claim 1, comprising extracts derived from Aaronsohnia factorovskyi, Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus, Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae,
30

Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens, Foeniculum vulgare, Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark and Neroli.

7. The composition of claim 1, comprising extracts derived from Aaronsohnia factorovskyi, Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racemosa, Carum carvi, Cinnamomum, Syzygium aromaticum, Pistacia lentiscus, Cymbopogon nardus F. poaceae, F. rutaceae, Eugenia caryophyllata, Cuminum, Apium graveolens, Foeniculum vulgare, Myristica fragrans, Melissa officinalis, Lavender, Sandelwood bark, Neroli, Citrus bergamia, Origanum, Eucaliptus, Rosmarinus officinalis and Melaleuca alternifolia.
- 10 8. The composition of any one of claims 2-5 including a content ranging from 0.2 to 20 wt % of said extracts.
9. The composition of any of the proceeding claims, further comprising one or more ingredients selected from the group consisting of croton lechleri extract, Medicago sativa, Thymus serpyllum, myrrh, ginger, chamomile and Sesamum indicum, or combination thereof.
- 15 10. The composition of any of the proceeding claims, further comprising one or more algae extract selected from the group consisting of Rhodophyta, Phaeophyceae Laminaria, and Porphyra, or combination thereof.
11. The composition of any of the proceeding claims, wherein said carrier is selected from the 20 group consisting of coconut oil, cottonseed oil, pine oil, safflower oil, linseed oil, palm oil, peanut oil, gum arabic, guar gum, and locust bean gum, or combination thereof.
12. The compositions of any of the proceeding claims for preventing or treating an infection.
13. The composition of any one of claims 1 to 11, further comprising a substrate, wherein said composition is incorporated or coated on at least a portion of said substrate.
- 25 14. The composition of claim 12, wherein said substrate is or forms a part of an article.
15. The composition of any one of claims 13 or 14, wherein said substrate comprises or is made of a polymer, wood, a metal, glass, carbon, a biopolymer and/or silicon.
16. An article comprising the composition of any one of claims 1 to 15.
17. A method of inhibiting or reducing a formation of load of a microorganism and/or a 30 formation of a biofilm or biofouling on and/or within an article, the method comprising

incorporating or coating the composition of any one of claims 1-11 on and/or within said article.

18. The method of claim 17, wherein said microorganism being selected from the group consisting of: viruses, fungi, parasites, yeast, bacteria, and protozoa.

5 19. The method of claim 17, wherein said load of microorganism is maintained substantially reduced over a period of up to at least six months.

20. A method of treating an infection in a subject in need thereof, the method comprising contacting or administering to the subject a therapeutically acceptable amount of the composition of any one of claims 1-11.

10 21. A composition of any one of claims 1-11, for use in treating an infection in a subject in need thereof.

*Acinetobacter
baumannii*

E.

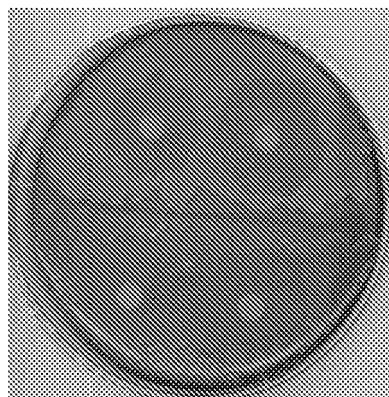


FIG. 1A

*Candida
albicanse*

*Pseudomonas
aeruginosa*

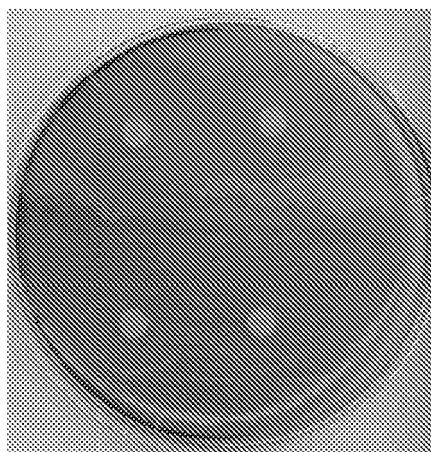


FIG. 1B

Control

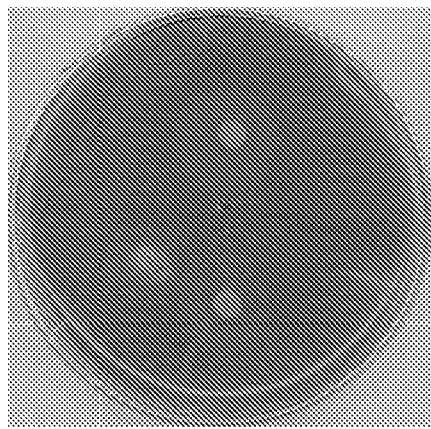


FIG. 1C

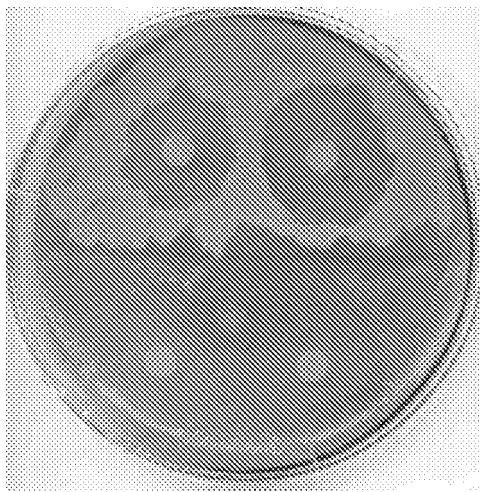
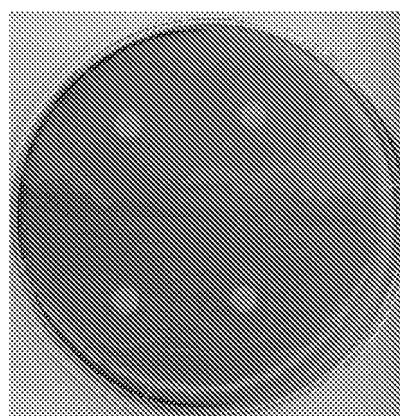


FIG. 1D

*Candida
albicanse*



*Pseudomonas
aeruginosa*

Control

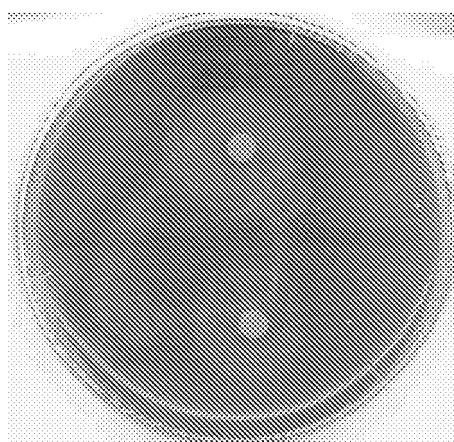
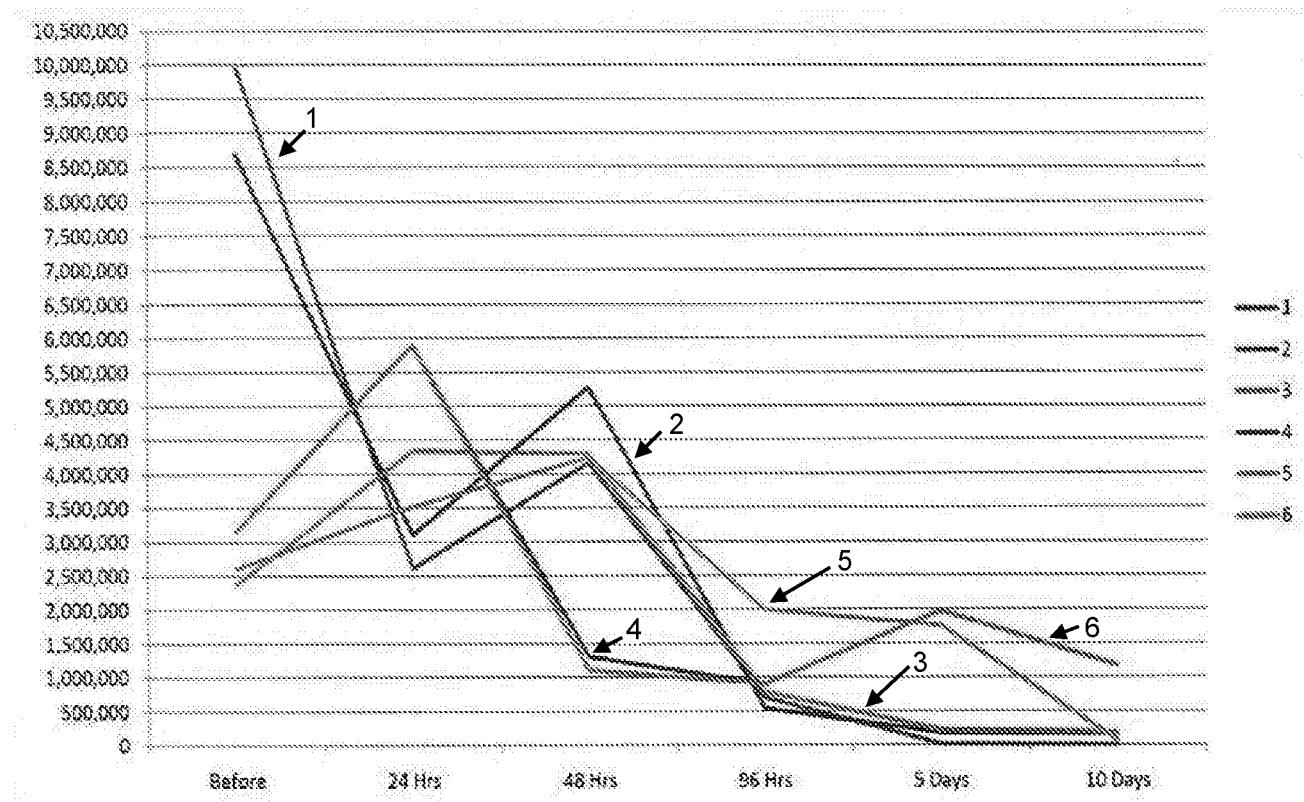


FIG. 1F

**FIG. 2**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB16/51506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 8/97, 36/28, 36/53, 36/54, 36/282 (2016.01)

CPC - A61K 8/97, 36/28, 36/53, 36/534 36/282

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC (8) - A61K 8/97, 36/00, 36/28, 36/53, 36/54, 36/282, 36/534, 36/537 (2016.01);

CPC - A61K 8/97, 36/00, 36/28, 36/53, 36/534 36/282, 36/9066; USPC - 424/725, 739, 740, 742, 747, 764, 778, 779

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, Other Countries (INPADOC), RU, AT, CH, TH, BR, PH); EBSCO; Google/Google Scholar; PubMed; Aaronsohnia factorovskyi, babounaj zaghira, yellow chamomile, baboonig, Artemisia, Salvia, Citronella, Geranium, Mentha, Thyme, Illicium verum, Ocimum basilicum, Cymbopogon, Laurus nobilis, Pimenta racernosa, Cinnamomum

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	US 2012/0276224 A1 (HAN, CS et al.) 1 November 2012; abstract; paragraphs [0001], [0076], [0136], [0194]	1-2, 8/2 ---
Y	US 2014/0295004 A1 (AKZO NOBEL SURFACE CHEMISTRY LLC) 2 October 2014; paragraphs [0052]-[0054]	3-4, 6-7, 8/3-5
Y	US 2014/0079639 A1 (LIFESPAN EXTENSION, LLC); 20 March 2014; paragraphs [0020], [0177], [0191]-[0201]	5, 8/5
Y	- (SHABSOUG, B et al.) Enhancement of Natural Killer Cell Activity In Vitro Against Human Tumor Cells by Some Plants From Jordan. Journal of Immunotoxicology. 2008. vol. 5; table 1	1-2, 5-7, 8/2
A	- KR 2006/0100743 A (SEOUL NAT UNIV IND FOUNDATION) 21 September 2006; see English translation; abstract; claims 1, 3; paragraphs [30], [75], [100]	3-4, 6-7, 8/3-4
A	- CN 101849899 A (SHANGHAI YUANSHANGCAO COSMETICS CO LTD) 6 October 2010; see English translation; paragraphs [0001], [0005], [0013]	3-4, 6-7, 8/3-4

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 July 2016 (05.07.2016)

Date of mailing of the international search report

15 AUG 2016

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB16/51506

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos..
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 9-21
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau



(10) International Publication Number

WO 2012/131732 A1

(43) International Publication Date
4 October 2012 (04.10.2012)

WIPO | PCT

(51) International Patent Classification:

A61K 36/185 (2006.01) A61K 36/264 (2006.01)
A61K 36/537 (2006.01) A61P 15/14 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number:

PCT/IN2012/000232

(22) International Filing Date:

30 March 2012 (30.03.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

1113/CHE/2011 1 April 2011 (01.04.2011) IN

(72) Inventor; and

(71) Applicant : AYYATHURAI, Konar, T. [IN/IN]; T. Krishnapuram, Saptur, Peraiyur, Madurai 625014, Tamil Nadu (IN).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(74) Agent: KHURANA, Tarun; Khurana & Khurana, Advocates and IP Attorneys, IFAIA Center, S/20-22, Greater Noida Shopping Plaza, Plot No. 7/2, Kasna Road, UPSIDC-Site IV Greater Noida 201308 (IN).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))



WO 2012/131732 A1

(54) Title: A SYNERGISTIC HERBAL EXTRACT COMPOSITION FOR USE IN TREATING AND PREVENTING MASTITIS

(57) Abstract: The present invention relates to a novel synergistic herbal extract composition comprising therapeutically effective amounts of extracts of leaves of *Abrus precatorius*, leaves of *Cleome gynandra*, roots of *Aristolochia indica*, leaves of *Thymus vulgaris*, and leaves of *Salvia officinalis* for use in treating and preventing Mastitis in a subject in need thereof. The present invention also relates to a process for the preparation of such composition.

A SYNERGISTIC HERBAL EXTRACT COMPOSITION FOR USE IN TREATING AND PREVENTING MASTITIS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a novel synergistic herbal extract composition comprising therapeutically effective amounts of extracts *Abrus precatorius*, *Cleome gynandra*, *Aristolochia indica*, *Thymus vulgaris*, and *Salvia officinalis* for use in treating and preventing Mastitis in a subject in need thereof. The present invention also relates to a process for the preparation of such composition.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Mastitis is an inflammation of the mammary glands of milk-producing animals, for example dairy cows and is characterized by physical, chemical and usually bacteriological changes in milk and pathological changes in glandular tissues.

Mastitis is most often caused by bacterial infection of *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and the like. Udder is a productive organ of dairy animals; hence for better production it should be healthy. Because of its anatomical position are subject to outside influences and are prone to both inflammatory and non inflammatory conditions. The inflammatory response consists of an increase in blood proteins and white blood cells in the mammary tissue and the milk. The purpose of the response is to destroy the irritant, repair the damaged-tissue and return the udder to normal function. This disease can be identified by abnormalities in the udder such as swelling, heat, redness or pain. Other

indications of mastitis may be abnormalities in milk such as a watery appearance, flakes, clots, or pus.

Mastitis occurs throughout the world wherever dairy animals are found. Mastitis causes heavy economic losses to the dairy industry worldwide. Mastitis is a global problem as it adversely affects animal health, quality of milk and economics of milk production and every country including developed ones suffer huge financial losses. Mastitis, the most important deadly disease of dairy animals is responsible for heavy economic losses due to reduced milk yield, milk discard after treatment , cost of veterinary services and premature culling. Apart from its economic importance it also carries public health significance.

The use of long-acting antibiotics is being widely used for treating mastitis in animals. However, presence of antibiotic residues in the milk and the milk products is highly desirable undesirable due to its public health concern. The antibiotic treatment may also lead drug resistance. More than 250 different microorganisms can cause mastitis. Even no single vaccine is successful to control mastitis due to its multietiological nature.

Therefore, attention is being paid to find alternative approaches. This has prompted interest in finding new, effective, safe herbal compositions comprising plant extracts to cure mastitis. The extracts of various plants that are native to the tropics and subtropics are being tested and some have demonstrated some activity against various tick species.

A number of herbs have been found to be effective in treating Mastitis. While research in the field of herbal medicines has increased, much remains to be learned about the effectiveness of such herbal remedies for Mastitis.

Accordingly, there still exists an ongoing need for developing new synergistic herbal extract combination which are safe, and effective against microbial infections yet devoid of side effects so as to rejuvenate the general health and immunity of the dairy animals. The

present invention satisfies these needs, as well as others, and generally overcomes the deficiencies found in the background art.

OBJECTS OF THE INVENTION

A main object of the present invention is to provide a novel synergistic herbal extract composition comprising therapeutically effective amounts of plant extracts of leaves of *Abrus precatorius*, leaves of *Cleome gynandra*, roots of *Aristolochia indica*, leaves of *Thymus vulgaris*, and leaves of *Salvia officinalis*.

A further object of the present invention is to provide a use of the novel herbal composition of the present invention for treating or preventing Mastitis in a subject.

A further object of the present invention is to provide a process for the preparation of novel herbal composition of the present invention.

Another object of the present invention is to provide the novel herbal composition which is safe, effective and devoid of side effects.

Another object of the present invention is to provide the novel herbal composition which is having economic significance in comparison to the commonly available allopathic and synthetic drugs.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a novel synergistic herbal extract composition for use in treating and preventing Mastitis in a subject in need thereof, comprising therapeutically effective amounts of extracts of:

- leaves of *Abrus precatorius*;
- leaves of *Cleome gynandra*;
- leaves of *Aristolochia indica*;
- leaves of *Thymus vulgaris*; and
- leaves of *Salvia officinalis*.

The present invention also relates to a process for the preparation of the synergistic herbal extract composition of the present invention.

The herbal composition of the present invention can optionally contain at least one carrier.

The present invention further relates to a use of the novel herbal composition in treating and preventing Mastitis comprising administering a therapeutically effective amount of the composition of the present invention to a subject in need thereof.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Thus, the present invention is directed to a novel synergistic herbal extract composition for use in treating and preventing Mastitis in a subject in need thereof, comprising therapeutically effective amounts of extracts of:

- leaves of *Abrus precatorius*;
- leaves of *Cleome gynandra*;
- leaves of *Aristolochia indica*;

- leaves of *Thymus vulgaris*; and
- leaves of *Salvia officinalis*.

The term "Mastitis" as used herein refers to an inflammation of the mammary glands of subject, most often caused by bacterial infection such as by *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*.

"Inflammation" is intended to mean redness, swelling and pain, manifest histologically as leukocyte pavementing in capillaries, thinning of capillary endothelial cells and possible thinned or disrupted junctional complexes between endothelial cells.

The term "subject" as used herein refers to mammals, particularly milk producing livestock, diary animals such as cow, buffalo and the like.

In an embodiment of the present invention, the composition of the present invention comprises of 10 to 15 % by weight of an extract of *Abrus precatorius*, 30 to 40 % by weight of an extract of *Cleome gynandra*, 10 to 15 % by weight of an extract of *Aristolochia indica*, 5 to 10 % by weight of an extract of *Thymus vulgaris* and 10 to 20 % by weight of an extract of *Salvia officinalis*.

Details of the herbal ingredients of the composition:

1. *Abrus precatorius*

Abrus precatorius, also known as Jequirity, Crab's Eye, Rosary Pea, John Crow Bead, is a perennial climber that twines around trees, shrubs, and hedges. It has innately compound leaves and bright red seeds. Its seeds are toxic due to the presence of abrin. The

plant is common in forest tracts of India and Burma, ascending in the outer Himalayas. The plant has been reported to be used for treating colic, skin allergy, ephemeral fever, diarrhoea, haematuria, wounds.

Botanical Classification:

- Family: Fabaceae
- Genus: Abrus
- Species: *A. Precatorius*

2. *Cleome gynandra*

Cleome gynandra belongs to the Capparaceae family and is an abundantly available species and grows as a weed in common barren land and in crop fields throughout India . It is also known as Kurhur and Karaila in India. It is also used in various traditional culinary systems for its remarkable nutritional and antioxidant properties. It has been reported to have Immunomodulator, Antioxidant, Anticarcinogenic, Analgesic properties etc.

Botanical Classification:

- Family: Cleomaceae
- Genus: Cleome
- Species: C. Gynandra

3. *Aristolochia indica*

Aristolochia indica is a creeper plant found in Kerala in India and also Sri Lanka. It is also known as Indian Birthwort, Isharmul, Anigandha. Its leaves and the roots are used for treatment of fever, and insect bites. The plant is also used as emmenagogue, abortifacient, antineoplastic, antiseptic, anti-inflammatory, antimicrobial, antipyretic, antifertility and antispermatic agent.

Botanical Classification

- Family: Aristolochiaceae

- Genus: Aristolochia
- Species: A. Indica

4. *Thymus vulgaris*

Thymus vulgaris or common thyme is a low growing herbaceous plant. It is Indigenous to Europe, but prospers almost anywhere in temperate climate. *Thymus Vulgaris* possesses antiseptic, antiviral, antifungal, antibiotic, antioxidant, antibacterial, antispasmodic and anti-inflammatory activities. Its oil or infusions are used for nervous depression, spasm, bruises and sprains, bronchitis, laryngitis, digestive complaints, asthma, and many other ailments.

Botanical Classification

- Family: Lamiaceae
- Genus: Thymus
- Species: T. vulgaris

5. *Salvia officinalis*

Salvia officinalis (commonly called as garden sage, common sage) is a perennial, evergreen subshrub and is native to the Mediterranean region, though it has naturalized in many places throughout the world. In India, it is sparingly cultivated in Jammu. Sage is used in the culinary preparation in the West. Sage is used as a mild tonic, astringent and carminative. It is diaphoretic and anti-pyretic. Sage oil is used in perfumes as a deodorant. Sage and sage oil exhibit anti-oxidant properties.

Botanical Classification

- Family: Lamiaceae
- Genus: Salvia
- Species: S. officinalis

The plant extracts used in the composition of the present invention have been used individually for health promoting and varied therapeutic purposes. However, the herbal composition of the present invention is a unique combination that has been developed to provide therapeutic benefits in the treatment and/or prevention of Mastitis in subjects.

An important aspect of the herbal composition of the present invention is that the composition comprises of a mixture of herbal extracts, which provide more benefit than a single herb. An unexpected synergistic effect is exhibited by the combination of various ingredients in the present herbal composition. Strategic combination of herbal ingredients of the present invention exhibits beneficial pharmacological effects when optimally combined. Active ingredients of the herbs are preferably combined in such a manner as to optimize and enhance the pharmacological effects with minimal or no adverse toxic reactions (which become a distinct possibility if the herbs are used singly at a concentration of 100%).

The herbal composition described herein can be used as an alternative to conventional drugs or treatments and has been found to effectively treat or prevent fever due to a wide range of medical conditions in subjects.

An embodiment of the present invention provides use of the herbal composition of the present invention for the treatment and/or prevention of Mastitis, by administrating a therapeutically effective amount of the composition to a subject in need thereof.

Active compounds responsible for specific therapeutic activity can be found in higher concentrations in specific parts of medicinal plants and in lower concentrations in other specific parts. Specific part of a medicinal plant having higher concentration is selected and processed for preparing the extracts as used in the preparation of the composition of the present invention. Preferably, extracts of *Abrus precatorius* are obtained from leaves, extracts of *Cleome gynandra* are obtained from leaves, extracts of

Aristolochia indica are obtained from roots, extracts of *Thymus vulgaris* are obtained from leaves and extracts of *Salvia officinalis* are obtained from leaves of the respective plants.

In some embodiments, the herbal composition as described herein is prepared to be administered in a variety of ways, for example orally, topically or parenterally, using means known in the art.

In an embodiment, the herbal composition of the present invention optionally contains at least one carrier selected from a group comprising of diluent, binder, disintegrant, glidant, lubricant and the like. There may be one or more carriers used in the preparation of the composition of the present invention. See, for example, Remington: The Science and Practice of Pharmacy , 1995, Gennaro ed.

The oral composition of the present invention can be selected from a group comprising of syrup, tablet, capsule, powder, beads, pellets, granules, solution, suspension, oleoresin, emulsion and the like.

The topical composition of the present invention may take the form of compositions suitable for topical application to the body surface, and may comprise, for example, a cream, lotion, solution (e.g., liquid spray), oil gel, ointment, paste, bioadhesive, liposomes, micelles, aerosol sprays and the like.

The parenteral composition of the present invention can be administered by intravenous drip or by intraperitoneal, subcutaneous or intramuscular injection.

The herbal composition of the present invention can be formulated into a particular dosage form by using any common technique available in the art.

An exemplary and generalized process for preparing the herbal composition of the present invention is described below in a stepwise manner:

- a. Drying respective plant parts to remove excess moisture;
- b. Powdering and sieving respective plant parts through mesh to obtain fine powder;
- c. Adding a suitable solvent to the fine powder of step (b) to obtain a solution;
- d. Allowing the solution to stand followed by continuous stirring;
- e. Optionally repeating step (d) more than once;
- f. Filtering the solution obtained from step (e) to obtain the extract;
- g. Evaporating excess solvent and lyophilizing to obtain fine powder.

In a preferred embodiment, the solution is allowed to stand for 2 to 3 hours in step (d) and continuously stirred for 30 minutes.

In one embodiment, the step (d) is repeated 4-5 times.

In a further embodiment, the powder as obtained from step (g) can either be directly administered to a subject or can be formulated into a particular dosage form using suitable carriers by using any common technique available in the art.

ADVANTAGES OF THE INVENTION

1. The present invention provides a novel synergistic Anti-inflammatory herbal extract composition comprising therapeutically effective amounts of plant extracts of leaves of *Abrus precatorius*, leaves of *Cleome gynandra*, roots of *Aristolochia indica*, leaves of *Thymus vulgaris*, and leaves of *Salvia officinalis*.
2. *The present invention provide* use of the novel herbal composition of the present invention for treating or preventing Mastitis in a subject in need thereof.
3. The present invention provides a process for the preparation of novel herbal composition of the present invention.
4. The present invention provides the novel herbal composition which is safe, effective and devoid of side effects.
5. The present invention provides the novel herbal composition which is having economic significance in comparison to the commonly available allopathic and synthetic drugs.

EXAMPLES

The present invention is further explained in the form of following examples. However it is to be understood that the foregoing examples are merely illustrative and are not to be taken as limitations upon the scope of the invention. Various changes and modifications to the disclosed embodiments will be apparent to those skilled in the art. Such changes and modifications may be made without departing from the scope of the invention.

Example 1:

Formulation 1

S.No.	Ingredient	Amount (g)
1.	Leaves of <i>Abrus precatorius</i>	15
2.	Leaves of <i>Cleome gynandra</i>	40
3.	Leaves of <i>Aristolochia indica</i>	15
4.	Leaves of <i>Thymus vulgaris</i>	10
5.	Leaves of <i>Salvia officinalis</i>	20

Example 2:

The composition of the present invention in the ointment form was administered intramammary to the animal affected with mastitis. The teat orifice was cleaned and milk culture sensitivity was conducted to confirm for bacterial mastitis. The composition was administered at a dose rate of 5 ml per quarter per day with a concentration of 600 mg per ml. The animal was found recovered next day and total recovery was observed from 3rd day onwards.

Example 3:**Ointment preparation**

Ingredients	Quantity (%)
Carbowax	20
Steryl alcohol	34
Glycerine	30
SLS	1
Water (Herbal extract)	10

Procedure

Solid ingredients were triturated in a mortar until they were very fine. Then, in a mortar or on an ointment slab, a paste of the powder with an equal amount of base was made. This is called levigation. The paste was thoroughly mixed with another volume of base equal to that of the paste. This routine of mixing equal amounts of paste and base was continued until the entire base had been added and we had a uniform preparation with a very small particle size. A mortar and pestle can be used for incorporating liquids into a base or for preparing larger quantities of an ointment.

CLAIMS

1. An Anti-inflammatory herbal composition comprising therapeutically effective amounts of plant extracts of *Abrus precatorius*, *Cleome gynandra*, *Aristolochia indica*, *Thymus vulgaris* and *Salvia officinalis*.

2. The composition of claim 1, wherein said composition comprises of 10 to 15 % by weight of an extract of *Abrus precatorius*, 30 to 40 % by weight of an extract of *Cleome gynandra*, 10 to 15 % by weight of an extract of *Aristolochia indica*, 5 to 10 % by weight of an extract of *Thymus vulgaris* and 10 to 20 % by weight of an extract of *Salvia officinalis*.

3. The composition of claim 1, wherein,
said extract of *Abrus precatorius* is prepared from leaves of *Abrus precatorius*;
said extract of *Cleome gynandra* is prepared from leaves of *Cleome gynandra*;
said extract of *Aristolochia indica* is prepared from roots of *Aristolochia indica*;
said extract of *Thymus vulgaris* is prepared from leaves of *Thymus vulgaris*; and
said extract of *Salvia officinalis* is prepared from leaves of *Salvia officinalis*.

4. The composition of claim 1, wherein said composition further comprises of at least one carrier.

5. The composition of claim 1, wherein said composition is an ointment.

6. The composition of claim 5, wherein the ointment comprises of the group comprising of Carbowax, Steryl alcohol, Glycerine and SLS.
7. Use of the composition of claim 1, wherein said composition is used for treating and/or preventing Mastitis comprising administering a therapeutically effective amount of said composition to a subject in need thereof.
8. The composition of claim 1, wherein said composition is administered orally, topically or parenterally.
9. A method for preparation of an Anti-fever herbal composition, comprising the steps of:
 - a. Drying respective plant parts to remove excess moisture;
 - b. Powdering and sieving respective plant parts through mesh to obtain fine powder;
 - c. Adding a suitable solvent to the fine powder of step (b) to obtain a solution;
 - d. Allowing the solution to stand followed by continuous stirring;
 - e. Optionally repeating step (d) more than once;
 - f. Filtering the solution obtained from step (e) to obtain the extract;
 - g. Evaporating excess solvent and lyophilizing to obtain fine powder.
10. The method of claim 9, wherein the powder as obtained from the step (c) is either directly administered to a subject or is formulated into a particular dosage form using suitable carriers by using a common technique available in the art.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IN2012/000232

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
INV. A61K36/185 A61K36/537 A61K36/48 A61K36/53 A61K36/264 A61P15/14 A61P31/04 A61P29/00				
ADD.				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)				
A61K A61P				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)				
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.
X	<p>GANESAN* S ET AL: "Ethnoveterinary healthcare practices in southern districts of Tamil Nadu", INDIAN JOURNAL OF TRADITIONAL KNOWLEDGE, RESOURCES, NEW DELHI, NEW DELHI - INDIA, vol. 7, no. 2, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 347-354, XP018024000, ISSN: 0972-5938 page 352</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>			1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>				
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report		
27 June 2012		09/07/2012		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vandenbogaerde, Ann		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IN2012/000232

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCPHEE C S ET AL: "Milk and plasma disposition of thymol following intramammary administration of a phytoceutical mastitis treatment.", JOURNAL OF DAIRY SCIENCE APR 2011 LNKD-PUBMED:21426962, vol. 94, no. 4, 21 March 2011 (2011-03-21), pages 1738-1743, XP002678727, ISSN: 1525-3198 abstract; table 1 -----	1-10
X	DAL POZZO MARCELO ET AL: "Antimicrobial activities of essential oils extracted from spices against Staphylococcus spp isolated from goat mastitis", CIENCIA RURAL, vol. 41, no. 4, 9 March 2011 (2011-03-09), pages 667-672, XP002678728, ISSN: 0103-8478 abstract	1-10
X	WO 96/37210 A2 (ROPAPHARM B V I O [NL]; NINKOV DUSAN [NL]) 28 November 1996 (1996-11-28) abstract; claims -----	1-10
X	KB SATAPATHY: "Ethnoveterinary practices in Jajpur district of Orissa", INDIAN JOURNAL OF TRADITIONAL KNOWLEDGE, RESOURCES, NEW DELHI, NEW DELHI - INDIA, vol. 9, no. 2, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 338-343, XP018029304, ISSN: 0972-5938 page 340 -----	9,10
A		1-8

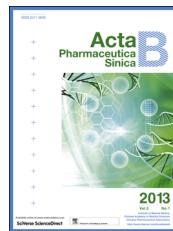
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IN2012/000232

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 9637210	A2	28-11-1996	AT AU AU BG BG BR CA CN DE DE DK EP ES HU JP JP NZ PL RU TR US WO	210451 T 708703 B2 5846096 A 62757 B1 102142 A 9608841 A 2222563 A1 1190892 A 69617945 D1 69617945 T2 828502 T3 0828502 A2 2167575 T3 9900312 A2 3080654 B2 H11505832 A 308661 A 323526 A1 2157697 C2 9701441 T1 6322825 B1 9637210 A2	15-12-2001 12-08-1999 11-12-1996 31-07-2000 29-05-1998 07-12-1999 28-11-1996 19-08-1998 24-01-2002 20-06-2002 15-04-2002 18-03-1998 16-05-2002 28-07-1999 28-08-2000 25-05-1999 29-07-1999 30-03-1998 20-10-2000 21-02-1998 27-11-2001 28-11-1996



ORIGINAL ARTICLE

An ethnopharmacological investigation of medicinal *Salvia* plants (Lamiaceae) in China

Minhui Li^{a,b}, Qianquan Li^{a,b}, Chunhong Zhang^b, Na Zhang^b, Zhanhu Cui^{a,b},
Luqi Huang^{a,*}, Peigen Xiao^{c,d,*}

^aNational Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

^bBaotou Medical College, Baotou 014060, China

^cSchool of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

^dInstitute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Received 15 March 2013; revised 22 April 2013; accepted 28 May 2013

KEY WORDS

Salvia;
Ethnopharmacology;
Medicinal plants;
Danshen

Abstract In China, over 40 species of the genus *Salvia* have been used as medicinal plants for various diseases, some for thousands of years. Recently, research has focused on the biological activities of *Salvia* medicinal plants used in traditional Chinese medicine (TCM). However, to date a scientific survey of the genus *Salvia* in China has not been carried out. In this paper, we report the results of 10 field surveys of *Salvia* medicinal plants collected in 17 provinces including detailed information on their local names, growing environment, distribution and therapeutic effects. We also summarize the results of research on the materia medica, phytochemistry and pharmacology of some of the important *Salvia* medicinal plants. Our study reveals that 35 *Salvia* plants have been used in TCM in different regions of China, including 20 species used as Danshen to treat heart diseases, and 15 species used to treat a range of other conditions including gynecological diseases, muscular or skeletal problems, hepatitis, urological diseases, and mouth and eye conditions. It is clear that some species of *Salvia* L. possess significant pharmacological activity in the context of ethnopharmacological knowledge, especially in the treatment of heart disease. Further studies of the phytochemistry and pharmacology of *Salvia* species will no doubt improve their medical utilization and contribute to the development of new natural drugs.

© 2013 Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Chinese Pharmaceutical Association. Production and hosting by Elsevier B.V. All rights reserved.

*Corresponding authors. Tel.: +86 10 84044340 (Luqi Huang); +86 10 57833152 (Peigen Xiao).

E-mail addresses: huangluqi@263.net (Luqi Huang); xiaopg@public.bta.net.cn (Peigen Xiao).

Peer review under responsibility of Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Chinese Pharmaceutical Association.



Production and hosting by Elsevier

1. Introduction

Salvia L. species constitute the largest genus in the family Lamiaceae with over 1000 species distributed mainly in Central and South America (500 spp.), Central Asia/Mediterranean (250 spp.) and Eastern Asia (100 spp.). Most species are perennial herbs but annuals, shrubs and a few trees and vines also exist¹. 84 *Salvia* species are native to China with their distribution located in South-West China, notably in the Hengduan Mountain region².

Salvia species have been used in herbal medicine for thousands of years. In fact, the name *Salvia* comes from the Latin word “*salvare*” meaning “to heal” and *S. officinalis* (Sage) has long been an important herb in Europe. *Salvia* species have been used in the treatment of more than sixty different ailments ranging from aches and pains to epilepsy although their main application has been in treating colds, bronchitis, tuberculosis, hemorrhage and menstrual disorders³. Until the discovery of antibiotics, Sage was a frequent ingredient of herbal teas recommended to patients with tuberculosis to prevent sudation. The leaves of Sage exhibit a range of biological activities based on their astringency and antibacterial, micostatic, virustatic and antihidrotic properties and are included in the British Herbal Pharmacopoeia (1983) for use as a gargle or mouthwash. Sage has also been included in combined herbal preparations for treating acute and chronic bronchitis⁴.

In China, over 40 species of *Salvia* have been used as medicinal plants for various diseases, some for thousands of years. One of the most well-known herbs is the roots of *S. miltiorrhiza* Bunge (Red Sage, called Danshen in Chinese) which is endemic to Eastern Asia, and is included as an official drug in the Chinese Pharmacopeia (2010). Traditionally Danshen has been used to promote blood circulation, remove stagnation, tranquilize the mind, clear heat from the blood and resolve swelling⁵. In more recent times, the most important and frequent clinical use of Danshen has been in the treatment of coronary heart disease for the alleviation of angina pectoris, coronary artery spasm and myocardial infarction^{6,7}. Although there is increasing interest in the biological activity of *Salvia* species^{8,9}, to date a scientific survey of the genus *Salvia* in China has not been reported. Given that the indigenous uses of many *Salvia* medicinal plants remain undocumented, we undertook the survey to collect information relating to the resource and use of *Salvia* plants in Traditional Chinese Medicine (TCM) in order to provide baseline data for future pharmacological and phytochemical studies.

2. Materials and methods

During the period 2006–2011, we conducted 10 field surveys in 17 provinces and regions of China (Beijing, Hebei, Henan, Shandong, Anhui, Jiangsu, Zhejiang, Hubei, Hunan, Jiangxi, Fujian, Shanxi, Gansu, Chongqing, Sichuan, Guangxi and Yunnan provinces) based on analysis of ancient medicinal works and local knowledge of herbal medicines that include *Salvia* species. With the assistance of local herbalists, we collected plant samples and recorded detailed information on their local names, growing environment, distribution and therapeutic effects (Table 1). Voucher specimens of each plant species were identified by professional experts and their scientific names confirmed by consulting the *Flora of China*². The specimens were pressed and deposited at the Pharmaphylogeny Laboratory of the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese academy of Medical Sciences, and the Molecular Pharmacognosy Laboratory of the Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine.

3. Results and discussion

In the *Flora of China*, Chinese *Salvia* species are classified into four subgenera namely *Salvia*, *Sclarea*, *Jungia* and *Allagospadonopsis*¹⁰. Table 1 lists the species identified in this study arranged according to this classification system together with their local names, collection location, growing environment and therapeutic use.

3.1. Ethnopharmacological investigation

According to our field survey, 35 *Salvia* plants have been used as folk medicine in multiple therapeutic remedies in different regions of China. All four subgenera are represented with *Sclarea* (15) being the dominant subgenus, followed by *Salvia* (12), *Allagospadonopsis* (6) and *Jungia* (2).

Of the 35 *Salvia* species identified, 20 are used as Danshen to treat heart disease, 7 are used to treat respiratory diseases (cough, pneumonia and tracheitis), 8 for gynecological diseases (mastitis, dysmenorrheal and irregular menstruation), 2 for muscular or skeletal problems (muscular twitching pain and rheumatic arthritis), 3 for hepatitis, 2 for urological diseases (nephritis and urethritis), 2 for mouth and eye conditions (keratitis, fauces and toothache), and 5 for other conditions (snakebite, sexual dysfunction, fever, hypertension and pyogenic infection of the skin) (Fig. 1A).

Parts of *Salvia* species used in the preparation of herbal remedies were the roots (20 species), herbs (14 species), leaves (2 species), flowers (2 species), seeds (1 species) and fruits (1 species) (Fig. 1B). It is well known that different parts of plants contain different concentrations of active constituents and different phytochemicals¹¹. For example, flavonoids, triterpenoids and monoterpenes are found in the aerial parts of *Salvia* plants particularly the flowers and leaves, whereas diterpenoids and phenolic acids are mainly found in the roots³. In our survey, it emerged that, generally, only one part of a medicinal plant is used in the preparation of a particular herbal remedy. For example, the herbs of *S. roborowskii* are used to treat hepatitis, while its flowers are employed to treat toothache. Sometimes *Salvia* plants have been used as the sole ingredient in a herbal medicine but often they are used in combination with more than one medicinal plant. For example, the leaves of *S. officinalis* are used in a tea to prevent and treat hypertension whereas the roots of *S. miltiorrhiza* and its related species are used in combination with other herbal medicines (Rhizoma ligustici wallichii, Radix astragalus, Radix notoginseng) for the management of heart disease.

Decoctions or infusions are most commonly used for oral administration and only one species, *S. cavaleriei*, has been prepared for external use involving topical application of its crushed leaves to the site of pyogenic infection.

3.2. Details of some widely used Chinese *Salvia* species

According to our field survey, ethnopharmacological knowledge of Chinese *Salvia* species is indicative of their pharmacological activity especially in the treatment of heart disease and cancer. Based on the limited research into their phytochemistry and pharmacology, only those *Salvia* species of significant medicinal value are described below.

3.2.1. *S. miltiorrhiza* and related species

S. miltiorrhiza is designated as the official source of Danshen in the Chinese Pharmacopeia (2010). The earliest record of Danshen

Table 1 Names, distribution and therapeutic use of *Salvia* medicinal plants in China.

Original plant (voucher number)	Local name	Collecting location and time	Growing environment	Used part and therapeutic effects
Subg. <i>Salvia</i> Benth.				
Sect. <i>Euryphace</i> Stib.				
<i>S. bulleyana</i> Diels HLQ-SBU-1101-1	Zi Danshen	Dali, Yunnan Aug 2011	Hillsides, valleys (Alt. 2500–3100 m)	The roots were used as Danshen.
<i>S. brachyloma</i> Stib HLQ-SBR-1001-8	Duan Guan Danshen	Muli, Sichuan Aug 2010	Hillsides, valleys (Alt. 3000–3300 m)	1. The roots were used as Danshen. 2. The flowers could be used to treat cough.
<i>S. campanulata</i> Wall. 2006070808	Huang Hua Danshen	Deqin, Yunnan Jul 2006	Forests, hillsides, grasslands (Alt. 2800–3500 m)	The roots were used as Danshen
<i>S. castanea</i> Diels 2006070803	Rong Mao Danshen	Muli, Sichuan Jul 2006	Forests, hillsides, grasslands (Alt. 2500–3200 m)	The roots were used as Danshen.
<i>S. digitaloides</i> Diels HLQ-SDI-1001-1	Yin Zi Danshen, Bai Yuan Shen	Lijiang, Yunnan Aug 2010	Dry shady pine forests, grassy hillsides, valleys (Alt. 2200–2800 m)	The roots were used as Danshen.
<i>S. evansiana</i> Hand.-Mazz. 2006090805	Danshen	Xianggelila, Yunnan Sep 2006	Alpine meadows, hillsides, forests (Alt. 3400–4150 m)	The roots were used as Danshen.
<i>S. flava</i> Forrest. HLQ-SFL-1001-8	Huang Hua Danshen	Lijiang, Yunnan Jul 2010	Forests, hillsides, grasslands (Alt. 2300–3500 m)	The roots were used as Danshen.
<i>S. kiaometiensis</i> Lévl. HLQ-SQM-1001-7	Shan Bian, Danshen	Zhaotong, Yunnan Jul 2010	Hillsides (Alt. 2200–2800 m)	The roots were used as Danshen.
<i>S. przewalskii</i> Maxim. HLQ-SPZ-1101-8	Zi Danshen, Hong Qinjiao	Xianggelila, Yunnan Jul 2011	Forest margins, hillsides, banks of streams, thickets (Alt. 2000–3500 m)	1. The roots were used as Danshen. 2. The roots were used as Qinjiao which has the effects of expelling wind, dredging, removing the heat from the blood and relieving swelling.
<i>S. roborowskii</i> Maxim. HLQ-SRO-1001-5	Ye Zhi Ma	Kangding, Yunnan Jul 2010	Hillsides (Alt. 2600–3500 m)	1. The flowers could be used to treat toothache. 2. The herbs could be used to treat hepatitis. 3. The fruits could be used to treat keratitis.
<i>S. umbratica</i> Hance HLQ-SUM-1001-7	Shan Su Zi	Ningqiang, Shanxi Aug 2010	Hillsides, banks of streams, forests, valleys (Alt. 600–1500 m)	The herbs and seeds could be used to treat irregular menstruation.
Sect. <i>Eusphace</i> Benth.				
<i>S. officinalis</i> L. HLQ-SOF-1001-4	Sai Er Wei Ya	Beijing Aug 2010	Cultivated in gardens	The leaves could be used to treat fauritis and hypertension.
Subg. <i>Scclare</i> (Moench) Benth.				
Sect. <i>Drymosphace</i> Benth.				
<i>S. bowleyana</i> Dunn 2007081601	Danshen, Zi Gen	Jinhua, Zhejiang Aug 2007	Hillsides, banks of streams, valleys (Alt. 300–800 m)	The roots were used as Danshen.
<i>S. cavaleriei</i> Lévl HLQ-SCA-1001-2	Xue Pen Cao	Emeishan, Sichuan Jul 2011	Hillsides, banks of streams, forests, valleys (Alt. 300–1500 m)	1. The herbs were used to treat irregular menstruation. 2. The leaves could be used to treat pyogenic infection of the skin.
<i>S. dabieshanensis</i> J.Q.He 2007062004	Danshen, Hong Gen	Shucheng, Anhui Jun 2007	Hillsides, margins of thicket (Alt. 600–1000 m)	The roots were used as Danshen.
<i>S. honanica</i> L.H.Bailey 2007061503	Danshen	Xinyang, Henan Jun 2007	Hillsides (Alt. 600–900 m)	The roots were used as Danshen.
<i>S. meiliensis</i> S.W.Su 2007062101	Hong Gen, Danshen	Liu'an, Anhui Jun 2007	Hillsides, roadsides (Alt. 800–1100 m)	The roots were used as Danshen.

Table 1 (continued)

Original plant (voucher number)	Local name	Collecting location and time	Growing environment	Used part and therapeutic effects
<i>S. miltiorrhiza</i> Bunge HLQ-SMI-1101-05	Hong Gen, Danshen,	Jiangxian, Shanxi Jun 2011	Hillsides, banks of streams, plains, forests (Alt. 0–1100 m)	The roots were used as Danshen.
<i>S. paramiltiorrhiza</i> H.W. Li et X.L.Huang HLQ-SPA-1001-01	Danshen, Hong Gen	Qingtian, Anhui Jun 2010	Hillsides, banks of streams (Alt. 350–900 m)	The roots were used as Danshen.
<i>S. pectranthoides</i> Griff. HLQ-SPL-1001 -07	Hongshen, Jin Zhi Danshen	Wudu, Gansu Jun 2010	Hillsides, banks of streams, valleys, sparse forests (Alt. 800–2200 m)	1. The roots were used as Danshen. 2. The roots were used for treatment of arthralgia due to dampness, muscular twitching pain and hemiplegia. 3. The roots were used to treat cough.
<i>S. prionitis</i> Hance HLQ-SPR-100001-07	Hong Gen Cao	Jinhua, Zhejiang Sept 2010	Hillsides, banks of streams (Alt. 150–800 m)	The herbs were used to treat cough, antiaditis tracheitis, diarrhea, hepatitis and cancer.
<i>S. sinica</i> Migo 2006070401	Danshen	Jinzhai, Anhui Jul 2006	Hillsides, banks of streams (Alt. 350–800 m)	The roots were used as Danshen.
<i>S. trijuga</i> Diels. HLQ-STR-1001-03	Xiao Hongshen, Zi Danshen	Lijiang, Yunnan Aug 2010	Foothills, riverbanks, banks of streams, grasslands (Alt. 2100–3500 m)	1. The roots were used as Danshen. 2. The roots could be used to treat deficiency in kidney and deficiency of yang.
<i>S. vasta</i> H.W. Li 2007062103 <i>S. yunnensis</i> C.H.Wright. 2006092002	Danshen Dian Danshen, Yunnan Danshen	Enshi, Hubei Jun 2007 Kunming, Yunnan Sep 2006	Hillsides (Alt. 800–1000 m) Grassy hillsides, dry thin forests (Alt. 2000–3300 m)	The roots were used as Danshen. 1. The roots were used as Danshen. 2. The roots could treat mastitis.
Sect. Plethiosphace Benth.				
<i>S. deserta</i> Schang HLQ-SDE-1001-3	Xinjiang Shu Wei Cao	Buerjin, Xinjiang Aug 2010	Foothills, hillsides, grasslands (Alt. 300–1500 m)	The herbs were used to treat cough and urethritis.
Sect. Notiosphace Benth.				
<i>S. plebeia</i> R.Br. HLQ-SLZ-1001-1	Li Zhi Cao	Jinhua, Zhejiang Sep 2010	Foothills, hillsides, riverbanks, grasslands (Alt. 100–2500 m)	The herbs were used to treat faucitis, bronchitis, nephritis and urethritis.
Subg. <i>Jungia</i> (Moench) Briq.				
Sect. Calosphace Benth.				
<i>S. splendens</i> Ker-Gawl. 2006081702	Yi Chuan Hong	Beijing Aug 2006	Cultivated in gardens	The herbs were used to treat fever.
<i>S. coccinea</i> Linn HLQ-SZC-1001-2	Zhu Chun	Beijing; Aug 2011	Cultivated in gardens	The herbs were used to treat snakebite.
Subg. <i>Allagospadonopsis</i> Briq.				
<i>S. chinensis</i> Benth. HLQ-SXC-1002-10	Shi Jian Chuan	Chuzhou, Anhui Aug 2010	Foothills, hillsides, riverbanks, grasslands (Alt. 100–500 m)	The herbs were used to treat hepatitis, dysmenorrhea and acute mastitis.
<i>S. japonica</i> Thunb. 2007070802	Ba Wang Bian, Qiu Danshen	Badong, Hunan Aug 2007	Foothills, riverbanks, banks of streams, grasslands (Alt. 400–1000 m)	The herbs were used to clear heat from blood, treat hepatitis, dysmenorrhea, acute mastitis and irregular menstruation.
<i>S. kiangsiensis</i> C.Y.Wu HLQ-SKI-1001-08	Guan Gong Xu, Gen Xia Hong	Nanfeng, Jiangxi Aug 2011	Forests; (Alt. 600–800 m)	The herbs were used to clear heat from blood, treat acute mastitis and irregular menstruation.
<i>S. liguliloba</i> Sun HLQ-SSB-1001-03	Chang Ye, Danshen	LinAn, Zhejiang Aug 2010	Foothills, riverbanks, banks of streams, grasslands; (Alt. 600–800 m)	The herbs were used to clear heat from blood, treat rheumatoid arthritis and irregular menstruation.
<i>S. substolonifera</i> Stib. HLQ-SSU-1001-5	Fo Guang Cao	LinAn, Zhejiang Aug 2010	Foothills, banks of streams, grasslands; (Alt. 300–800 m)	The herbs were used to clear heat from blood and treat cough and pneumonia.
<i>S. scapiformis</i> Hance HLQ-SDG-1001-8	Po Luo Zi, Bai Bu Yao	Leshan, Sichuan Aug 2010	Foothills, banks of streams, grasslands; (Alt. 900–1100 m)	The herbs were used to clear heat from blood, treat cough and pneumonia.

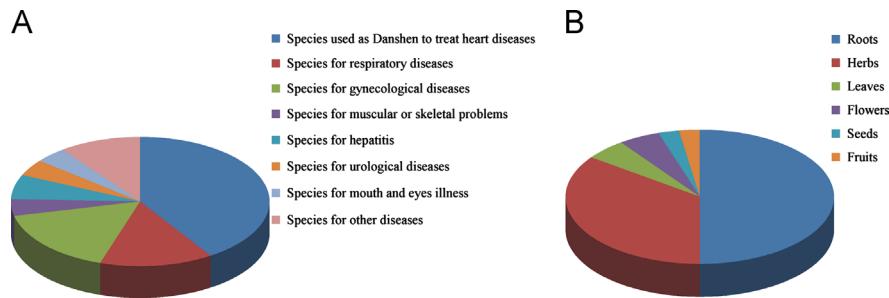


Figure 1 (A) The proportion of *Salvia* plants used to treat different diseases and (B) the proportion of the parts of *Salvia* plants used in their preparation.

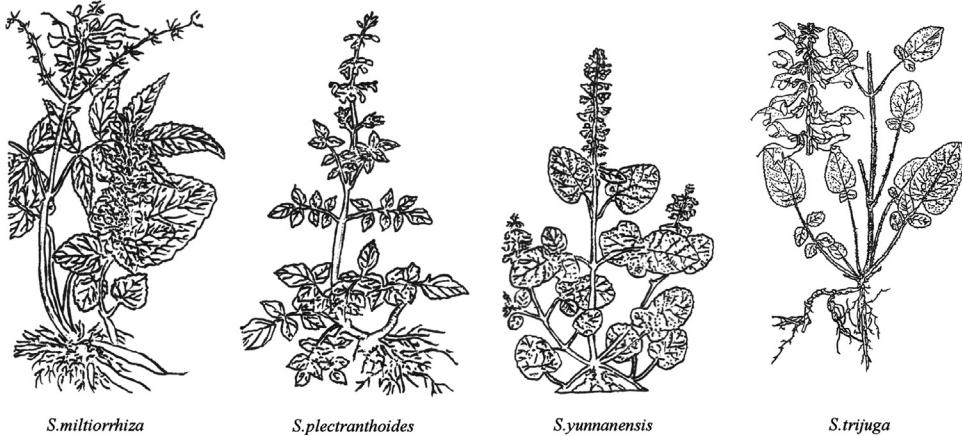


Figure 2 Images of some species of *Salvia* recorded in the *Yunnan Materia Medica*¹² and *An Illustrated Book of Plants*¹³.

appears to be from the Eastern Han Dynasty (*Shen Nong Materia Medica*, A.D. 102–200). Later, it was recorded in many other well-known medicinal texts, e.g., *Tang Materia Medica* (Tang Dynasty, A.D. 657–659), *Classic Classified Materia Medica for Emergencies* (Song Dynasty, A.D. 1082), *Compendium of Materia Medica* (Ming Dynasty, A.D. 1590) and *Illustrated Book of Plants* (Qing Dynasty, A.D. 1848), etc. In the ancient texts, the curative properties of Danshen were to promote blood circulation, remove stagnation, tranquilize the mind, clear heat from the blood and resolve swelling. In terms of morphology, the original species were described as roots red or purple and leaves comprising 5 or 7 leaflets opposed with the spica made up of purple flowers. In many ancient texts^{12,13}, the morphological characteristics were appropriate for many *Salvia* plant such as *S. plectranthoides*, *S. yunnanensis* and *S. trijuga* (Fig. 2).

According to the results of our ethnopharmacological investigation, about 20 species of *Salvia* L. have been used as Danshen for the treatment of coronary heart disease and stroke. Based on their morphological characteristics and geographical distribution, these Danshen related species are divided into 2 groups. Group 1 comprises 11 species *S. bulleyana*, *S. brachyloma*, *S. campanulata*, *S. castanea*, *S. digitaloides*, *S. evansiana*, *S. flava*, *S. kiaometiensis*, *S. przewalskii*, *S. trijuga* and *S. yunnanensis*; Group 2 comprises 9 species namely *S. bowleyana*, *S. dabieshanensis*, *S. honanica*, *S. meiliensis*, *S. miltiorrhiza*, *S. paramiltiorrhiza*, *S. plectranthoides*, *S. sinica* and *S. vasta*.

Most Danshen related species (except *S. trijuga* and *S. yunnanensis*) in Group 1 come from sect. *Eurydice*, and are mainly distributed in the plateau area at 2500–4000 m above sea level in Sichuan and Yunnan provinces of South-West China.

S. przewalskii in this group has been widely used and is commercially available in the local herbal markets of Sichuan, Yunnan and Gansu provinces. The geographical distribution and resources of other Danshen related species in Group 1 are limited and their applications in folk medicine are restricted to remote mountain areas and minority regions of Sichuan and Yunnan provinces. In addition, some Danshen related species have been applied for other therapeutic effects in different regions. For example, the roots of *S. przewalskii* have been employed to treat rheumatism in the West of Sichuan province and the roots of *S. trijuga* have been used as a tonic in the West of Yunnan province.

All Danshen related species in Group 2 are from sect. *Drymophace*, and are distributed at low altitudes in plains and hills of North, East and Central China. *S. miltiorrhiza* is widely used in most regions of China, including some minority regions such as Inner Mongolia, and is cultivated on a large scale in Hebei, Henan, Shanxi, Shandong and Sichuan provinces. However, it is not easy to distinguish from some morphologically allied species. The farmers and villagers in rural communities generally seek to collect roots which have the red bark of *Salvia* species and use them as Danshen. As a result, in some herb markets, Danshen may come from the roots of species other than *S. miltiorrhiza*, especially in regions where several morphologically allied species are present. For example, the roots of *S. bowleyana*, known as Nandanshen, are available for purchase and use as Danshen in remote mountain areas of Zhejiang, Jiangxi and Fujian provinces and the roots of *S. dabieshanensis* and *S. paramiltiorrhiza* are used as Danshen in Dabie mountain areas of Anhui and Hubei provinces. In our previous studies, the amounts of salvianolic acid B or tanshinone IIA in some species of *Salvia* met the

requirements of the Chinese Pharmacopoeia¹⁴ but further pharmacological and phytochemical studies in relation to the application of these Danshen related species are needed.

To date, only a few Danshen related species such as *S. miltiorrhiza* have been studied extensively. Over 50 chemical constituents have been isolated and identified in *S. miltiorrhiza*, all of which can be classified as either hydrophilic phenolic acids such as salvianolic acid B and lithospermic acid or lipophilic tanshinones such as tanshinones I, IIA, and IIB and cryptotanshinone^{15–17}. Based on modern studies, the most important and frequent clinical application of the roots of *S. miltiorrhiza* has been in the treatment of heart conditions including angina pectoris, coronary artery spasm and myocardial infarction^{6,7,18}. However, they have also been used for treating neuroasthenic insomnia, hypertension dysmenorrhea, bone loss and chronic renal failure^{17,19–22}. Interestingly, the root of *S. miltiorrhiza* has been shown to reduce voluntary alcohol intake in selectively bred Sardinian alcohol-preferring rats, a finding that suggests it may have potential in treating alcoholism¹⁸. The aqueous extract has also been shown to inhibit HIV-1 integrase activity *in vitro* and viral replication *in vivo*. Since salvianolic acid B and lithospermic acid are the major biologically active constituents, the activity against HIV virus may indicate their potential as novel therapeutic drugs for AIDS²².

Another extensively studied *Salvia* species is *S. yunnanensis*. From which some 40 compounds have been isolated and identified. These include abietane diterpenes (yunnanin A, danshenol C), phenolic acids (yunnaneic acids E–H) and alkaloids (salviamines A–F)^{23–27}. Based on recent pharmacological studies, the roots of *S. yunnanensis* were shown to prevent scar-derived fibroblast formation²⁸ and the polyphenols and their derivatives to have potent anti-HIV activity^{29,30}. In addition, the roots of *S. yunnanensis* were reported to be useful in treating hepatocarcinogenesis³¹.

3.2.2. *S. plebeia*

S. plebeia (Lizhicao in Chinese) is another valuable medicinal plant widely distributed in Iran and throughout South East Asia as far as Eastern Australia. The earliest record of *S. plebeia* was in the *Compendium of Materia Medica* (Ming Dynasty, A.D. 1590) to treat snake bite and trauma. In the supplement to the later compendium (Qing Dynasty, A.D. 1765) the plant was said “to clear heat and toxic materials, and to remove heat from blood and diuresis”. Results of our ethnopharmacological studies indicate that *S. plebeia* has been used to treat bleeding, perineum edema resulting from hemorrhoids, swollen sore throat, bronchitis, hepatitis, cancer, nephritis and mastitis. In recent decades, about 40 chemical constituents have been isolated from this species including flavonoids, phenolic acids, diterpenes, triterpenes and others. Individual compounds in these classes include: Flavonoids nepitrin³², 2'-hydroxyl-5'-methoxybiochanin A³³, 5-hydroxy-4',7-dimethoxy-isoflavone³⁴, pectolinarigenin³⁵, luteolin-7-O-β-D-glucoside³⁶, 6-methoxynaringenin-7-O-β-D-glucoside³⁷ and luteolin³⁸; phenolic acids caffeic acid³², caffeic acid methyl ester³⁵, rosmarinic acid methyl ester³⁶ and 3,4-dihydroxybenzoic acid³⁹; diterpenes epoxysalviacoccin, salviacoccon⁴⁰, royleanic acid⁴¹, carnosol and epirosmanol³⁵; triterpenes ursolic acid³⁵, 2α,3β,24-trihydroxy and 2α,3β-dihydroxyolea-12-en-28-oic acid and oleanic acid³⁹; and other compounds conferyl aldehyde, β-sitosterol³³, scopoletin, salviaplebeiaside³⁵, β-daucosterol³⁹ and two lignin diesters^{42,43}.

Recent pharmacological studies of *S. plebeia* reveal it displays a variety of biological activities consistent with its extensive use in

TCM. First, the aqueous and ethanol extracts inhibit the growth of human gastric carcinoma cell lines, suggesting it acts as a potent immunomodulator⁴⁴. Second, the extract of *S. plebeia* possesses antiangiogenic, antinociceptive, antiinflammatory, antifungal and antioxidant activities^{33,45,46}. Third, the homoplantaginin isolated from *S. plebeia* was reported to be protective against hepatocyte injury⁴⁷. Finally, in combination with other herbal ingredients [the seeds of *Plantago asiatica* L., the roots of *Serissa serissoides* (DC.) Druce and the herbs of *Viola philipica* Cav. Lcons et Descr.], this species has been used to treat urinary tract infections and exhibit significant diuretic, antiblastic, antipyretic, antiinflammatory and antidiarrheal activities⁴⁸.

3.2.3. *S. prionitis*

Another *Salvia* species valued in folk medicine for its therapeutic activity is *S. prionitis* (Honggencao in Chinese), the aerial parts of which have been used to treat cold, cancer, pneumonia, hepatitis and diarrhea. Previous phytochemical investigations revealed the presence of more than 50 secondary metabolites among which abietane diterpenes are the overwhelming majority. These include tanshinone IIA, cryptotanshinone⁴⁹, salvilenone⁵⁰, 3-ketosapriparaquinone⁵¹, 4-hydroxysaporthoquinone^{52,53}, apriparaquinone⁵⁴, de-O-ethylsalvonitin⁵⁵, prioketolactone⁵⁶, 2-isopropyl-8-methyl-3,4-phenanthraquinone⁵⁷, hongencaitone⁵⁸, 3-keto-4-hydroxysaporthoquinone⁵⁹, danshenxinkun C⁶⁰, prionoid F⁶¹, bisprioterone C⁶² and dihydrotanshinone I⁶³. It was reported that some abietane diterpenes in this plant showed significant antitumor activity both *in vitro* and *in vivo*. For example, saporthoquinone showed cytotoxicity against P-388 and L-1210 cultured cells and a therapeutic effect against various ascites tumors in mice^{49,64}; 3-keto-4-hydroxysaporthoquinone exhibited cytotoxic activities against HL-60 human leukemia cells and the SGC-7901 and MKN-28 stomach cancer cell lines with IC₅₀ values of 4.6, 0.2 and 0.3 μM, respectively⁵⁹, prionoid D and E also showed significant cytotoxic activity against P-388 and A-549 cell lines with IC₅₀ values of 0.41 and 0.72 μM, respectively⁶¹. In addition, some diterpenes from *S. prionitis* showed antimicrobial activities including 7,8-seco-*para*-ferruginone against Gram-positive *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus* (MIC values of 20.0 and 15.0 μM)⁵⁹. However, a full understanding of the biological effects of this plant requires the bioactivities of individual compounds to be further evaluated.

3.2.4. *S. chinensis*

S. chinensis, known as Shijianchuan (Chinese Sage) in folk medicine, was first recorded in the *Compendium of Materia Medica* (Ming Dynasty, A.D. 1590). In this famous ancient text, *S. chinensis* was recorded as a treatment for ostealgia and swollen carbuncles. However, our ethnopharmacological investigation revealed that this herbal medicine has been employed to treat breast cancer, liver cancer, stomach cancer and hepatitis.

A phytochemical investigation of *S. chinensis* revealed over 50 chemical constituents in four classes of compounds: terpenoids (monoterpeneoids, sesquiterpenes and triterpenoids), phenolic acids, flavonoids and others. Individual members of each class include: Terpenoids α-boswellic acid⁶⁵, blumenol A, clovane-2β,9α-diol⁶⁶ and pinfaenoic acid⁶⁷; phenolic acids salvianolic acid D⁶⁸, salvianolic acid B⁶⁹, propanoic acid, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxybenzoic acid⁷⁰, 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid⁷¹, 5,7,4'-trihydroxydihydroflavonol⁷¹ and protocatechuic acid⁷²; flavonoids 3,5,7-trihydroxychromone and kaempferol⁶⁷; and other compounds β-sitosterol^{65,73}, 5-hydroxymethyl furaldehyde⁷³, syringaresinol⁷¹ and various aldehydes^{65,73}.

Modern pharmacological research has revealed that the aqueous extract of *S. chinensis* can significantly inhibit the proliferation of human nasopharynx cancer CNE cells and human gastric cancer MGC-803 cells⁷⁴. Polysaccharides isolated from *S. chinensis* exhibited strong antitumor activity^{75,76} and were also reported to stimulate B-lymphocytes and, at a concentration of 20 mg/L, protect PC-12 cells against H₂O₂-induced injury⁷⁶⁻⁷⁸. In addition, *S. chinensis* was reported to protect against CCl₄-induced acute liver injury in mice probably due to the antioxidant activity of the phenolic acids present in this herbal medicine⁷⁹.

Again this species has not been studied extensively and little is known about the active substances responsible for its bioactivities, especially its anticancer activity.

3.2.5. Other species

Based on our investigations of folk medicines, six *Salvia* species (*S. japonica*, *S. kiangsiensis*, *S. liguliloba*, *S. substolonifera*, *S. scapiformis* and *S. coccinea*) have been mainly used to clear heat from the blood. The results indicate that *Salvia* plants may be a source of new drugs possessing antibacterial, antiviral and anti-tumor activities. The leaves of *S. officinalis* have been used in tea to prevent and treat hypertension but the bioactivities of its individual chemical constituents remain to be assessed.

4. Conclusions

Despite the recorded use of 35 *Salvia* plants in folk medicine, only a few species have been studied extensively and many questions remain in relation to their systematic classification, identification and resource utilization. Nevertheless, it is clear that some species of *Salvia* L. possess significant potential in the treatment of heart disease. The diterpenoids and the caffeoic acid derivatives are the most characteristic compounds in the genus^{14,63}, most of which are associated with antioxidant, anticoagulant and cytoprotective activities. They also possess a wide variety of other activities including anti-ischemia-reperfusion injury, antihypertensive, anti-fibrotic, antiviral and antitumor activities^{22,32,80,81}. However, many species of *Salvia* remain to be explored in terms of their safety or toxicity and their phytochemical and pharmacological characteristics in order to improve their medical utilization and develop effective natural drugs.

Acknowledgment

The authors thank Prof. Xiwen Li and Prof. Dequn Wang for assistance in the identification of some of the plant specimens. This work was financially supported by grants from the Chinese National Natural Science Foundation (81060372), the Key Project of the Chinese Ministry of Education (211033), the “Twelfth Five-year Plan” Program supported by the Ministry of Science and Technology (2012BA128B02) and the China Postdoctoral Science Foundation (2011M500506).

References

- Alziar G. Catalogue synonymique des *Salvia* L. du monde (Lamiaceae), I-VI. *Biocosome Mesoge'en* 1988–1993. 5:3–4, 87–136; 6:1–2, 4, 79–115, 163–204; 7:1–2, 59–109; 9:2–3, 413–497; 10:3–4, 33–117.
- Li XW, Hedge IC. Lamiaceae. In: Wu ZY, editor. *Flora of China*. Beijing and St. Louis: Science Press and Missouri Botanical Garden Press; 1998. p. 195–222.
- Topcu G. Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *J Nat Prod* 2006;69:482–7.
- Baricevic D, Bartol T. The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus. In: Kintzios SE, editor. *SAGE- the genus Salvia*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000. p. 143–84.
- The State Pharmacopoeia Committee of China. *People's Health Publishing House* 2010; 70.
- Zhou L, Zuo Z, Chow MSS. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics and clinical use. *J Clin Pharmacol* 2005;45:1345–59.
- Cheng TO. Danshen: a versatile Chinese herbal drug for the treatment of coronary heart disease. *Int J Cardiol* 2006;113:437–8.
- Wu YB, Ni ZY, Shi QW, Dong M, Kiyota H, Gu YC, et al. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chem Rev* 2012;112:5967–6026.
- Akkol EK, Goger F, Kosar M, Baser KHC. Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from turkey. *Food Chem* 2008;108:942–9.
- Wu ZY, Li XW. *Lamiaceae. Flora Reipublicae Popularis Sinicae*, 66. Beijing: Science Press; 70–9.
- Bruneton J. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. Andover: Intercept Limited; 1999.
- Lan M. *Yunnan materia medica*. Kunming: Yunnan People's Publishing House; p. 14.
- Wu QJ. *An illustrated book of plants*. Beijing: The Commercial Press; 1957, p. 158–254.
- Li MH, Chen JM, Peng Y, Wu QL, Xiao PG. Investigation of Danshen and related medicinal plants in China. *J Ethnopharmacol* 2008;120:419–26.
- Li LN, Song ZY. *Danshen*. In: *Chinese medicine modern research*. Beijing: Pumpress; p. 472–541.
- Min ZD, Xu RS. *Natural product chemistry*. Beijing: Science Press; p. 333.
- Wang BQ. *Salvia miltiorrhiza*: Chemical and pharmacological review of a medicinal plant. *J Med Plants Res* 2010;4:2813–20.
- Cheng TO. Cardiovascular effects of Danshen. *Int J Cardiol* 2007;1:9–22.
- Kang DG, Oh H, Chung HT, Lee HS. Inhibition of angiotensin converting enzyme by lithospermic acid B isolated from Radix *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Phytother Res* 2003;17:917–20.
- Tan XH, Xue WJ, Ding XM. Application of Danshen injection on early stage of renal transplantation. *Chin J Integr Med* 2005;25:404–7.
- Yang H, Han L, Sheng T, He Q, Liang J. Effects of replenishing qi, promoting blood circulation and resolving phlegm on vascular endothelial function and blood coagulation system in senile patients with hyperlipidemia. *J Tradit Chin Med* 2006;26:120–4.
- Wang X, Morris-Natschke SL, Lee KH. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen. *Med Res Rev* 2007;27:133–48.
- Tanaka T, Nishimura A, Kouno I, Nonaka G, Young TJ. Isolation and characterization of yunnaneic acids A–D, four novel caffeoic acid metabolites from *Salvia yunnanensis*. *J Nat Prod* 1996;59:843–6.
- Tanaka T, Nishimura A, Kouno I, Nonaka G, Yang CR. Four new caffeoic acid metabolites, yunnaneic acids E–H, from *Salvia yunnanensis*. *Chem Pharm Bull* 1997;45:1596–600.
- Xu G, Peng LY, Lu L, Weng ZY, Zhao Y, Li XL, et al. Two new abietane diterpenoids from *Salvia yunnanensis*. *Planta Med* 2006;72:84–6.
- Lin FW, Damu AG, Wu TS. Abietane diterpene alkaloids from *Salvia yunnanensis*. *J Nat Prod* 2006;69:93–6.
- Zhang ZF, Chen HS, Li JR, Jiang JD, Li ZR. Studies on polyphenolic chemical constituents from root of *Salvia yunnanensis*. *China J Chin Mater Med* 2007;32:1886–90.
- Sun JP, Liu L, Zhao DP, Yuan RH, Li ZJ. Effect of *Salvia yunnanensis* C.H. Wright on biological behavior of scar-derived fibroblasts. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res* 2009;13:320–3.

29. Peng ZG, Qin DH, Teng L. Study on anti-HIV-1 activities of composite extract from *Salvia yunnanensis*. *Chin J Integr Tradit West Med* 2008;28:711–5.
30. Zhang ZF, Chen HS, Peng ZG, Li ZR, Jiang JD. A potent anti-HIV polyphenol from *Salvia yunnanensis*. *J Asian Na Prod Res* 2008;10:273–7.
31. Song HZ, Miki I, Masahiko K, Muto Y. In vitro study of the chemopreventive effects of Chinese herbs against hepatocarcinogenesis. *J Clin Biochem Nutr* 2004;35:1–5.
32. Jiang Y, Luo SQ, Zheng MS. Study on the active constituent from *Salvia plebeian*. *Chin J Pharm Ind* 2004;24:33–7.
33. Jiang AL, Wang CH. Antioxidant properties of natural components from *Salvia plebeia* on oxidative stability of ascidian oil. *Process Biochem* 2006;41:1111–6.
34. Xiang L, Chen HN, Xu CM, Zhang SS, Wang HY. Study on flavonoids from *Salvia plebeia*. *Chin Pharmaceut J* 2008;43:813–5.
35. Han GH, Li ZL, Sun L, Hua HM. Chemical constituents of the whole herbs of *Salvia plebeia* R. Br. *J Shenyang Pharm Univ* 2009;26:896–9.
36. Jin QH, Han XH, Hwang JH, Hong SS, Park M, Lee C, et al. A new phenylbutanone glucoside from *Salvia plebeian*. *Nat Prod Sci* 2009;15:106–9.
37. Lee GT, Duan CH, Lee JN, Lee KS, Hong JT, Lee KK. Phytochemical constituents from *Salvia plebeia*. *Nat Prod Sci* 2010;16:207–10.
38. Jin XF, Qian J, Lu YH. The role of hepatoprotective effect of a flavonoid-rich extract of *Salvia plebeia* R.Br. on carbon tetrachloride induced acute hepatic injury in mice. *J Med Plant Res* 2011;9:1558–63.
39. Lu RM, Yang CS, Wei JH. Chemical constituents of *Salvia plebeia*. *Chin Tradit Herb Drugs* 2011;42:859–62.
40. Garcia-Alvarez MC, Hasan M, Michavila A, Fernandez-Gadea F, Rodriguez B. Epoxysalviacoccin, a neo-clerodane diterpenoid from *Salvia plebeia*. *Phytochemistry* 1986;25:272–4.
41. Weng CH, Gu LW, Dong XW. The separation of chemical components and the structure identification and anti-oxidant resistance from *Salvia plebeian*. *J Yantai Univ Nat Science Eng Version* 1997;10:305–12.
42. Powell RG, Platner RD. Structure of a secoisolaricresinol diester from *Salvia plebeian* seed. *Phytochemistry* 1976;15:1963–5.
43. Plattner RD, Powell RG. A secoisolaricresinol branched fatty diester from *Salvia plebeian* seed. *Phytochemistry* 1978;17:149–50.
44. Bae MJ, Ye EJ, Kim SJ, Kim JM, Yee ST, Park EM. The effect of Plebeiae Herba (*Salvia plebeia* R.Br.) on the anticancer (*in vitro*) and activation of immune cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2007;36:377–82.
45. Jung HJ, Song YS, Lim CJ, Park EH. Antiflammatory, antiangiogenic and antinociceptive activities of an ethanol extract of *Salvia plebeia* R. Brown. *J Ethnopharmacol* 2009;126:355–60.
46. Jo SY, Lee U, Kim EY, Lee SJ, Her JW, Yoon TJ. A study on the antiflammatory and antiallergic effect of *Salvia plebeia* R. extracts. *Korean J Pharmacogn* 2010;41:31–7.
47. Qu XJ, Xia X, Wang YS, Song MJ, Liu LL, Xie YY, et al. Protective effects of *Salvia plebeian* compound homoplantaginin on hepatocyte injury. *Food Chem Toxicol* 2009;47:1710–5.
48. Peng MM, Fang Y, Hu W, Huang Q. The pharmacological activities of compound *Salvia plebeia* granules on treating urinary tract infection. *J Ethnopharmacol* 2010;129:59–63.
49. Yang BJ, Huang XL, Huang Y, Wang XM, Lin LZ. Study on the chemical constituents of *Salvia prionitis*. *Acta Bot Sin* 1988;30:524–7.
50. Lin LZ, Wang XM, Huang XL, Yang BJ. A new diterpenoid quinone dehydromiltirone. *Acta Pharmacol Sin* 1988;23:273–5.
51. Lin LZ, Wang XM, Huang XL, Huang Y, Yang BJ. Diterpenoids from *Salvia prionitis*. *Planta Med* 1988;54:443–5.
52. Lin LZ, Wang XM, Huang XL, Huang Y, Geoffrey AC. Saprolactone, a cytotoxic norditerpene from *Salvia prionitis*. *Phytochemistry* 1989;28:3542–3.
53. Lin LZ, Blasko G, Cordell GA. Diterpenes of *Salvia prionitis*. *Phytochemistry* 1989;28:177–81.
54. Lin LZ, Wang XM, Huang XL, Huang Y. A new diterpenoid quinone sapriparaquinone. *Acta Pharm Sin* 1990;25:154–6.
55. Lin LZ, Cordell GA, Lin P. De-O-ethylsalvonitin and salprinon, two further diterpenoids from *Salvia prionitis*. *Phytochemistry* 1995;40:1469–71.
56. Zhang JS, Huang Y. Two new diterpenoids, prioketolactone and neopriornitone, from *Salvia prionitis*. *Nat Product Res Dev* 1995;7:1–4.
57. Li M, Zhang JS, Ye YM, Fang JN. Constituents of the roots of *Salvia prionitis*. *J Nat Prod* 2000;63:139–41.
58. Li M, Zhang JS, Chen MQ. A novel dimeric diterpene from *Salvia prionitis*. *J Nat Prod* 2001;64:971–2.
59. Chen X, Ding J, Ye YM, Zhang JS. Bioactive abietane and seco-abietane diterpenoids from *Salvia prionitis*. *J Nat Prod* 2002;65:1016–20.
60. Wu SJ, Zhao T, Qin YQ. *The chemical composition of modern herbals*. Beijing: Chinese Medical Technology Press; 156–60.
61. Chang J, Xu J, Li M, Zhao M, Ding J, Zhang JS. Novel cytotoxic seco-abietane rearranged diterpenoids from *Salvia prionitis*. *Planta Med* 2005;71:861–6.
62. Xu J, Chang J, Zhao M, Zhang JS. Abietane diterpenoid dimers from the roots of *Salvia prionitis*. *Phytochemistry* 2006;67:795–9.
63. Li MH, Peng Y, Xiao PG. Distribution of tanshinones in the genus *Salvia* (family Lamiaceae) from China and its systematic significance. *J Syst Evol* 2010;48:118–22.
64. Han AR, Deng Y, Ren YL, Pan L, Kinghorn AD. Plant-derived anticancer agents used in western and oriental medicine. *Dietary Component Immune Funct* 2010;317–33.
65. Xu MJ, Lin YL, Shi JC. Study on chemical constituents from *Salvia chinensis*. *Chin Herb Med* 1987;18:46.
66. Wang YL, Li Z, Zhang H, Sha Y, Pei Y, Hua H. New germacrane sesquiterpenes from *Salvia chinensis*. *Chem Pharm Bull* 2008;56:843–6.
67. Wang YL, Song DD, Li ZL, Yuan T, Zhang HL, Pei YH, et al. Triterpenoids isolated from the aerial parts of *Salvia chinensis*. *Phytochem Lett* 2009;2:81–4.
68. Qian TX, Li LN. Isosalvianolic acid C, a depside possessing a dibenzoxepin skeleton. *Phytochemistry* 1992;31:1068–70.
69. Li MH, Chen JM, Peng Y, Xiao PG. Distribution of phenolic acids in Chinese *Salvia* plants. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med* 2008;10:46–52.
70. Kang C, Li ML, Wang Q, Huang LQ, Franco FV, Anna RB. Studies on water-soluble substances and determination of Danshensu and protocatechualdehyde of Herba *Salvia chinensis*. *Chin J Exp Tradit Med Form* 2009;15:1–3.
71. Liu HX, Sui HW, Xiang MX. Study on chemical constituents of acetic acid parts from *Salvia chinensis*. *Chin J Hosp Pharm* 2010;30:1657–60.
72. Liu HX, Sui HW, Xiang MX. Analysis of the content of protocatechuic acid from *Salvia chinensis*. *Lishizhen Med Mater Med Res* 2011;22:131–2.
73. Wang YL, Li ZL, Liu T, Liu H, Hua HM. Isolation and identification of chemical constituents of the aerial parts of *Salvia chinensis* Benth. *J Shenyang Pharm Univ* 2009;26:110–1.
74. Yuan X, Chen GX, Li WX, Peng YM. Studies on the effects of *Salvia chinensis* on human gastric cancer cells and nasopharyngeal carcinoma cells in vitro. *Cancer Res Prev Treat* 1989;16:7–9.
75. Zheng HY, Xu W, Zheng XY, Tang XZ. *Salvia chinensis* polysaccharide extract and of liver cancer cell proliferation inhibitory effect. *Chin J Tradit Med Sci Technol* 2008;15:360–2.
76. Liu CP, Fang JN, Li XY, Xiao XQ. Structural characterization and biological activities of SC4, an acidic polysaccharide from *Salvia chinensis*. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:162–6.
77. Liu CP, Wang XS, Fang JN. Chemical study on two acidic polysaccharide from *Salvia chinensis*. *Chin Herb Med* 2004;35:8–12.
78. Liu CP, Liu XS, Fang JN. Chemical studies on SC3, a polysaccharide from *Salvia chinensis*. *Acta Pharm Sin* 2007;37:189–93.
79. Chen P, Cui YR, Li DF, Zheng QS. Hepatoprotective effects of phenolic acid from *Salvia chinensis* Benth. On carbon tetrachloride induced acute liver injury in mice. *J Anhui Agric Sci* 2010;38:4607–9.
80. Lu Y, Foo LY. Polyphenolics of *Salvia*—a review. *Phytochemistry* 2002;59:117–40.
81. Lee WYW, Chiu LCM, Yeung JHK. Cytotoxicity of major tanshinones isolated from Danshen(*Salvia miltorrhiza*) on HepG2 cells in relation to glutathione perturbation. *Food Chem Toxicol* 2008;46:328–38.



Revista da Propriedade Industrial

Nº 2604
01 de Dezembro de 2020

Comunicados Seção I



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente

Jair Bolsonaro

MINISTÉRIO DA ECONOMIA

Ministro da Economia

Paulo Roberto Nunes Guedes

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Presidente

Claudio Vilar Furtado

De conformidade com a Lei nº 5.648 de 11 de dezembro de 1970, esta é a publicação oficial do Instituto Nacional da Propriedade Industrial, órgão vinculado ao Ministério da Economia, República Federativa do Brasil, que publica todos os seus atos, despachos e decisões relativos ao sistema de propriedade industrial no Brasil, compreendendo Marcas e Patentes, bem como os referentes a contratos de Transferência de Tecnologia e assuntos correlatos, além dos que dizem respeito ao registro de programas de computador como direito autoral.

As established by Law nº 5.648 of december 11, 1970, this is the official publication of the National Institute of Industrial Property, an office under the Ministry of Economy, Federative Republic of Brazil, which publishes all its official acts, orders and decisions regarding the industrial property system in Brazil, comprising Trademarks and Patents, as well as those referring to Technology Transfer agreements and related matters, besides those regarding software registering as copyright.

D'après la Loi nº 5.648 du 11 décembre 1970, celle-ci est la publication officielle de l'Institut National de la Propriété Industrielle, un office lié au Ministère de l'Économie, République Fédérative du Brésil, qui publie tous ses actes, ordres et décisions concernant le système de la propriété industrielle au Brésil, y compris marques et brevets, aussi que ceux référents aux contrats de transfert de technologie et des sujets afférents, en outre que ceux se rapportant à l'enregistrement des programmes d'ordinateur comme droit d'auteur.

Según establece la Ley nº 5.648 de 11 diciembre 1970, esta es la publicación oficial del Instituto Nacional de la Propiedad Industrial, oficina vinculada al Ministerio de la Economía, República Federativa del Brasil, que publica todos sus actos, ordenes y decisiones referentes al sistema de propiedad industrial en Brasil, comprendiendo marcas y patentes así que los referentes a contratos de transferencia de tecnología y asuntos corelacionados, además de los referentes al registro de programas de ordenador como derecho de autor.

Laut Gezets Nr. 5.648 vom 11. dezember 1970, ist dies das Amtsblatt des Nationalen Instituts für gewerbliches Eigentum (INPI), eines Organs des Bundesministerium für Wirtschaft, der Bundesrepublik Brasilien, welches alle Amtshandlungen, Beschlüsse und Entscheidungen über gewerbliches Eigentum in Brasilien, einschliesslich Warenzeichen und Patente, ebenso wie auch Übertragungsverträge von Technologie und Computerprogramme als Urheberrecht veröffentlicht.



**MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

PORTRARIA /INPI / Nº 372, DE 25 DE NOVEMBRO DE 2020

Atualiza a Portaria INPI/PR nº 335, de 25 de setembro de 2020, que dá publicidade à relação de atos normativos inferiores a decreto vigentes no Instituto Nacional da Propriedade Industrial

O PRESIDENTE DO INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL-INPI, no uso das atribuições que lhe confere o Decreto nº 8.854, de 22 de setembro de 2016 e a Portaria nº 11, de 27 de janeiro de 2017, tendo em vista o contido no artigo 12, do Decreto nº 10.139, de 28 de novembro de 2019, e o o constante dos autos do processo nº 52402.014294/2019-46,

RESOLVE:

Art. 1º Atualizar a Portaria INPI/PR nº 335, de 25 de setembro de 2020, com a inclusão e a exclusão de atos vigentes e revogados de forma expressa, respectivamente, identificados ao longo da triagem que perdura por todo processo de revisão e consolidação, nos termos do Anexo Único.

Art 2º A relação de atos normativos inferiores a decreto editados no âmbito do Instituto Nacional da Propriedade Industrial e não revogados expressamente, encaminhada à Secretaria Especial de Modernização do Estado da Secretaria-Geral da Presidência da República, para fins do disposto no art. 15, parágrafo único, do Decreto nº 10.139, de 28 de novembro de 2019, passa a conter:

- I - 255 (duzentas e cinquenta e cinco) Resoluções;
- II - 90 (noventa) Instruções Normativas;
- III - 78 (setenta e oito) Normas de Execução;
- IV - 136 (cento e trinta e seis) Portarias; e
- V - 45 (quarenta e cinco) Ordens de Serviço.

Art. 3º Esta Portaria entra em vigor na data da sua publicação.

CLÁUDIO VILAR FURTADO
Presidente



Documento assinado eletronicamente por **CLÁUDIO VILAR FURTADO, Presidente**, em 26/11/2020, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.inpi.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0347323** e o código CRC **2DDAA29**.



ANEXO ÚNICO

Relação das inclusões e exclusões à Portaria INPI/PR nº 335, de 25 de setembro de 2020

INCLUSÕES

- I. Resolução INPI/PR nº 114, de 23 de outubro de 2013 - Aprova a Agenda Estratégica 2013-2014, do Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI;
- II. Resolução INPI/PR nº 116, de 25 de outubro de 2013 - Define os Projetos da Agenda Estratégica 2013-2014 do INPI e a sua estrutura básica de gestão;
- III. Resolução INPI/PR nº 117, de 08 de novembro de 2013 - Definir os indicadores e metas de desempenho institucional para o período de 1º de novembro de 2013 a 31 de outubro de 2014, para fins de Avaliação de Desempenho Institucional, com vistas à concessão da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Propriedade Industrial - GD API e da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Ciência e Tecnologia – GDACT;
- IV. Resolução INPI/PR nº 118, de 12 de novembro de 2013 - Altera a redação da Resolução nº 117/2013, de 08/11/2013 e substitui seu Anexo I, que define os indicadores e metas de desempenho institucional para o período de 1º de novembro de 2013 a 31 de outubro de 2014, para fins de Avaliação de Desempenho Institucional, com vistas à concessão da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Propriedade Industrial - GD API e da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Ciência e Tecnologia – GDACT;
- V. Resolução INPI/PR nº 140, 13 de novembro de 2014 - Definir os indicadores e metas de desempenho institucional para o período de 1º de novembro de 2014 a 31 de outubro de 2015, para fins de Avaliação de Desempenho Institucional, com vistas à concessão da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Propriedade Industrial - GD API e da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Ciência e Tecnologia – GDACT;
- VI. Resolução INPI/PR nº 156, de 09 de novembro de 2015 - Dispõe sobre os serviços de assistência técnica dispensados de averbação pela Diretoria de Contratos, Indicações Geográficas e Registros – DICIG, consoante com o disposto no art. 211 da Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996;
- VII. Resolução INPI/PR nº 170, de 15 de julho de 2016 - Disciplina o Peticionamento Eletrônico do Sistema e-CONTRATOS;
- VIII. Resolução INPI/PR nº 199, de 07 de julho de 2017 - Dispõe sobre as Diretrizes de exame para averbação ou registro de contratos de licença de direito de propriedade industrial e de registro de topografia de circuito integrado, transferência de tecnologia e franquia;
- IX. Portaria INPI/PR nº 33, de 23 de janeiro de 2019 - Tornar público, na forma do Anexo a esta Portaria, os resultados finais referentes aos Indicadores de Desempenho Institucional do INPI, em 2018, de que trata a Instrução Normativa nº 084/2018;
- X. Instrução Normativa INPI/PR nº 43, de 03 de novembro de 2015 - Define os indicadores e metas de desempenho institucional para o período de 1º de novembro de 2015 a 31 de dezembro de 2015, para fins de avaliação de desempenho institucional, com vistas à concessão da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Propriedade Industrial - GD API e da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Ciência e Tecnologia - GDACT, e dá outras providências;

XI. Instrução Normativa INPI/PR nº 46, de 30 de dezembro de 2015 - Define os indicadores e metas de desempenho institucional para o período de 1º de janeiro a 31 de dezembro de 2016 para fins de avaliação de desempenho institucional, com vistas à concessão da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Propriedade Industrial - GD API e da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Ciência e Tecnologia - GDACT, e dá outras providências;

XII. Instrução Normativa INPI/PR nº 64, de 17 de janeiro de 2017 - Define os indicadores e metas de desempenho institucional para o período de 1º de janeiro a 31 de dezembro de 2017 para fins de avaliação de desempenho institucional, com vistas à concessão da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Propriedade Industrial - GD API e da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Ciência e Tecnologia - GDACT, e dá outras providências;

XIII. Instrução Normativa INPI/PR nº 70, 11 de abril de 2017 - Dispõe sobre o procedimento administrativo de averbação de licenças e cessões de direitos de propriedade industrial e de registro de contratos de transferência de tecnologia e de franquia;

XIV. Instrução Normativa INPI/PR nº 84, de 02 de janeiro de 2018 - Define os indicadores e as metas de desempenho institucional para o período de 1º de janeiro a 31 de dezembro de 2018 para fins de avaliação de desempenho institucional, com vistas à concessão da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Propriedade Industrial - GD API e da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Ciência e Tecnologia – GDACT, e dá outras providências;

XV. Instrução Normativa INPI/PR nº 86, de 20 de abril de 2018 - Altera a fórmula do indicador "Taxa de desempenho de decisões emitidas de Contratos e Faturas averbadas ou registradas" de que trata o Anexo I, da Instrução Normativa nº 84, de 02 de janeiro de 2018;

XVI. Portaria INPI/PR nº 186, de 30 de novembro de 2018 - Revisar o Plano de Ação do INPI para 2018, instituído pela Portaria INPI/PR nº 10, de 26 de janeiro de 2018;

XVII. Portaria PR/INPI nº 324, de 22 de outubro de 2020 – Designa o encarregado pelo tratamento de dados pessoais no âmbito do Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI;

XVIII. Portaria PR/INPI nº 325, de 22 de outubro de 2020 – Institui a Força-tarefa de Proteção de Dados Pessoais no âmbito do Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI;

XIX. Portaria PR/INPI nº 355, de 30 de outubro de 2020 – Institui o Programa de Bem-Estar, Reconhecimento Funcional e Inovação no âmbito do Instituto Nacional da Propriedade Industrial – Programa Bem Aqui no INPI.

XX. Portaria INPI/PR nº 356, de 03 de novembro de 2020 - Define os indicadores e as metas de desempenho institucional para o período de 1º de janeiro a 31 de dezembro de 2020 para fins de avaliação de desempenho institucional, com vistas à concessão da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Propriedade Industrial - GD API e da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Ciência e Tecnologia – GDACT, e dá outras providências;

XXI. Portaria INPI/PR nº 363, de 11 de novembro de 2020 – Torna pública a segunda e terceira revisão do Plano de Ação 2020 do Instituto Nacional da Propriedade Industrial;

EXCLUSÕES

I. Resolução INPI nº 8, de 18 de março de 2013 - Disciplina os procedimentos necessários ao adequado funcionamento da Ouvidoria do INPI;

II. Resolução INPI nº 91, de 29 de maio de 2013 – Divulga o rol de informações com restrição de acesso no âmbito do INPI;

III. Resolução INPI nº 111, de 26 de setembro de 2013 – Divulga o rol de informações com restrição de acesso no âmbito do INPI;

IV. Resolução INPI nº 112, de 10 de outubro de 2013 - Disciplina os procedimentos necessários ao adequado funcionamento da Ouvidoria do INPI;

V. Resolução INPI nº 121, de 18 de novembro de 2013 - Disciplina os procedimentos necessários ao adequado funcionamento da Ouvidoria do INPI;

VI. Resolução INPI nº 134, de 20 de junho de 2014 - Tornar sem efeito as metas estabelecidas para os indicadores de Gestão em 2014 e 2015, publicadas na Resolução 99/2013 e dá outras providências;

VII. Resolução INPI nº 138, de 22 de setembro de 2014 – Disciplina os procedimentos necessários ao adequado funcionamento da Ouvidoria do INPI;

VIII. Resolução INPI nº 221, de 04 de junho de 2018 - Institui o Comitê de Tecnologia da Informação, do Instituto Nacional da Propriedade Industrial;

IX. Portaria INPI/PR nº 321, de 03 de novembro de 2020 - Define os indicadores e as metas de desempenho institucional para o período de 1º de janeiro a 31 de dezembro de 2020 para fins de avaliação de desempenho institucional, com vistas à concessão da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Propriedade Industrial - GDAPI e da Gratificação de Desempenho de Atividade da Área de Ciência e Tecnologia – GDACT, e dá outras providências;

Referência: Processo nº 52402.014294/2019-46

SEI nº 0347323

Criado por [ana.pinto](#), versão 6 por [ana.pinto](#) em 26/11/2020 09:05:41.



**MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

INSTRUÇÃO NORMATIVA /INPI /PR Nº 118, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2020

Institui a nova versão das Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente na Área de Biotecnologia.

O PRESIDENTE DO INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL e a DIRETORA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS INTEGRADOS, no uso de suas atribuições previstas nos artigos 93, 152 e 155 do Anexo I da Portaria MDIC nº 11, de 27 de janeiro de 2017, e

CONSIDERANDO o constante dos autos do processo nº 52402.005058/2020-72,

RESOLVE:

Art. 1º Instituir a nova versão das Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente na Área de Biotecnologia.

Art. 2º - Revoga-se a Resolução INPI/PR Nº 144 / 2015 de 12/03/2015.

Art. 3º - A presente Instrução Normativa entra em vigor 1º de dezembro de 2020, nos termos do art. 4º, caput e incisos I e II do Decreto nº 10.139, de 28 de novembro de 2020.

LIANE ELIZABETH CALDEIRA LAGE

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

CLAUDIO VILAR FURTADO

Presidente



Documento assinado eletronicamente por **LIANE ELIZABETH CALDEIRA LAGE, Diretor(a)**, em 12/11/2020, às 19:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **CLAUDIO VILAR FURTADO, Presidente**, em 13/11/2020, às 07:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.inpi.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0341406** e o código CRC



EOF194BD.

Referência: Processo nº 52402.005058/2020-72

SEI nº 0341406

Criado por [gonofre](#), versão 2 por [gonofre](#) em 12/11/2020 14:51:34.



MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E
TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS INTEGRADOS

Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente na Área de Biotecnologia

Abril de 2020

Esse texto será parte integrante das Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente e tem como objetivo definir o entendimento atual deste INPI na área de biotecnologia. Os demais tópicos inerentes ao exame serão elencados e discutidos nas referidas Diretrizes gerais.

08/04/2020

v.2

ÍNDICE

1 REQUISITOS PARA A PROTEÇÃO DE PATENTES EM BIOTECNOLOGIA.....4

1.1 APLICAÇÃO INDUSTRIAL.....4

2 CONDIÇÕES PARA A PROTEÇÃO DE PATENTES EM BIOTECNOLOGIA.....6

2.1 UNIDADE DE INVENÇÃO6

2.2 SUFICIÊNCIA DESCRIPTIVA (ART. 24 DA LPI)6

2.2.1 DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO9

2.2.1.1 Casos em que deve ser realizado o depósito do material biológico.....10

2.2.1.2 Prazos para depósito de material biológico.....11

2.2.2 SUFICIÊNCIA DESCRIPTIVA DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS12

2.3 FUNDAMENTAÇÃO, CLAREZA E PRECISÃO (ART. 25 DA LPI).....12

2.3.1 FUNDAMENTAÇÃO NO RELATÓRIO DESCRIPTIVO.....12

3 REIVINDICAÇÕES15

3.1 REIVINDICAÇÕES DO TIPO REACH-THROUGH EM BIOTECNOLOGIA15

3.1.1 EXAME TÉCNICO DE REIVINDICAÇÕES REACH-THROUGH.....16

4 MATÉRIAS EXCLUÍDAS DE PROTEÇÃO SEGUNDO A LPI.....18

4.1 DEFINIÇÕES.....18

4.2 MATÉRIAS NÃO CONSIDERADAS INVENÇÃO (ART. 10 DA LPI).....19

4.2.1 PRODUTOS E PROCESSOS BIOLÓGICOS NATURAIS (ART. 10 (IX) DA LPI)19

4.2.1.1 Produtos biológicos naturais19

4.2.1.1.1 Composições contendo produto biológico natural.....20

4.2.1.1.2 Extratos20

4.2.1.1.3 Extratos enriquecidos.....21

4.2.1.2 Processos biológicos naturais.....22

4.2.1.3 Uso de produtos naturais.....23

4.3 INVENÇÕES NÃO PATENTEÁVEIS (ART. 18 DA LPI).....23

4.3.1 INVENÇÕES NÃO PATENTEÁVEIS POR INCIDIREM NO ART. 18 (I) DA LPI.....23

4.3.2 INVENÇÕES NÃO PATENTEÁVEIS POR INCIDIREM NO ART. 18 (III) DA LPI24

5 MICRORGANISMOS26

6 SEQUÊNCIAS BIOLÓGICAS.....27

6.1 COMO CARACTERIZAR.....27

6.1.1 SEQUÊNCIAS NA FORMA DE MARKUSH.....30

6.1.2 QUANDO É NECESSÁRIO O DEPÓSITO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS JUNTO AO PEDIDO.31

6.1.3 DA NECESSIDADE DE RESTRINGIR REIVINDICAÇÕES DE PROCESSO ÀS SEQUÊNCIAS

DEPOSITADAS JUNTO AO PEDIDO32

6.2 HOMOLOGIA, IDENTIDADE E SIMILARIDADE33

6.3 SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS.....35

6.3.1 MODIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIA(S) DE NUCLEOTÍDEOS.....	35
6.3.1.1 Modificação de sequência(s) por substituições, inserções ou deleções de nucleotídeos não modificados.....	36
6.3.1.1.1 SNPs	37
6.3.1.2 Modificação de sequência(s) de nucleotídeos com derivados modificados (inclusive com grupos protetores).....	37
6.3.2 FRAGMENTOS	37
6.3.3 OLIGONUCLEOTÍDEOS (OU INICIADORES)	38
6.3.3.1 Oligonucleotídeos degenerados e modificados	38
6.3.4 PROMOTORES	39
6.3.5 VETORES	41
6.3.6 CDNA	44
6.3.7 ESTs – EXPRESSED SEQUENCE TAGS.....	44
6.3.8 ORFs – OPEN READING FRAMES	45
6.3.9 RNAs.....	45
6.4 SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS.....	46
6.4.1 COMO CARACTERIZAR SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS	46
6.4.2 PROTEÍNAS HOMÓLOGAS (PARÁLOGOS E ORTÓLOGOS).....	48
6.4.3 FRAGMENTOS PROTEICOS	49
6.4.4 MODIFICAÇÕES NA SEQUÊNCIA.....	51
6.4.4.1 Com aminoácidos naturais (substituições, inserções ou deleções)	51
6.4.4.2 Com aminoácidos não naturais (inclusive com grupos protetores)	52
6.4.4.3 Grupamentos adicionados ao carboxi ou amino terminal	52
6.4.5 PROTEÍNAS DE FUSÃO	52
6.4.5.1 De ocorrência natural.....	53
6.4.5.2 Como caracterizar.....	53
6.4.5.3 Seq ID integral	53
6.4.5.4 Definição de apenas uma das sequências presentes na proteína da fusão.....	54
6.4.6 ANTICORPOS	56
6.4.6.1 Hibridomas.....	58
6.4.6.2 Anticorpos obtidos por engenharia genética	58
6.4.6.3 Fragmentos de anticorpos	60
7 ANIMAIS, PLANTAS, SUAS PARTES E PROCESSOS DE OBTENÇÃO.....	61
7.1 ANIMAIS, PLANTAS E SUAS PARTES	61
7.1.1 CÉLULAS-TRONCO	61
7.1.2 PRODUTOS E PROCESSOS ENVOLVENDO CÉLULAS-TRONCO	62
7.2 PLANTAS TRANSGÊNICAS, SUAS PARTES E SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO	63
7.3 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PLANTAS POR CRUZAMENTO.....	64
7.4 TECNOLOGIAS GENÉTICAS DE RESTRIÇÃO DE USO.....	66
8 PEDIOS DE PATENTE ENVOLVENDO COMPONENTES DO PATRIMÔNIO GENÉTICO NACIONAL.....	69
9 REFERÊNCIAS	70

1 Requisitos para a proteção de patentes em biotecnologia

[1] Os requisitos de novidade e atividade inventiva são discutidos nas Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente, Bloco II. Neste anexo serão destacadas apenas algumas especificidades dos pedidos de patente de biotecnologia.

1.1 Aplicação industrial

[2] O conceito de aplicação industrial no campo da biotecnologia deve atender ao exposto nas Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente, Bloco II, e atenção especial deve ser dada à definição de uma utilidade para a invenção pleiteada.

[3] Quando a invenção envolve sequências biológicas, o requisito de aplicação industrial só é atendido quando é revelada uma utilidade para a referida sequência.

[4] Dessa forma, se um pedido de patente identifica, por homologia, uma nova sequência, sendo que a sequência homóloga descrita no estado da técnica possui função conhecida, a nova sequência identificada no pedido de patente é suscetível de aplicação industrial desde que esta utilidade esteja identificada no relatório descriptivo.

Exemplo 1:

A proteína de SEQ ID NO: 1 foi identificada em diferentes pacientes com câncer de próstata, e nenhuma função biológica para esta proteína é conhecida no estado da técnica. Verifica-se que essa proteína descrita no pedido é um marcador importante para diagnosticar câncer de próstata.

As invenções relacionadas a esta proteína (por exemplo, uso, composição, kit de diagnóstico) são suscetíveis de aplicação industrial uma vez que o pedido claramente revela um uso prático para esta sequência (marcador para diagnosticar in vitro câncer de próstata), mesmo que a sua função biológica ainda seja desconhecida.

Exemplo 2:

O pedido revela uma proteína de SEQ ID NO: 1 que foi isolada de leveduras; no entanto, não revela nenhuma função/aplicação para a mesma e esta não apresenta homologia com nenhuma proteína de função conhecida.

O relatório descritivo revela uma lista meramente especulativa de aplicações sem embasamento técnico capaz de fundamentar qualquer aplicação prática para a proteína. Essa proteína e/ou seu uso e/ou composições compreendendo a mesma não são suscetíveis de aplicação industrial, uma vez que tais matérias não apresentam utilidade prática definida.

2 Condições para a proteção de patentes em biotecnologia

2.1 Unidade de invenção

[5] Um pedido de patente terá que se referir a uma única invenção ou a um grupo de invenções inter-relacionadas de maneira a compreenderem um conceito geral único (art. 22 da Lei da Propriedade Industrial 9.279/96 – LPI; vide Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente, Bloco I).

Exemplo 3: Múltiplas moléculas de ácidos nucleicos que compartilham uma estrutura comum e codificam proteínas com propriedades comuns.

Reivindicação: Ácido nucleico modificado caracterizado por ser selecionado de SEQ ID NO: 1, 2 ou 3.

O relatório descritivo menciona que os três ácidos nucleicos codificam desidrogenases que incluem uma sequência de motivo conservado definindo o sítio catalítico. Os três ácidos nucleicos são isolados de três diferentes fontes (camundongo, rato e humano) e modificados. O relatório descritivo mostra claramente que estes três ácidos nucleicos são homólogos baseados em sua identidade de sequência global (85-95% de identidade) para ambas as sequências de nucleotídeos e aminoácidos.

As mesmas características técnicas ou equivalentes que são compartilhadas entre as moléculas de ácidos nucleicos residem em suas propriedades comuns (codificando desidrogenases) e seus elementos estruturais compartilhados são essenciais para a propriedade comum (o motivo conservado). Então, há característica técnica especial e as SEQ ID NOs: 1, 2 e 3 têm unidade de invenção.

2.2 Suficiência descritiva (art. 24 da LPI)

[6] O art. 24 da LPI determina que o relatório deverá descrever clara e suficientemente o objeto, de modo a possibilitar sua realização por técnico no assunto. Entende-se por objeto a matéria para a qual se pretende proteção, ou seja, a matéria contida no quadro reivindicatório. Assim sendo, a análise da suficiência descritiva da matéria reivindicada deve ser feita com base no que foi revelado no relatório descritivo, listagem de sequências e desenhos (quando houver).

[7] Deve ser assegurado que o pedido contenha informação técnica suficiente para permitir que um técnico no assunto coloque a invenção em prática, sem experimentação indevida (vide item 2.15 das Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente, Bloco I).

[8] Na área de biotecnologia, entende-se que é tolerável a realização de experimentos de padronização para que o técnico no assunto reproduza a invenção, sem que isso necessariamente configure uma experimentação indevida. Neste sentido, não se considera indevida a realização de experimentos que sejam óbvios e/ou rotineiros para um técnico no assunto à época do depósito, ainda que tal experimentação seja laboriosa e/ou tediosa (p.ex. a padronização das condições ótimas para a reação de PCR, quando o problema técnico solucionado pela invenção não reside no ajuste específico dessas condições).

[9] Quando o pedido se referir a um produto ou processo envolvendo um material biológico, que não possa ser descrito de maneira que um técnico no assunto possa compreender e reproduzir a matéria, o relatório descriptivo deverá ser suplementado pelo depósito do dito material (vide item 2.2.1).

[10] Dois exemplos de insuficiência descriptiva na área de biotecnologia merecem menção especial. O primeiro é aquele em que a concretização da invenção é dependente do acaso. Nessa situação, mesmo que o técnico no assunto siga as instruções dadas no pedido, não há garantia de obter os resultados alegados. Esses casos devem ser contestados em decorrência do disposto no art. 24 da LPI (vide item 2.2.1.1 e exemplo 4). O segundo é quando a concretização da invenção é inherentemente impossível. Por exemplo, em um método que inclui a amplificação de uma determinada sequência de DNA através da utilização de um dado par de iniciadores (*primers*), em que os referidos iniciadores não são complementares a nenhuma parte da sequência de DNA, o que tornaria inviável a execução do método.

Exemplo 4:

O pedido descreve um microrganismo mutante obtido através de mutagênese aleatória com radiação UV. Como a obtenção do microrganismo é dependente do acaso, a suficiência descriptiva do microrganismo somente será satisfeita através do depósito do microrganismo (vide item 2.2.1.1). O documento comprobatório do depósito do microrganismo em questão poderá ser apresentado via esclarecimentos, durante o exame técnico, desde que o depósito do microrganismo tenha ocorrido até a

data de depósito do pedido (ou da prioridade do pedido, quando houver). O microrganismo obtido por mutação induzida por UV assim depositado não incidirá no art. 10 (IX) da LPI desde que não haja evidência concreta de que o microrganismo com aquela característica é verificado na natureza.

Exemplo 5:

O pedido descreve um método novo e inventivo de obtenção de microrganismos mutantes através de mutagênese aleatória. Como as etapas do referido método estão descritas detalhadamente no relatório descritivo, é possível que um técnico no assunto reproduza a invenção. Portanto, tal método apresenta suficiência descritiva, atendendo ao disposto no art. 24 da LPI. Caso esse método esteja vinculado à obtenção de apenas um mutante com características específicas, a informação do depósito do mesmo deve estar presente na reivindicação, uma vez que não há garantia de obtenção do mesmo resultado.

Exemplo 6:

O pedido descreve um método que utiliza um microrganismo mutante. O relatório descritivo não dá detalhes sobre o processo de obtenção do microrganismo, mas o caracteriza através de seu respectivo número de depósito. Nesse caso, considera-se que o técnico no assunto poderia reproduzir o método em questão utilizando o microrganismo depositado. Dessa forma, a invenção satisfaz a condição da suficiência descritiva.

Exemplo 7:

O relatório descritivo revela uma proteína através de seu número de acesso no banco de dados de sequências do NCBI ou através de referência a um artigo científico, sendo que tal proteína é essencial para a concretização da invenção. Para atendimento ao requisito de suficiência descritiva disposto no art. 24 da LPI, deve ser exigido que o depositante incorpore ao pedido a sequência em questão, tal como revelada nos bancos de dados à época do depósito/prioridade, sob a forma de listagem de sequências, sem que isto resulte em inclusão de matéria, uma vez que tal

proteína poderia ser identificada de forma inequívoca a partir de seu número de acesso ou através do mencionado artigo científico (ver adicionalmente os itens 2.2.1.1 e 2.2.2).

Exemplo 8:

O pedido descreve um novo receptor dopaminérgico, devidamente caracterizado através de sua sequência de aminoácidos. O pedido menciona que antagonistas e agonistas do receptor também são úteis. Entretanto, o pedido não provê descrição técnica de quaisquer compostos antagonistas e agonistas do receptor. O técnico no assunto não estaria habilitado a concretizar a invenção relacionada aos antagonistas e agonistas devido à ausência de qualquer instrução técnica de como fazê-lo, pois a mera descrição de um receptor não fornece informação suficiente a respeito de moléculas que poderiam estimular ou impedir seu funcionamento. Desse modo, entende-se que as matérias relativas aos antagonistas ou agonistas da enzima não atendem à condição de suficiência descritiva (ver também item 3.1).

2.2.1 Depósito de material biológico

[11] No caso de material biológico essencial à realização prática do objeto do pedido, que não possa ser descrito na forma do art. 24 da LPI e que não estiver acessível ao público, o relatório será suplementado por depósito do material em instituição autorizada pelo INPI ou indicada em acordo internacional vigente no país, ou em qualquer uma das autoridades de depósito internacional reconhecidas pelo Tratado de Budapeste¹ (vide item 2.18 das Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente, Bloco I), conforme parágrafo único do referido artigo. Dessa forma, considera-se que “material biológico”, nesse contexto do depósito, pode referir-se a qualquer material contendo informação genética e capaz de exercer a auto-replicação direta ou indireta. Exemplos representativos incluem bactérias, arqueas, protozoários, vírus,

¹ Para uma lista dos países signatários do Tratado de Budapeste, vide http://www.wipo.int/treaties/en>ShowResults.jsp?lang=en&treaty_id=7.

Para uma lista de autoridades de depósito internacional (IDAs), vide <http://www.wipo.int/export/sites/www/treaties/en/registration/budapest/pdf/idalist.pdf>.

fungos, algas, sementes, linhagens de células animais e vegetais, híbridomas, cromossomos artificiais e demais vetores, podendo, para alguns desses casos, e de acordo com as exigências do centro depositário escolhido, ser depositada a célula hospedeira que abriga esses materiais biológicos.

2.2.1.1 Casos em que deve ser realizado o depósito do material biológico

[12] É importante ressaltar que, conforme apontado acima, a LPI se refere ao depósito de material biológico que não possa ser descrito na forma do art. 24, ou seja, que não possa ser descrito de forma clara e suficiente no relatório descriptivo. Assim, conclui-se que o depósito do material não se aplica, necessariamente, a todo e qualquer material biológico envolvido numa determinada invenção, uma vez que, por exemplo, polinucleotídeos e polipeptídeos devem ser descritos através de sua sequência de nucleotídeos e aminoácidos (obs.: ainda assim, não há impedimento de que tais materiais sejam adicionalmente depositados).

[13] Com relação aos microrganismos que possuem sequências nucleotídicas diferentes do encontrado na natureza, é necessário que seja apresentada no pedido a sequência nucleotídica modificada através da listagem de sequências (vide item 2.2.2), ou a sua denominação conhecida na técnica, ou os dados do depósito do microrganismo. Quando forem essenciais para conferir a característica inventiva, devem estar presentes também, na descrição, promotores específicos, o local de inserção do material heterólogo no genoma, a metodologia de obtenção da amostra, entre outras características essenciais, de forma que um técnico no assunto seja capaz de realizar a invenção.

[14] Nos casos em que os microrganismos são selecionados a partir de mutagênese aleatória e as alterações genéticas que resultam num efeito diferenciado não são definidas no pedido, para que o art. 24 da LPI seja atendido, é necessário que o microrganismo tenha sido depositado em uma autoridade internacional de depósito e que os dados quanto ao depósito do material biológico (como declaração de depósito ou nome da instituição, número e data do depósito) integrem o pedido (vide item 2.2.1). Dessa forma, o material biológico estará disponível na autoridade de depósito e, portanto, será considerado claro, suficientemente descrito e reproduzível. Se não houver o depósito do microrganismo, a matéria estará em desacordo com o art. 24 da LPI.

[15] Quando a característica inventiva obtida pela alteração genética é alcançada somente com uma cepa específica utilizada no pedido em exame, considera-se que o microrganismo em si é essencial para a realização da invenção e, portanto, é necessário o depósito do material biológico para que a matéria atenda o art. 24 da LPI. Por outro lado, o depósito do material biológico não é necessário quando a característica inventiva pode ser alcançada com diversas cepas ou espécies de microrganismos disponíveis utilizando a metodologia descrita no pedido. Assim, para situações em que organismos amplamente conhecidos sejam meramente transformados para expressar uma característica nova e surpreendente, basta que se indique o organismo de interesse, relacionando-o expressamente ao ácido nucleico a ser utilizado nesta transformação, e garantindo-se que esse ácido nucleico esteja descrito de forma clara e precisa.

[16] Nos casos em que a invenção não reside em um microrganismo ou material biológico em si, mas em seu uso, modificação ou cultivo, e um técnico no assunto não é capaz de realizar a invenção sem possuir a amostra referida no pedido, o depósito do microrganismo ou do material biológico também se faz necessário.

2.2.1.2 Prazos para depósito de material biológico

[17] No que se refere ao depósito original de material biológico para fins patentários, os itens 2.17 e 2.18 das Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente, Bloco I, estabelecem que o depósito do material biológico deverá ser efetuado até a data de depósito do pedido de patente, e que tais dados deverão integrar o relatório descritivo. Havendo reivindicação de prioridade unionista, o depósito de material biológico deverá ser anterior ou até a data da prioridade reivindicada, se aplicável, ou seja, se os direitos de prioridade se aplicarem ao material biológico.

[18] Quando os dados comprobatórios de depósito do material biológico não constarem do pedido de patente, e o examinador julgar que tais dados são necessários, deve ser formulada uma exigência técnica para manifestação do depositante. Se tal exigência não for cumprida o pedido deve ser indeferido, tendo por base o art. 24 da LPI.

2.2.2 Suficiência descritiva da listagem de sequências

[19] O pedido de patente que contenha em seu objeto uma ou mais sequências de nucleotídeos e/ou de aminoácidos, que sejam fundamentais para a descrição da invenção, deve conter uma seção de listagem de sequências, com vistas à aferição da suficiência descritiva de que trata o art. 24 da LPI (vide Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente, Bloco I). Ressalta-se que, se o pedido utilizar e fizer referência a sequências conhecidas na técnica, e essas sejam necessárias para a concretização da invenção, o examinador poderá emitir exigência para que as sequências sejam apresentadas. Deve ser observado ainda que as sequências devem corresponder àsquelas tais como constantes do estado da técnica à época do depósito/prioridade (i.e. tal como revelada nos bancos de dados), tendo em vista possível refinamento ou alterações nas sequências ao longo do tempo.

[20] Para o caso de sequências de nucleotídeos degeneradas, as mesmas podem ser aceitas, desde que gerem a mesma proteína (vide item 6.1, § [68]), sem que seja necessária a apresentação de cada uma das possibilidades de sequências de nucleotídeos na seção de listagem de sequências.

[21] De acordo com o art. 41 da IN 31/2013, a listagem de sequências deverá ser apresentada ao INPI de acordo com as resoluções em vigor. Atualmente, a Resolução que trata da apresentação de sequências é a Resolução INPI/PR Nº 187/2017.

2.3 Fundamentação, clareza e precisão (art. 25 da LPI)

2.3.1 Fundamentação no relatório descritivo

[22] A matéria objeto da proteção deve estar devidamente fundamentada no relatório descritivo. Para tanto, é necessário que a descrição realizada através do relatório descritivo forneça informações técnicas capazes de fundamentar toda a matéria pleiteada.

Exemplo 9:

Reivindicação: Proteína imunogênica caracterizada por consistir na SEQ ID NO: 1, e seus fragmentos.

O relatório descritivo apresenta uma proteína imunogênica mutada (não natural) de 600 resíduos de aminoácidos e revela também um fragmento imunogênico

desta proteína mutada (não natural), determinado como consistindo nos resíduos 320 a 400 da dita proteína. O quadro reivindicatório, por sua vez, pleiteia proteção para a proteína imunogênica e para fragmentos imunogênicos da dita proteína (reivindicação 1). Porém, o relatório descritivo só revela um fragmento imunogênico da dita proteína, qual seja: o que se inicia na posição 320 e termina na posição 400 da proteína. Nesse caso, considerando-se que os requisitos de patenteabilidade dispostos no art. 8º da LPI tenham sido atendidos, deve-se fazer uma exigência com base nos arts. 24 e 25 da LPI para que a matéria pleiteada restrinja-se apenas à suficientemente descrita e efetivamente fundamentada no relatório descritivo, qual seja uma proteína imunogênica e seu fragmento que compreende os resíduos 320 a 400 da dita proteína.

Nesse exemplo, mesmo que o depositante traga novas informações acerca de outros fragmentos imunogênicos da referida proteína que não haviam sido descritos na matéria inicialmente revelada, tais informações não poderiam ser consideradas, pois o relatório descritivo não mencionava outros fragmentos imunogênicos da citada proteína que não aquele compreendido entre os aminoácidos 320 e 400 da mesma. Portanto, permanece o fato de que o pleito de proteção amplo a “fragmentos imunogênicos da proteína” não poderia ser aceito por ausência de suficiência descritiva e de fundamentação da matéria no relatório descritivo.

Exemplo 10:

Reivindicação 1: Processo para transformar plantas caracterizado pela introdução do gene X em angiospermas e gimnospermas.

O relatório descritivo apresenta informações gerais sobre o processo e um exemplo detalhado da transformação do gene em uma angiosperma. Há evidência para um técnico no assunto de que tal processo não seria aplicável da mesma maneira para ambos os grupos de plantas, e portanto a reivindicação que inclui gimnospermas não estaria fundamentada no relatório descritivo. Essa falta de fundamentação poderia ser superada através de evidências de que a transformação de gimnospermas poderia ser realizada nas mesmas condições já mencionadas para angiospermas.

Contudo, se para alcançar a fundamentação da reivindicação para gimnospermas os dados fornecidos trouxerem novos parâmetros ou quaisquer adaptações que não sejam triviais para um técnico no assunto, tais informações não poderão ser aceitas. Isso porque seria necessária a inclusão dos dados no relatório

descritivo o que configuraria acréscimo de matéria, estando em desacordo com o art. 32 da LPI.

3 Reivindicações

[23] Existem dois tipos básicos de reivindicações: de produto, relacionada a uma entidade física; e de processo, relacionada a uma atividade (vide Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente, Bloco I).

[24] Na área de biotecnologia, alguns exemplos não exaustivos de matérias consideradas dentro da categoria de “produtos” são: ácidos nucleicos, peptídeos, polipeptídeos, proteínas, microrganismos, vírus, células, vetores, plantas, sementes, híbridomas, anticorpos, sondas, vacinas, composições, kits, cassetes de expressão, extratos, produtos alimentícios, e outros. Já para “reivindicações de processo”, alguns exemplos não exaustivos são: processo para produzir um composto/composição; processo para selecionar uma sequência de ácido nucleico/polipeptídeos/peptídeos; processo para produzir microrganismo/planta/animal transgênico; método de purificação; processos de extração/isolamento, dentre outros.

3.1 Reivindicações do tipo *reach-through* em biotecnologia

[25] Reivindicação *reach-through* é um tipo especial de reivindicação que objetiva proteção para futuras invenções com base numa invenção do presente. Ou seja, esse tipo de reivindicação objetiva proteção para invenções que não haviam sido identificadas pelo inventor até o momento de depósito do seu pedido de patente, mas que poderão ser identificadas no futuro pelo uso da sua invenção real.

[26] Um tipo frequente de reivindicação *reach-through* em biotecnologia é a reivindicação de produto, o dito produto geralmente correspondendo a um “composto candidato”. Tais reivindicações objetivam proteger compostos que são candidatos a moduladores da atividade da invenção real, tais como os agentes que modulam a função biológica de uma proteína ou de um gene.

[27] Os produtos *reach-through* (drogas, agonistas, antagonistas, etc.) costumam ser identificados apenas por referência a um material ou método usado na identificação dos mesmos, sem definição de suas estruturas químicas. Ou ainda, tais produtos são definidos em termos da função associada com a invenção real, já que esta é a única informação disponível para o inventor. Em consequência, tanto compostos já conhecidos do estado da técnica quanto os que ainda estão por serem

identificados acabam sendo englobados pelo escopo da reivindicação, que desse modo se torna bastante amplo.

[28] O outro tipo de reivindicação *reach-through* em biotecnologia é a reivindicação de processo de identificação de compostos moduladores. Nesse tipo de reivindicação, o composto identificado pelo processo não é definido pela sua estrutura e sim pela sua capacidade de modular a expressão de uma proteína ou de um gene envolvido em uma doença, por exemplo, ou ainda pelo método de rastreamento usado para identificar o dito composto. A característica comum para esses tipos de reivindicações é que não se sabe qual é a matéria objeto a ser protegida.

3.1.1 Exame técnico de reivindicações *reach-through*

[29] As matérias das reivindicações *reach-through* tipicamente não apresentam suficiência descritiva, clareza, precisão e/ou fundamentação, estando em desacordo com os arts. 24 e 25 da LPI.

Exemplo 11:

Reivindicação 1: Processo para identificar um agonista/antagonista do polipeptídeo X caracterizado por compreender (a) contatar o dito polipeptídeo com um composto a ser rastreado; e (b) determinar se o composto afeta a atividade do dito polipeptídeo.

Reivindicação 2: Um agonista/antagonista caracterizado por ser para o polipeptídeo X como identificado pelo processo definido pela reivindicação 1.

O pedido trata de um novo e inventivo processo de rastreamento (screening) para moduladores da atividade de um polipeptídeo já conhecido do estado da técnica (polipeptídeo X), cuja atividade foi demonstrada como envolvida na doença Y, sendo que não foram caracterizados os compostos identificados pelo dito processo.

A reivindicação 1 define a invenção principal do pedido que é um método de rastreamento de compostos de interesse terapêutico e que modulam a atividade do polipeptídeo X, sendo a invenção de fato, e a reivindicação 2 é do tipo reach-through, que nessa situação pode incluir em seu escopo compostos já conhecidos e que não são modificados de forma alguma pelo processo usado na identificação dos mesmos, e compostos ainda não conhecidos.

Muito embora o pedido descreva de forma suficiente o processo de rastreamento especificado na reivindicação 1, e por este aspecto poderia ser aceito, a reivindicação 2 não é aceita devido à falta de suficiência descritiva (art. 24 da LPI),

clareza, precisão e fundamentação (art. 25 da LPI). A reivindicação 2 usa características funcionais (e não estruturais) para definir a matéria objeto da proteção. Ocorre que a definição de um produto por características funcionais frequentemente ocasiona falta de clareza da matéria objeto. Um técnico no assunto não poderia reduzir à prática a definição da matéria objeto reivindicada, porque os compostos pleiteados per se (reivindicação 2) possuem possibilidades estruturais potencialmente ilimitadas, e assim incluindo compostos que ainda estão por ser identificados e/ou que já estão disponíveis no estado da técnica e/ou ainda incidam nas proibições do art. 10 (IX) da LPI.

A reivindicação 2 pleiteia proteção para compostos candidatos identificados pelo método de rastreamento da invenção definido pela reivindicação 1. Tais compostos foram definidos tecnicamente apenas por sua atividade (ou seja, definição funcional - redação comum a esse tipo de reivindicação) que na presente situação corresponde a uma modulação (agonista/antagonista) da atividade do polipeptídeo X. Não foram definidas as características estruturais dos compostos candidatos; tal situação obrigaria ao dito técnico testar inúmeros compostos já conhecidos e todos os compostos que venham a ser identificados no futuro usando o método de rastreamento da invenção, a fim de determinar quais desses compostos teriam a atividade desejada e que assim estariam abrangidos pelo escopo das reivindicações em exame.

4 Matérias excluídas de proteção segundo a LPI

4.1 Definições

[30] Conforme o entendimento adotado por esse Instituto, do ponto de vista técnico, os termos e expressões utilizados nos arts. 10 e 18 da LPI são interpretados da seguinte forma:

- o “todo” (de seres vivos naturais) refere-se a plantas, animais, microrganismos e qualquer ser vivo;
- “parte de seres vivos naturais” refere-se a qualquer porção dos seres vivos, como órgãos, tecidos e células;
- “materiais biológicos encontrados na natureza” englobam o todo ou parte de seres vivos naturais, além de extratos, lipídeos, carboidratos, proteínas, DNA, RNA, encontrados na natureza ou ainda que dela isolados, e partes ou fragmentos dos mesmos, assim como, qualquer substância produzida a partir de sistemas biológicos, por exemplo hormônios e outras moléculas secretadas, vírus ou príons. Vale salientar que moléculas sintéticas idênticas ou indistinguíveis de suas contrapartes naturais também estão enquadradas nessa definição;
- por “isolados da natureza” entende-se toda e qualquer matéria extraída e submetida a um processo de isolamento ou purificação, i.e. que retira do contexto natural;
- “genoma” é o conjunto de informações genéticas de uma célula, organismo ou vírus;
- “germoplasma” é o conjunto de material hereditário de uma amostra representativa de indivíduos de uma mesma espécie;
- “processo biológico natural” é qualquer processo biológico que ocorra espontaneamente na natureza e nos quais a intervenção humana não afeta o resultado final;
- “terapia” é um método de tratamento que visa à cura ou profilaxia de uma enfermidade ou funcionamento defeituoso do corpo;

- “cirurgia” é definida pela natureza do tratamento ao invés do seu propósito, ou seja, independe se a intervenção manual ou instrumental no corpo do paciente tem fins estéticos ou terapêuticos;
- “diagnóstico” refere-se à identificação de uma doença particular; e
- “corpo humano ou animal” inclui desde o embrião até as formas adultas, i.e. abrange todas as etapas do desenvolvimento.

4.2 Matérias não consideradas invenção (art. 10 da LPI)

4.2.1 Produtos e processos biológicos naturais (art. 10 (IX) da LPI)

[31] O art. 10 (IX) da LPI, no que se refere a reivindicações da categoria “produto”, estabelece que não é considerado invenção o todo ou parte de seres vivos naturais e materiais biológicos encontrados na natureza, ou ainda que dela isolados, inclusive o genoma ou germoplasma de qualquer ser vivo natural.

[32] Para reivindicações da categoria “processo”, como processos, métodos, usos, aplicações, entre outros, o art. 10 (IX) da LPI refere-se unicamente a processos biológicos naturais, dispondo que esses não são considerados invenção.

[33] Como o art. 10 (IX) da LPI trata de todo ou parte dos seres vivos naturais e materiais biológicos encontrados na natureza que não são considerados invenção, podem ser utilizados documentos publicados posteriormente à data de prioridade/depósito do pedido em análise, para evidenciar que a matéria reivindicada incide nas disposições do art. 10 (IX) da LPI, desde que as informações disponibilizadas comprovem de maneira clara e inequívoca a existência na natureza da matéria reivindicada.

4.2.1.1 Produtos biológicos naturais

[34] O todo ou parte dos seres vivos naturais e materiais biológicos encontrados na natureza – ainda que dela isolados, ou produzidos de forma sintética que possuam correspondentes de ocorrência natural, não havendo como distingui-los dos naturais –, são considerados produtos biológicos naturais, e não serão considerados como invenção, pois incidem no art. 10 (IX) da LPI.

[35] Dessa forma, a inclusão de uma limitação negativa (*disclaimer*) com o termo “não natural” por si só não supera a objeção quanto ao art. 10 (IX) da LPI.

4.2.1.1.1 Composições contendo produto biológico natural

[36] Uma reivindicação de composição cuja única característica seja a presença de um determinado produto confere proteção também para esse produto em si. Dessa forma, uma reivindicação de composição caracterizada tão somente por conter um produto não patenteável (por exemplo, um extrato natural), não pode ser concedida, uma vez que viria a proteger o próprio produto não patenteável. Ou seja, aqui com mais razão do que nos casos de componentes patenteáveis, são necessários na reivindicação parâmetros ou características que determinem sem sombra de dúvida que se trata de uma composição de fato.

[37] Nesses casos um cuidado especial deve ser tomado com relação ao texto da reivindicação no que se refere ao(s) outro(s) componente(s) da composição em questão, de forma a evitar que represente, em última análise, uma mera diluição (uma solução aquosa, por exemplo) do produto não patenteável. Tendo em mente que uma composição tem por finalidade colocar o(s) componente(s) ativo(s) em uma forma adequada ao propósito a que se destina, uma “mera diluição” seria aquela em que o solvente não contribui para esse propósito final, sendo apenas o meio usado para a extração. Assim, é possível que o extrato aquoso ou etéreo de uma determinada planta, por exemplo, embora contenha um componente (solvente de extração) além do próprio extrato, não represente uma composição pronta para ser utilizada em seu objetivo final, e esse mesmo extrato diluído em outro solvente (utilizado para, por exemplo, tornar o ativo absorvível) represente uma composição de fato, e não uma “mera diluição”.

4.2.1.1.2 Extratos

[38] Extratos são materiais biológicos isolados da natureza e, portanto, não são considerados invenção com base no art. 10 (IX) da LPI.

[39] Assim, para composições contendo extratos, valem as mesmas considerações apontadas acima para os produtos naturais.

4.2.1.1.3 Extratos enriquecidos

[40] Extratos diferenciados de seu correspondente natural por estarem enriquecidos em algum de seus componentes somente serão passíveis de proteção quando apresentarem na sua composição características não alcançáveis normalmente pela espécie e que sejam decorrentes de intervenção humana direta.

[41] Atenção deve ser dada também para o caso de extrato de células bacterianas transgênicas. Embora o microrganismo em si possa ser patenteável, nem sempre o seu extrato será, uma vez que podem haver casos nos quais não é possível distinguir o extrato da célula transgênica do extrato da selvagem (por exemplo, o microrganismo transgênico apenas superexpressa uma proteína endógena).

Exemplo 12:

Reivindicação: Extrato vegetal caracterizado por ser enriquecido com isoflavonas.

O extrato é enriquecido em isoflavonas através do método de isolamento. Nesse caso, considera-se que a modificação de tal extrato é resultante do simples fracionamento de um extrato natural isolado da natureza, e tal reivindicação, portanto, incide no art. 10 (IX) da LPI.

Exemplo 13: Extrato enriquecido em virtude de manipulação genética.

Reivindicação: Extrato vegetal enriquecido caracterizado por compreender insulina humana.

O pedido descreve um processo de alteração na composição do extrato de plantas através da expressão do gene da insulina humana, resultando num extrato enriquecido. Nesse caso, considera-se que a modificação de tal extrato é resultante da manipulação genética do organismo do qual ele é extraído. Assim, por ser um material obtido a partir de plantas que apresentam características não alcançáveis normalmente pela espécie, decorrentes de intervenção humana direta, tal extrato é passível de proteção.

4.2.1.2 Processos biológicos naturais

[42] Entende-se por “processo biológico natural” qualquer processo biológico que ocorra espontaneamente na natureza e nos quais a intervenção humana não afeta o resultado final.

[43] Se a intervenção técnica desempenha um papel importante na determinação do resultado, ou se a sua influência é decisiva, o processo é considerado como invenção. Ou seja, os processos que contenham pelo menos uma etapa técnica que possua um impacto decisivo no resultado final, e que não possa ser realizada sem a intervenção humana, são considerados invenção.

[44] Sob esse conceito, o processo clássico de obtenção de plantas ou animais não é invenção. Do mesmo modo, processos que possuam somente etapas que mimetizem eventos que ocorram na natureza, não são considerados invenção. Em contraste, os métodos baseados na engenharia genética (por exemplo, a produção de uma planta transgênica), onde a intervenção técnica é significativa, são passíveis de privilégio.

[45] Os processos microbiológicos englobam os processos que utilizam, se aplicam a, ou resultam em microrganismos. Embora tais processos sejam processos biológicos, o INPI considera que os mesmos são passíveis de concessão por serem uma exceção das exclusões legais permitidas no Acordo TRIPS (art. 27(3b)).

[46] Do mesmo modo, o INPI considera que são passíveis de proteção os processos biológicos ou enzimáticos de obtenção de compostos químicos, que apresentam uma etapa técnica decisiva para o resultado final.

[47] Assim como outros processos, reivindicações de processos biológicos formuladas corretamente definem o material de partida, o produto obtido e o meio de se transformar o primeiro no segundo; as diversas etapas necessárias para se atingir o objetivo proposto; ou no caso de uso, o material a ser usado e o objetivo do uso.

[48] Exemplos de reivindicações adequadas (obs.: o nível de detalhamento necessário dependerá da invenção específica em exame):

- Processo para obtenção do composto X caracterizado por cultivar o microrganismo W (bactéria, fungo, levedura, etc.) sobre Y.
- Processo para obtenção do composto X caracterizado por utilizar a enzima E.

- Processo para obtenção do composto X caracterizado por cultivar células da planta P transformadas pelo gene T.

4.2.1.3 Uso de produtos naturais

[49] Quando o processo reivindicado envolve o *todo ou parte de seres vivos naturais e materiais biológicos encontrados na natureza, inclusive o genoma ou germoplasma*, mas não consiste em um *processo biológico natural*, não há nenhum impedimento para a sua patenteabilidade frente ao que é disposto pelo art. 10 (IX) da LPI. Dessa forma, o uso de um produto natural pode ser passível de proteção, desde que esteja de acordo com os requisitos de patenteabilidade.

Exemplo 14:

Reivindicação: Uso de uma resina natural obtida a partir de folhas da planta *Aloe vera* caracterizado por ser para preparar composições cosméticas para tratamento de fibras queratínicas.

As reivindicações referentes ao uso da resina natural para preparar composições cosméticas podem ser aceitas, observando-se o atendimento aos requisitos de patenteabilidade, uma vez que não há na LPI nenhum artigo contrário ao uso de produtos naturais em atividades que não constituem processos biológicos naturais.

Exemplo 15:

Reivindicação: Uso da RNase caracterizado por ser para clivar o RNA.

Uso do material natural para executar a própria função natural não é considerado invenção segundo o art. 10 (IX) da LPI, por consistir em um processo biológico natural.

4.3 Invenções não patenteáveis (art. 18 da LPI)

4.3.1 Invenções não patenteáveis por incidirem no art. 18 (I) da LPI

[50] Segundo o art. 18 (I) da LPI, não é patenteável “o que for contrário à moral, aos bons costumes e à segurança, à ordem e à saúde públicas”.

[51] Considerando que a biotecnologia é um campo tecnológico gerador de invenções que tratam de matéria que pode levantar questões morais e de ordem pública, a doutrina atual permite que o INPI recuse o patenteamento dessas invenções com base no art. 18 (I) da LPI.

[52] Como exemplos, não exaustivos, temos:

- (a) processos de clonagem do ser humano;
- (b) processos de modificação do genoma humano que ocasionem a modificação da identidade genética de células germinativas humanas; e
- (c) processos envolvendo animais que ocasionem sofrimento aos mesmos sem que nenhum benefício médico substancial para o ser humano ou animal resulte de tais processos.

[53] Em reivindicações com a redação “Processo para clonagem de células de mamífero”, entende-se que o termo “mamífero” inclui seres humanos. Assim, tal reivindicação poderia ser prejudicial à moral, ordem e à saúde públicas, e, portanto, violaria o art. 18 (I) da LPI. Nesse caso, a exclusão dos mamíferos humanos do escopo de proteção seria uma limitação negativa (*disclaimer*) aceitável, mesmo se os seres humanos não estiverem excluídos no relatório descritivo original.

4.3.2 Invenções não patenteáveis por incidirem no art. 18 (III) da LPI

[54] Segundo o art. 18 (III) da LPI, não são patenteáveis “*o todo ou parte dos seres vivos, exceto os microorganismos transgênicos que atendam aos três requisitos de patenteabilidade – novidade, atividade inventiva e aplicação industrial – previstos no art. 8º e que não sejam mera descoberta*”.

[55] Com relação aos microrganismos transgênicos, o parágrafo único do art. 18 (III) da LPI define que “*Para os fins desta Lei, microorganismos transgênicos são organismos, exceto o todo ou parte de plantas ou de animais, que expressem, mediante intervenção humana direta em sua composição genética, uma característica normalmente não alcançável pela espécie em condições naturais*”.

[56] De acordo com essa definição, o termo microrganismo transgênico abrange microrganismos (vide item 5) que são obtidos a partir de qualquer técnica que tenha por consequência a alteração da composição genética, *não alcançável pela espécie*

em condições naturais, por interferência humana direta. Essa definição não se limita aos microrganismos que tiveram inseridos genes exógenos e/ou de outros organismos.

[57] Para o exame de reivindicações de microrganismos transgênicos, inicialmente deve ser verificado se na descrição do pedido o termo “microrganismo” abrange células animais e vegetais, o que não é passível de proteção, já que o todo ou parte de plantas e animais, ainda que transgênicos, não é patenteável. Nesses casos, a matéria reivindicada deve ser limitada de forma a englobar apenas os microrganismos transgênicos passíveis de proteção. Além disso, a intervenção humana deve estar clara para que seja possível avaliar se, de fato, trata-se de um microrganismo que expressa uma característica normalmente não alcançável pela espécie em condições naturais.

[58] Denominações como “transgênico”, “mutante” ou “variante” não são suficientes para aferir a patenteabilidade do microrganismo, já que existe a possibilidade do microrganismo, mesmo dito como sendo “transgênico”, “mutante” ou “variante”, ocorrer de forma natural ou ser indistinguível do natural e, portanto não constituir uma invenção segundo o art. 10 (IX) da LPI.

5 Microrganismos

[59] O termo genérico “microrganismo” é empregado para bactérias, arqueas, fungos, algas unicelulares não classificadas como plantas e protozoários. Dessa forma, dentre o todo ou parte dos seres vivos, naturais ou transgênicos, a LPI permite apenas o patenteamento de microrganismos transgênicos.

Exemplos de formulações adequadas para reivindicações de microrganismos (lista não exaustiva)

- Microrganismo transgênico caracterizado por conter a SEQ ID NO: X.
- Microrganismo transgênico caracterizado por conter a SEQ ID NO: X inserida na posição Y do genoma.
- Microrganismo transgênico caracterizado por conter a sequência xxxxxxxx na posição Y do genoma (vide item 2.2.2).
- Microrganismo transgênico caracterizado por conter o gene X (desde que o gene seja bem conhecido).
- Microrganismo transgênico caracterizado por conter o gene X com o promotor Z inserido na posição Y do genoma (desde que o gene e o promotor sejam bem conhecidos).
- Microrganismo transgênico caracterizado por conter o vetor de expressão X (desde que esse vetor seja bem conhecido).
- Microrganismo transgênico caracterizado por ser o ATCC-XXXX (número de depósito).

[60] Atenção deve ser dada quando a SEQ ID NO: X, o gene X ou o plasmídeo X foram isolados de um microrganismo natural e não modificados. Nesse caso, a reivindicação com o título genérico de “microrganismo” ou “bactéria”, entre outros, irá proteger também o microrganismo original que possui o gene referido naturalmente, e caberá objeção quanto ao disposto no art. 10 (IX) da LPI.

6 Sequências biológicas

[61] De forma geral, em pedidos de patente que descrevam uma invenção cujo desenvolvimento depende de sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos, os seguintes aspectos devem ser observados: (i) necessidade de inclusão da sequência no pedido para fins de suficiência descritiva (art. 24 da LPI); (ii) ocorrência natural (art. 10 (IX) da LPI); (iii) clareza, precisão e fundamentação (art. 25 da LPI) na forma como tais moléculas/sequências são pleiteadas; (iv) novidade (art. 11 da LPI); (v) atividade inventiva (art. 13 da LPI); e (vi) aplicação industrial (art. 15 da LPI).

[62] A suficiência descritiva de sequências biológicas é tema específico do item 2.2.2.

[63] O requisito de novidade, quando relacionado a sequências biológicas, segue o mesmo princípio geral (vide Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente, Bloco II), ou seja, para que uma sequência de aminoácidos ou de nucleotídeos não seja nova frente ao estado da técnica, todos os aminoácidos ou nucleotídeos devem ser exatamente os mesmos e estar na mesma ordem e, em alguns casos adicionalmente possuir a mesma fórmula estrutural da sequência conhecida na técnica.

[64] Os demais pontos em que usualmente são observadas inadequações serão discutidos nos tópicos abaixo.

6.1 Como caracterizar

[65] Uma vez observadas as regras estabelecidas no item 2.2.2 como forma de garantir a clareza e precisão da matéria pleiteada, o quadro reivindicatório deverá se referir às sequências biológicas em questão através da SEQ ID NO: correspondente (vide item 2.2.2).

[66] Ressalta-se que um DNA ou RNA deve ser definido por sua sequência de nucleotídeos, enquanto uma proteína, por sua sequência de aminoácidos, de forma a definir com clareza a matéria objeto de proteção.

[67] Em alguns casos, outras formas de caracterização de sequências biológicas podem ser aceitas:

- a) quando as sequências forem menores que quatro aminoácidos ou dez nucleotídeos, de acordo com a Resolução PR Nº 187/2017, devem ser caracterizadas pela própria sequência;
- b) fórmulas estruturais acompanhadas de sua SEQ ID NO: correspondente;
- c) fórmulas Markush acompanhadas de sua SEQ ID NO: correspondente;
- d) nº de depósito (vide item 2.2.1); ou
- e) pelo seu nome ou designação, quando a sequência biológica já for conhecida no estado da técnica e não for o objeto principal da invenção.

[68] Além disso, sequências degeneradas de um DNA ou RNA definido por uma SEQ ID de nucleotídeos podem ser aceitas, desde que gerem a mesma proteína e que tal proteína seja definida com precisão (vide tipos de redação aceitáveis abaixo). Nessa situação, a SEQ ID de nucleotídeos de referência deve estar revelada no pedido conforme depositado.

[69] De modo geral, os códons preferencialmente utilizados na maioria dos organismos de interesse ou modelo já são bem estabelecidos na técnica (por exemplo *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Glycine max*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* etc.). Assim, não se considera experimentação indevida a determinação de quais seriam as sequências degeneradas para expressão em cada um desses organismos.

[70] Por outro lado, nos casos em que o pedido envolve a determinação dos códons preferenciais em espécies pouco estudadas à época da invenção, ou a otimização da expressão em organismos específicos, a reivindicação de sequências degeneradas não seria aceitável. Entende-se que nessas situações o técnico no assunto não teria como determinar quais sequências utilizar para a expressão da proteína sem incorrer em experimentação indevida.

[71] Convém ressaltar que sequências biológicas não reveladas no pedido conforme depositado não poderão ser incluídas posteriormente (mesmo que tais sequências possam ser deduzidas por um técnico no assunto), por incorrer em acréscimo de matéria cf. art. 32 da LPI. Entretanto, quando a sequência de nucleotídeos ou aminoácidos é conhecida no estado da técnica e, ainda, está

devidamente referenciada no relatório descritivo, a sua apresentação posterior é aceitável (vide também item 2.2.2).

Tipos de redação aceitáveis

- Molécula de ácido nucleico caracterizada pela sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: X.
- Proteína caracterizada pela sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: Y.
- Molécula de ácido nucleico caracterizada pela sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: X, e sequências degeneradas da mesma, que codificam a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: Y.

[72] Além disso, atenção deve ser dada a reivindicações dos tipos a seguir, uma vez que nenhuma delas apresenta clareza (art. 25 da LPI).

- a) Sequência de DNA caracterizada por codificar uma protease.

Nesse tipo de reivindicação o produto encontra-se caracterizado apenas por sua função, o que não é suficiente para definir com clareza a que produto se refere. Por outro lado, se este DNA for caracterizado por sua sequência de nucleotídeos, a definição da função poderia ser aceita, como característica adicional do produto.

- b) Sequência de DNA caracterizada por codificar um polipeptídeo apresentando a sequência de aminoácidos da proteína representada pela SEQ ID NO: 1.

Essa redação define um DNA pela sequência de aminoácidos, o que não é permitido. No entanto, a reivindicação poderia ser alterada de modo a definir o DNA pela sequência de nucleotídeos, podendo ser aceitas suas degenerações, conforme definido no § [68].

- c) Proteína caracterizada por apresentar a atividade Y.

O produto encontra-se caracterizado somente por sua função, o que não permite definir com clareza o escopo. Por outro lado, se a referida proteína for caracterizada por sua sequência de aminoácidos, a definição da função poderia ser aceita, como característica adicional do produto.

- d) Proteína com atividade Y caracterizada por apresentar a seguinte composição em aminoácidos: (percentuais de cada aminoácido presente).

Nesse tipo de reivindicação o produto encontra-se caracterizado por sua função e pelo percentual de aminoácidos, o que também não permite definir com clareza o produto reivindicado. A sequência de aminoácidos é necessária.

- e) Plasmídeo caracterizado por ser o pWn.

Nesse tipo de reivindicação o produto encontra-se caracterizado por uma designação dada pelo próprio inventor, o que não permite definir o produto.

6.1.1 Sequências na forma de Markush

[73] As sequências biológicas podem ser apresentadas na forma de uma fórmula Markush contendo uma ou mais subestruturas variáveis, as quais são acompanhadas de uma lista de definições dessas porções variáveis, como por exemplo:

Peptídeo de Fórmula I

Xaa₁ Xaa₂ His Xaa₄ Pro Gly Ser Phe Ser Asp Glu Gly Asp Trp Leu;

em que

Xaa₁ é His ou Thr;

Xaa₂ é Ala, Gly ou D-Cpa (4-cloro-Phe); e

Xaa₄ é Gln, Asn ou Pro.

[74] Adicionalmente, para Markush de nucleotídeos pode ser utilizado um código padrão para alternativas de bases, que pode ser consultado na Tabela 1 do Anexo da Resolução que dispõe sobre a apresentação de “Listagem de sequências” em meio eletrônico (atualmente INPI/PR Nº 187/2017).

[75] Para maior detalhamento sobre fórmulas Markush, vide as Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente, Bloco II.

[76] Na análise de reivindicações desse tipo, deve-se atentar para os critérios de unidade de invenção específicos para os grupamentos Markush, conforme as

Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente, Bloco I; bem como a possibilidade de ocorrência de alternativas existentes na natureza (vide item 4.2.1).

[77] Em relação à fundamentação de alternativas em uma reivindicação contendo uma fórmula Markush de sequências de aminoácidos, é necessário avaliar (i) as características físico-químicas (polaridade, tamanho, carga, etc.) dos aminoácidos pleiteados para cada posição, frente ao que foi concretizado no relatório descritivo; e (ii) a região em que ocorrem as modificações, visto que em áreas críticas para a função do polipeptídio, mesmo modificações conservativas podem gerar resultados muito diferentes. Assim, como exemplos não exaustivos de substituições de aminoácidos aceitáveis temos: ácido aspártico para ácido glutâmico; asparagina para glutamina; leucina para valina. Como exemplos *não aceitáveis* (sem a devida concretização) temos: leucina para arginina; alanina para triptofano; valina para prolina.

[78] Já em relação à Markush de sequências de nucleotídeos, é necessário avaliar se a sequência é uma sequência codificadora de uma proteína, ou não. No caso de sequências codificadoras, são aceitáveis alternativas que gerem a mesma proteína (vide também § [68]). Caso a sequência pleiteada não seja codificadora, a avaliação das alternativas deve levar em consideração as informações presentes no Relatório Descritivo. Por exemplo, no caso de promotores, uma vez que as semelhanças/diferenças nas características físico-químicas das bases não são suficientes para que um técnico no assunto possa prever quais modificações seriam equivalentes, apenas as sequências concretizadas podem ser aceitas.

6.1.2 Quando é necessário o depósito da listagem de sequências junto ao pedido

[79] A Resolução PR Nº 187/2017 do INPI estabelece em seu art. 2º que quando o pedido de patente contiver uma (ou mais) sequência(s) de nucleotídeos e/ou de aminoácidos, que seja(m) fundamental(is) para a descrição da invenção, esta(s) sequência(s) deverá(ão) ser apresentada(s) em uma listagem de sequências.

[80] Quando a invenção incluir a sequência *per se*, ou seja, quando no quadro reivindicatório houver reivindicações de “proteína”, “polipeptídeo”, “ácido nucleico”, ou qualquer outro termo que designe uma sequência biológica, esta é considerada parte fundamental da invenção, e deve estar relacionada na listagem de sequências (exceto

para sequências menores que quatro aminoácidos ou dez nucleotídeos, cf. definido na Resolução PR Nº 187/2017).

[81] Por outro lado, quando a molécula em questão é apenas um exemplo ilustrativo, tal sequência específica pode não ser considerada parte fundamental da invenção, e portanto, sua sequência não precisa, necessariamente, ser apresentada no pedido.

[82] Além disso, deve-se atentar para a possibilidade de que as demais sequências utilizadas no pedido – e não necessariamente os genes/sequências codificantes – sejam fundamentais para a execução da invenção. Assim, ainda nesses casos, deve-se avaliar se a sequência em questão é amplamente conhecida da técnica, e se sua utilização é fundamental para a execução da invenção.

6.1.3 Da necessidade de restringir reivindicações de processo às sequências depositadas junto ao pedido

[83] Quando a sequência em questão apenas representa uma molécula que é parte de um processo descrito, mas que qualquer outra molécula com mesma função biológica apresentaria o mesmo resultado (ou em situações em que não haja razões para acreditar que tais moléculas não seriam eficazes), o dito método não necessariamente precisa referir-se a uma única SEQ ID NO: X, uma vez que tal medida restringiria desnecessariamente o escopo do método em questão.

Exemplo 16:

O pedido descreve um método de indução de esporulação em bactérias caracterizado pelo fato de que as ditas bactérias são transformadas com um vetor contendo um gene de esporulação sob controle de um promotor qualquer. Os exemplos apresentados no pedido utilizam o gene spo5, entretanto, qualquer gene da família spo permitiria, teoricamente, a obtenção do mesmo resultado. Assim, a princípio, não há razão para se exigir que a sequência específica do gene spo5 seja apresentada na reivindicação de dito método.

Atenção deve ser dada nesses casos ao nome “genérico” dado à sequência de interesse, tal como “gene spo”, como mencionado acima, pois se o depositante utilizar tal denominação nas reivindicações, esta deve ser amplamente conhecida e utilizada na técnica, referindo-se inequivocamente a uma determinada família gênica.

Exemplo 17: Método para induzir a expressão de um dado gene sob determinadas condições específicas.

O relatório descritivo deixa claro que a característica desejada é a expressão gênica em uma determinada condição, a qual só é obtida mediante o uso do promotor X, uma vez que esse promotor é ativado apenas quando o meio atinge as características de interesse (depleção de glicose, por exemplo).

O pedido descreve a utilização de diferentes genes sob o controle desse promotor X, demonstrando que todos eles são expressos apenas nas condições de interesse.

Nesse caso, a única sequência fundamental para que se obtenha a característica desejada é a do promotor X. Assim, da mesma forma que no exemplo anterior, considera-se que a apresentação das sequências dos genes utilizados não é obrigatória; e ainda que o depositante tenha apresentado tais sequências, não se considera necessário que a matéria pleiteada seja restrita a esses genes. Entretanto, a sequência do promotor, que é a invenção, deve estar descrita de forma clara e precisa através de sua SEQ ID NO: correspondente.

6.2 Homologia, identidade e similaridade

[84] Ao se alinhar e comparar sequências nucleotídicas ou proteicas entre si, os termos homologia, identidade e similaridade podem ser empregados. Cabe aqui, inicialmente, fazer a correta distinção entre tais termos.

[85] Duas sequências (de nucleotídeos ou de aminoácidos) são homólogas apenas quando compartilham um mesmo ancestral comum. Desse modo, não existe o conceito de ser “parcialmente homólogo”: duas sequências são homólogas ou não, sendo incorreto falar em percentagem de homologia. As proteínas homólogas geralmente compartilham muitas semelhanças no que diz respeito às suas estruturas tridimensionais. Quando duas sequências são homólogas, geralmente compartilham uma significativa identidade, podendo haver também casos contrários: duas moléculas podem ser homólogas sem que compartilhem de identidade estatisticamente significativa entre suas sequências de aminoácidos ou de nucleotídeos (por exemplo, como é o caso da família das globinas).

[86] O estabelecimento da homologia entre duas sequências não se dá apenas com base na análise da identidade entre estas sequências, mas também em critérios biológicos, tais como análise da estrutura e função das proteínas, por exemplo. Resultados de comparações de sequências através de algoritmos tais como BLAST, FASTA e SSEARCH não avaliam a homologia entre as sequências: eles mensuram a similaridade e a identidade entre sequências. Enquanto a homologia se refere a uma inferência qualitativa, identidade e similaridade são atributos quantitativos.

[87] A identidade entre duas sequências se refere à ocorrência de exatamente os mesmos nucleotídeos ou dos mesmos aminoácidos em uma mesma posição em duas sequências nucleotídicas ou proteicas alinhadas e comparadas entre si. Desse modo, se duas proteínas apresentam 90% de identidade, significa que 90% de todos os resíduos de aminoácidos contidos nas referidas proteínas em posições correspondentes são exatamente iguais.

[88] Por outro lado, a percentagem de similaridade entre duas sequências de proteínas se refere a um cálculo que leva em consideração os *matches* idênticos e similares (por exemplo, os aminoácidos glutamato e aspartato são considerados similares, uma vez que ambos são acídicos). Deve ser observado que a similaridade pode ser medida com base em diferentes definições de quão relacionado (similar) um resíduo de aminoácido é de outro.

[89] Aplicando-se esses termos ao exame dos pedidos de patente, os seguintes tipos de reivindicações não são aceitos:

- a) reivindicação do tipo “proteína (ou sequência de DNA) caracterizada por ser a SEQ ID NO: 1 ou qualquer outra sequência de aminoácido com pelo menos x% de homologia com a SEQ ID NO: 1” não é clara (em desacordo com o art. 25 da LPI), uma vez que, tecnicamente, o termo “% de homologia” não é aplicável, tal como acima salientado; e
- b) reivindicação do tipo “sequência de DNA (ou de proteína) caracterizada por apresentar pelo menos 80% de identidade (ou similaridade) com a SEQ ID NO: 1” não pode ser aceita uma vez que tal como redigida abrange inúmeras sequências diferentes, não especificando, inclusive, em quais locais da sequência de nucleotídeos (ou de aminoácidos) podem ocorrer substituições; portanto, reivindicações desse tipo não podem ser aceitas,

uma vez que a caracterização do objeto de proteção não é clara e precisa, em desacordo com o art. 25 da LPI.

[90] Adicionalmente, a caracterização da sequência de interesse com base na percentagem de identidade é muito abrangente e geralmente inclui em seu escopo sequências não suportadas pelo relatório descritivo ou que não preenchem os requisitos de patenteabilidade. Por último, deve também ser observado que nesses casos, em geral o relatório descritivo não traz as informações suficientes que permitiriam a reprodução de todas as inúmeras sequências abrangidas por tal tipo de definição (em desacordo com o art. 24 da LPI).

6.3 Sequências de nucleotídeos

[91] As sequências de nucleotídeos podem estar referidas em pedidos de patente sob diferentes formas: genes, vetores, plasmídeos, sequência de DNA, sequência de RNA, ácido nucleico, oligonucleotídeos, iniciadores, cDNA, e outros. Entretanto, para fins de simplificação, nestas Diretrizes, todas estas moléculas serão designadas, de forma geral, como “sequências de nucleotídeos”. Tal definição é válida a despeito do tamanho da molécula referida. Nos itens abaixo serão discutidas as particularidades de algumas destas moléculas.

[92] Tais sequências de nucleotídeos devem ser caracterizadas conforme o item 6.1. Entretanto, deve-se ressaltar que as moléculas definidas por uma sequência com menos de dez nucleotídeos devem ser caracterizadas pela própria sequência de nucleotídeos.

6.3.1 Modificação de sequência(s) de nucleotídeos

[93] As modificações nas sequências nucleotídicas com o objetivo de diferenciá-las de sequências naturais podem ser realizadas de diferentes formas. A princípio, qualquer característica introduzida na sequência que não tenha sido descrita como de ocorrência natural é aceitável como modificação para não incidir no art. 10 (IX) da LPI, observando-se o disposto no item 6.3.1.1. Entretanto, a simples introdução de termos como “recombinante” em reivindicações de moléculas naturais não pode ser aceita, uma vez que a molécula resultante seria indistinguível de sua contraparte natural, mesmo que produzida de forma recombinante.

6.3.1.1 Modificação de sequência(s) por substituições, inserções ou deleções de nucleotídeos não modificados

[94] De forma geral, modificações de sequências biológicas naturais através da inserção de nucleotídeos não modificados na sequência (no meio ou nas extremidades) são consideradas suficientes para não incidir no art. 10 (IX) da LPI, desde que a sequência resultante formada também não seja de ocorrência natural.

[95] Caso a deleção de nucleotídeos ocorra no meio da sequência pleiteada, tal modificação é, a princípio, suficiente para diferenciá-la da molécula natural. Entretanto, no caso dos nucleotídeos deletados serem contíguos e estarem na extremidade da sequência, a mesma ainda incide no art. 10 (IX) da LPI, uma vez que a sequência resultante continua sendo idêntica a parte da sequência natural (vide item 6.3.2).

[96] Em relação à substituição de nucleotídeos por outros nucleotídeos não modificados, considera-se que tal modificação é suficiente para não incidir no art. 10 (IX) da LPI, desde que não exista qualquer descrição de sequências naturais (por ex., em espécies relacionadas) contendo tal substituição.

[97] Entretanto, deve-se considerar que diversas substituições de nucleotídeos em uma dada sequência podem não resultar em qualquer modificação na proteína por ela codificada, devido à degeneração do código genético. Assim, nesses casos, uma sequência nucleotídica modificada por substituições poderia não incidir no art. 10 (IX) da LPI, enquanto a sequência de aminoácidos por ela codificada permanece idêntica ao natural, e, portanto, incidindo no art. 10 (IX).

[98] Quando se analisam sequências derivadas do estado da técnica, que não incidem no art. 10 (IX) da LPI, deve-se avaliar cuidadosamente a atividade inventiva da modificação (inserção, deleção ou substituição) realizada, levando-se em conta o fato de que alguns grupos de aminoácidos apresentam propriedades comuns. Assim, a inventividade destas alterações nas sequências polinucleotídicas, em geral, depende da demonstração de um efeito inesperado gerado pela modificação em relação ao estado da técnica.

6.3.1.1.1 SNPs

[99] A sigla SNP refere-se a “single nucleotide polymorphism” ou “polimorfismo de nucleotídeo único”, e é utilizada para designar variações naturais que ocorrem no genoma e que envolvem, conforme o nome indica, um único nucleotídeo. Podem estar associadas a determinadas características, funcionando assim como marcadores moleculares.

[100] Independente da utilidade descrita, sempre que um determinado SNP – ou qualquer outro polimorfismo – estiver descrito como sendo de ocorrência natural, não se pode considerá-lo invenção, segundo o art. 10 (IX) da LPI. Entretanto, o emprego de um conjunto de SNPs, por exemplo, em um método de diagnóstico *in vitro* (como DNA *fingerprinting*) ou no âmbito da medicina personalizada, pode ser passível de proteção patentária.

6.3.1.2 Modificação de sequência(s) de nucleotídeos com derivados modificados (inclusive com grupos protetores)

[101] As inserções de nucleotídeos que não são de ocorrência natural (derivados de nucleotídeos naturais) são também consideradas modificações suficientes para que as sequências não incidam no art. 10 (IX) da LPI. Entretanto, a presença desses nucleotídeos e a lista dos nucleotídeos de interesse devem estar expressas nas reivindicações, de forma a evitar que os nucleotídeos naturais estejam indiretamente incluídos e resultem na sequência biológica natural.

[102] A inclusão de tais nucleotídeos nas sequências apresentadas nos pedidos de patente é abordada na Resolução PR Nº 187/2017 do INPI, citada no item 2.2.2 destas Diretrizes; e uma lista com exemplos de nucleotídeos modificados e as siglas aceitáveis na sua definição está disponível na Tabela 2 do Anexo desta Resolução (publicado no DOU - Seção 1, Nº 68, 10/04/2013).

6.3.2 Fragmentos

[103] Deve-se dispensar especial atenção na análise de reivindicações envolvendo “fragmentos de sequências”, ainda que tais sequências estejam inseridas no pedido. Tal consideração se deve ao fato de que a definição de “fragmentos” de uma dita sequência inclui toda e qualquer subdivisão da sequência apresentada, resultando em

um número indefinido de possíveis fragmentos, que não apresentam qualquer função/relação com a matéria descrita no pedido.

Exemplo 18:

Um pedido apresenta a SEQ ID NO: 1 (hipotética): agctggttcgactgtctcga. A reivindicação refere-se a “ácido nucleico caracterizado por possuir a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1 e fragmentos da mesma”. Da forma como está descrita, tal reivindicação inclui, por exemplo, moléculas como: agct, actg, ctgg, ggtt, ggttc, cgactgt, e uma infinidade de outras, inclusive muitas que não possuem qualquer função descrita/relacionada com a invenção.

Assim, resta claro que a referência a fragmentos de uma dada sequência não pode ser aceita nas reivindicações, uma vez que a matéria pleiteada não se encontra fundamentada e nem definida de forma clara e precisa de acordo com o art. 25 da LPI. Nesses casos, a suficiência descritiva da matéria pode ser questionada de acordo com o art. 24 da LPI.

[104] Por outro lado, se o pedido descreve que fragmentos obtidos a partir de uma determinada sequência são úteis para a finalidade descrita na invenção, tais fragmentos podem ser pleiteados, desde que os fragmentos desejados sejam claramente identificados nas reivindicações (especificando qual a posição dos nucleotídeos inicial e final desse fragmento) e não sejam naturais.

6.3.3 Oligonucleotídeos (ou iniciadores)

[105] Uma vez que representam segmentos de sequências complementares a genes e/ou mRNAs naturais, considera-se que iniciadores são parte de material biológico natural, e portanto, reivindicações que pleiteiam tais iniciadores incidem no art. 10 (IX) da LPI (observe as possíveis exceções no item 6.3.1).

6.3.3.1 Oligonucleotídeos degenerados e modificados

[106] Oligonucleotídeos degenerados consistem, de modo geral, em uma mistura de oligonucleotídeos que pode ser usada para amplificar genes que possuem sequências

similares, mas não idênticas (tal como a amplificação de genes ortólogos em espécies relacionadas), ou mesmo genes desconhecidos.

[107] Atenção deve ser dada à possibilidade de que algum (ou alguns) dos oligonucleotídeos resultantes seja(m) igual(is) a uma sequência biológica natural (por exemplo, à sequência do gene a que ele se destina amplificar), estando nesse caso incidindo no art. 10 (IX) da LPI. Por outro lado, caso apresentem modificações, que resultem em uma sequência de nucleotídeos diferente das que ocorrem na natureza, não incidirão no art. 10 (IX) (vide item 6.3.1).

[108] Além disso, considerando que uma mistura de oligonucleotídeos (por exemplo, oligonucleotídeos degenerados, etc.) pode não estar definida de forma clara e precisa, as reivindicações relativas a essa matéria estarão em desacordo com o art. 25 da LPI. Deve-se atentar também para a descrição desta mistura no relatório descritivo (atendimento ao art. 24 da LPI).

[109] Por outro lado, a fim de definir clara e precisamente a matéria pleiteada, um oligonucleotídeo degenerado pode ser caracterizado com base em uma sequência consenso, e variar apenas em um ou poucos nucleotídeos, pré-definidos. Nestes casos, as reivindicações referentes a estes oligonucleotídeos degenerados devem citar a sequência consenso e as posições dos nucleotídeos variáveis.

6.3.4 Promotores

[110] O promotor é o processador central da regulação de um gene, uma vez que contém os sítios de ligação para as RNA polimerases, responsáveis pela transcrição gênica. Por definição, compreende a região 5' do gene. Os processos que proporcionam a modulação transcrional são extremamente complexos e ocorrem através de uma intrincada rede de interações envolvendo sequências regulatórias (TATA box, CCAAT box etc.) e outros elementos localizados mais distantes do ponto de início da transcrição (sequências acentuadoras e silenciadoras).

[111] Ao contrário das sequências gênicas, que possuem “marcadores” específicos do seu início e término (por exemplo: códon de iniciação, sítio para poliadenilação, etc.), a sequência de um promotor não apresenta tais delimitações. Desse modo, devem ser apresentados dados experimentais comprovando que a sequência de DNA isolada de fato é capaz de levar à expressão de sequências gênicas, ou seja, apresenta a atividade promotora de interesse.

[112] Existem casos intermediários em que a sequência de DNA com potencial como promotor é isolada, sequenciada e analisada por bioinformática para a predição de seus possíveis motivos regulatórios (CCAAT box, TATA box, ilhas CpG, etc.). Tal análise *in silico*, embora de grande valia para estudos preliminares, não é suficiente para demonstrar que a sequência identificada de fato é uma região promotora, sendo necessária validação com ensaios funcionais adequados.

[113] De qualquer maneira, por serem constituídos de sequências de nucleotídeos, promotores devem ser representados por uma SEQ ID NO: X, conforme estabelecido nos itens 2.2.2 e 6.1.2.

Exemplo 19:

Reivindicação: Sequência de DNA caracterizada por ser a SEQ ID NO: 1

A referida sequência foi isolada e apresenta atividade de promotor: tal reivindicação não pode ser aceita por incidir no art. 10 (IX) da LPI.

*Entretanto, nos casos em que a SEQ ID NO: 1 apresente mutações, deleções e/ou inserções, ou seja, torne-se **diferente** da sequência tal como encontrada na natureza, caberá o exame da novidade, atividade inventiva e aplicação industrial da invenção. Deve ser observado que deleções podem resultar em fragmentos que são considerados como parte do material natural, e portanto, também estariam incidindo no art. 10 (IX) (vide itens 6.3.2 e 6.3.3.1).*

Exemplo 20:

Reivindicação: Cassete de expressão caracterizado por compreender a sequência promotora de SEQ ID NO: 1 ligada operacionalmente a um gene de interesse e uma sequência terminadora.

Caso a SEQ ID NO: 1 tenha sido obtida da natureza, mas tenha sido posteriormente modificada (via mutações pontuais, deleções e/ou inserções), a reivindicação acima poderá ser aceita, desde que a matéria seja considerada nova e inventiva. Caso a SEQ ID NO: 1 seja tal como encontrada na natureza, a reivindicação deverá ser reestruturada de modo a especificar melhor o cassete, com a introdução do termo “heterólogo”, deixando claro que não abrange proteção para matéria que incida no art. 10 (IX) da LPI (vide item 6.3.5).

Exemplo 21:

Reivindicação: Cassete de expressão caracterizado por compreender a sequência promotora selecionada do grupo de SEQ ID NO: 1 a 3 ou seus fragmentos e derivados ligada operacionalmente a um gene de interesse e uma sequência terminadora heterólogos.

Esse tipo de reivindicação deverá ser analisado levando em consideração as observações dos exemplos acima. Ademais, no que diz respeito à sequência promotora, esta deverá ser restrita tão somente às sequências para as quais se demonstrou a atividade promotora de interesse. No caso de ter sido demonstrada atividade promotora apenas para a SEQ ID NO: 1, por exemplo, a reivindicação deverá ser limitada a tal sequência; ainda, o termo “ou seus fragmentos e derivados” não pode ser aceito, uma vez que a matéria pleiteada não se encontra fundamentada e nem definida de forma clara e precisa de acordo com o art. 25 da LPI. Nesses casos a suficiência descritiva da matéria pode ser questionada de acordo com o art. 24 da LPI.

6.3.5 Vetores

[114] Um vetor é uma molécula de DNA empregada como um veículo para a transferência de material genético exógeno para outras células. Normalmente, os vetores de DNA apresentam três características: (i) contêm uma origem de replicação, que permite sua replicação independentemente do cromossomo hospedeiro; (ii) contêm um marcador de seleção, que permite que as células contendo o vetor sejam facilmente identificadas; e (iii) apresentam sítios únicos para uma ou mais enzimas de restrição. O vetor de clonagem destina-se à replicação de um inserto em uma célula hospedeira. O vetor de expressão contém um cassete de expressão que permite que o inserto seja expresso na célula alvo de forma induzida ou constitutiva. O cassete de expressão contém sequências regulatórias, tais como sequências promotoras e terminadoras da transcrição.

[115] No que diz respeito à suficiência descritiva conforme o art. 24 da LPI, o examinador deverá analisar a invenção em questão e o nível de detalhamento necessário para a sua reprodução, dependendo, por exemplo, se o vetor é a invenção principal ou uma invenção acessória. Nesse sentido, alguns aspectos devem ser observados no relatório descritivo:

- o desenho representativo do mapa do vetor em questão, assinalando as características essenciais para o seu funcionamento, ou seja, os sítios de clivagem para as enzimas de restrição, as enzimas de restrição apropriadas, o promotor usado, as regiões de repressão, as regiões de terminação, as sequências marcadoras ou sequências que conferem resistência a antibióticos, etc.;
- a sequência a ser clonada e/ou expressa na forma de SEQ ID NO: X deverá estar presente na listagem de sequências, conforme a(s) Resolução(ões) em vigor;
- caso os códons preferenciais para a expressão do inserto em um dado microrganismo sejam essenciais à invenção, os mesmos devem constar na listagem de sequências; e
- os procedimentos e as condições para a manipulação de DNA/RNA, inclusive as enzimas usadas (por exemplo, endonucleases, polimerases, ligases, etc.), os sistemas de clonagem envolvidos, as condições de transfecção/transformação da célula hospedeira, dentre outras técnicas usuais.

[116] Cabe ressaltar que quando não houver uma outra maneira de definir o vetor de forma reproduzível (suficiência descritiva - art. 24 da LPI), o depósito do material biológico deverá ser efetuado (vide item 2.2.1).

[117] Abaixo são descritos exemplos de reivindicações que visam refletir as situações corriqueiras em que os vetores são recombinantes. Em outras palavras, esses exemplos não englobam os vetores naturais encontrados em bactérias, fungos e plantas, especialmente em mitocôndrias e cloroplastos, uma vez que esses não são considerados invenções à luz do art. 10, inciso IX, da LPI.

Exemplo 22: Vetor como invenção principal.

Reivindicação: Vetor caracterizado por consistir no número de depósito XXXX.

A invenção principal se trata de um vetor novo e inventivo, que pode ser empregado para a clonagem e/ou expressão de um gene de interesse. Nesse caso, o vetor pode ser caracterizado em uma reivindicação pelo seu número de depósito

realizado em uma Autoridade Depositária Internacional. Desse modo, o vetor estará definido de forma clara e precisa, conforme o art. 25 da LPI.

Exemplo 23: Vetor como invenção principal.

Reivindicação: Vetor que contém a sequência de origem de replicação, sequência marcadora de seleção e sítios múltiplos de clonagem caracterizado por compreender a SEQ ID NO: X.

Nesse exemplo, a estrutura do vetor é nova e inventiva devido à combinação específica da SEQ ID NO: X com os demais elementos comuns aos vetores, tais como, a sequência de origem de replicação, a sequência marcadora de seleção (para antibióticos, etc.) e os sítios para as enzimas de restrição. Portanto, os elementos essenciais que distinguem esse vetor dos demais do estado da técnica devem ser os únicos elementos caracterizados por suas respectivas SEQ ID NO: X, já que os outros componentes são conhecidos pelo técnico do assunto. Cabe ressaltar que, nesse caso, a SEQ ID NO: X não corresponde ao cassete de expressão.

Exemplo 24: Vetor como invenção inter-relacionada.

Reivindicação: Vetor caracterizado por compreender as sequências definidas pelas SEQ ID NO: X e SEQ ID NO: Y ligadas de modo operativo às sequências promotora e terminadora heterólogas.

A invenção descreve duas sequências gênicas envolvidas no transporte de lisina que foram isoladas de *Corynebacterium glutamicum*. A SEQ ID NO: X codifica a proteína exportadora de lisina (*LysE*), enquanto que a SEQ ID NO: Y codifica a proteína reguladora (*LysG*) de *LysE*. Embora as SEQ ID NO: X e SEQ ID NO: Y sejam endógenas à célula hospedeira *Corynebacterium* e, portanto, naturais, estas são flanqueadas por sequências heterólogas da construção gênica presente no vetor recombinante. Assim sendo, o vetor não incide no disposto no art. 10 (IX) da LPI.

Exemplo 25: Vetor como invenção inter-relacionada.

Reivindicação: Vetor caracterizado por compreender uma construção de DNA consistindo na sequência definida pela SEQ ID NO: X operacionalmente ligada às sequências promotora e terminadora da transcrição.

A invenção se refere a uma sequência gênica nova, que apresenta atividade inventiva e é passível de clonagem/expressão em células hospedeiras adequadas.

Nos casos em que a SEQ ID NO: X seja idêntica àquela encontrada na natureza, deve-se ter o cuidado para que a construção como um todo apresente alguma sequência heteróloga como forma de diferenciá-la da sequência natural. Contudo, se a SEQ ID NO: X for alterada, o termo “heteróloga”, tal como utilizado no exemplo 24, não é necessário.

6.3.6 cDNA

[118] Moléculas de cDNA representam sequências produzidas a partir de RNAs. No caso de cDNAs oriundos de RNA mensageiros (mRNA), se o gene proveniente possui íntrons, o cDNA será diferente do gene que codificou esse mRNA, uma vez que a sequência do cDNA apresentará somente a sequência dos exons. Dessa forma, nesses casos, não se pode considerar que uma molécula de cDNA seja igual a uma molécula natural, e sua patenteabilidade deverá ser avaliada com base nos requisitos de novidade, atividade inventiva e aplicação industrial.

[119] Quando o cDNA se tratar de moléculas produzidas a partir de mRNAs de genes que não possuem íntrons, o dito cDNA terá constituição igual à fita de DNA/gene que serviu de molde para a síntese desse mRNA. Assim, nesses casos, o cDNA não é considerado invenção, segundo o art. 10 (IX) da LPI.

[120] Nos casos de cDNA obtido a partir de outros tipos de RNA (como por exemplo, tRNA, snRNA, rRNA), devem ser verificados se são idênticos ao DNA natural, situação esta em que não seriam considerados invenção, segundo o art.10 (IX).

[121] Além disso, o simples sequenciamento do cDNA sem a associação de uma função para o mesmo não é suficiente para garantir a aplicação industrial (vide item 1.1) e fundamentação da matéria, estando em desacordo com os arts. 15 e 25 da LPI, respectivamente.

6.3.7 ESTs – *expressed sequence tags*

[122] O termo “EST” se refere a uma sequência parcial – ou um fragmento da sequência – obtida a partir de um cDNA (daí o fato de referir-se apenas a sequências expressas).

[123] O simples sequenciamento de uma EST não é suficiente para garantir a aplicação industrial e fundamentação da matéria, estando em desacordo com os arts. 15 e 25 da LPI, respectivamente.

[124] Além disso, de forma a não incidir no art. 10 (IX) da LPI, a análise desta matéria segue os mesmos critérios usados para cDNA; assim, é necessário saber se a referida EST representa um fragmento de sequência de um único exon (caso em que seria considerada parte de material biológico natural), ou se estende-se além do ponto de junção entre dois exons diferentes (caso em que não haveria equivalente natural, e portanto, poderia ser considerada invenção).

[125] Por outro lado, quando se trata de sequências provenientes de genes que não possuem ítrons, qualquer EST é considerada um fragmento de uma sequência biológica natural (vide também item 6.3.2).

6.3.8 ORFs – *open reading frames*

[126] O termo ORF se refere a sequências potencialmente codificantes, em geral obtidas a partir do sequenciamento de DNAs. Além disso, uma ORF possui um códon de iniciação (referente a uma metionina, para a maioria dos organismos) e finaliza com um códon de terminação.

[127] Por ser uma região do genoma, a ORF é tida como um produto natural, não sendo considerada invenção segundo o art. 10 (IX) da LPI.

[128] Uma ORF representa um candidato a uma região codificante de um genoma, que não necessariamente resulta em um produto gênico funcional. Assim, no caso de uma reivindicação do tipo “vetor caracterizado por compreender a ORF presente na SEQ ID NO: 1” deve-se avaliar a demonstração da funcionalidade do produto obtido a partir da expressão desta ORF, para atendimento do requisito de aplicação industrial (art. 15 da LPI), bem como a clareza e precisão da matéria pleiteada (art. 25 da LPI).

6.3.9 RNAs

[129] RNAs codificados por genes naturais são também moléculas biológicas naturais, e portanto, não são considerados invenção segundo o art. 10 (IX) da LPI.

[130] Por outro lado, caso sejam produto da expressão de genes quiméricos (tais como genes construídos para expressar proteínas de fusão e/ou outros de existência não encontrada na natureza), tais moléculas de RNA não podem ser consideradas material biológico natural.

6.4 Sequências de aminoácidos

[131] Para fins de definição considera-se que, na análise de pedidos de patente, “proteínas”, “peptídeos” e “polipeptídeos” devem ser definidos em função de sua sequência linear de aminoácidos (estrutura primária), independentemente de seu tamanho (número total de resíduos de aminoácidos de acordo com a Resolução PR Nº 187/2017). Portanto, a citação de qualquer um desses termos (“proteínas”, “peptídeos” ou “polipeptídeos”) nestas Diretrizes referir-se-á, de forma geral, a “sequência de aminoácidos” ou “sequência proteica”.

6.4.1 Como caracterizar sequências de aminoácidos

[132] Conforme apontado acima, uma vez observadas as regras estabelecidas nos itens 2.2.2 e 6.1, como forma de garantir a **clareza e precisão** da matéria pleiteada, o quadro reivindicatório deverá se referir às proteínas em questão através da SEQ ID NO: correspondente e em alguns casos, adicionalmente, por sua fórmula estrutural. Já as sequências com até 03 (três) resíduos de aminoácidos devem ser representadas ao longo de todo o pedido apenas pela sua sequência.

Exemplo 26: Reivindicações aceitáveis para sequências de aminoácidos (desde que estas sequências não sejam de ocorrência natural).

Reivindicação: Proteína X caracterizada por compreender a sequência de aminoácidos como definida na SEQ ID NO: 1.

Reivindicação: Polipeptídeo caracterizado por consistir na sequência de aminoácidos como definida na SEQ ID NO: 1.

Reivindicação: Proteína X caracterizada por consistir da sequência SEQ ID NO: 1.

Exemplo 27: Reivindicação não aceitável para sequências de aminoácidos.

Reivindicação: Proteína caracterizada por consistir na sequência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 2 (sequência de nucleotídeos).

Para atender o disposto no art.25 da LPI, uma proteína deve ser definida por sua sequência de aminoácidos correspondente (vide § [66]). A reivindicação poderia ser alterada de modo a definir a proteína pela sequência de aminoácidos, desde que tenha sido revelada no pedido conforme depositado (vide § [71])

[133] Dessa forma, não será aceita nas reivindicações a caracterização de sequências proteicas apenas através de suas propriedades, tais como estrutura tridimensional, função ou atividade biológica, nome, propriedades químicas (PI, peso molecular, composição de aminoácidos, etc.), uma vez que a única maneira de definir de forma inequivocamente clara e precisa uma sequência de aminoácidos é através da própria sequência.

[134] Além disso, atenção deve ser dada ao item 6.2 destas Diretrizes, que trata da reivindicação de sequências biológicas através de percentagens de identidade e/ou similaridade a uma sequência de referência.

[135] Deve-se ter em mente ainda que o emprego dos termos *consiste* ou *compreende* resulta em diferenças no escopo da reivindicação (vide as Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente, Bloco I).

Exemplo 28:

O relatório do pedido descreve uma proteína mutada (*não natural*) caracterizada por consistir na SEQ ID NO: W. Nesse caso, não seria possível aceitar uma reivindicação genérica que pleiteasse proteção para uma proteína mutada (*não natural*) caracterizada por compreender a SEQ ID NO: W, pois isso implicaria na possibilidade de haver qualquer extensão nas regiões carboxi e/ou amino terminal da proteína que pudesse acarretar alterações na estrutura tridimensional da mesma e/ou alterações de função. Portanto, não seria possível afirmar que qualquer proteína que compreende a SEQ ID NO: W funcionaria de forma semelhante à proteína que consiste na SEQ ID NO: W, devendo tal pleito ser objetado por ausência de suficiência descritiva e de fundamentação no relatório descritivo (arts. 24 e 25 da LPI). Ainda que o relatório descritivo revele algumas possíveis extensões na sequência de

aminoácidos da proteína, tais exemplos não seriam suficientes para fundamentar que qualquer extensão alcançaria o mesmo resultado.

6.4.2 Proteínas homólogas (parálogos e ortólogos)

[136] Proteínas homólogas são proteínas que derivam de um “ancestral evolutivo comum”. Podem estar presentes numa mesma espécie, tendo derivado por duplicação gênica, originando o que se denomina parálogos (proteínas equivalentes – com ou sem alterações de sequência produzidas ao longo da evolução – presentes em uma mesma espécie). Por outro lado, podem estar presentes em espécies diferentes e que possuem um ancestral comum; nesse caso, tais proteínas são chamadas ortólogas.

[137] Tais definições são importantes para avaliação da atividade inventiva de pedidos que descrevem e pleiteiam proteínas semelhantes a proteínas cuja função já é conhecida, diferindo apenas em relação aos organismos das quais a proteína é oriunda.

Exemplo 29:

Um pedido de patente descreve a proteína B, isolada de uma determinada espécie. Essa proteína B apresenta sequência e atividade muito semelhante a uma outra proteína, denominada A, previamente descrita no estado da técnica para uma espécie diferente (A e B são, portanto, proteínas ortólogas). Nesses casos, considera-se que o simples fato da proteína B ser isolada de um organismo diferente não necessariamente a torna inventiva frente à proteína A. Assim, na avaliação da atividade inventiva pode-se considerar se a proteína B apresenta alguma característica inesperada frente a sua ortóloga A. Ainda assim, nesse caso, a proteína B em si não seria considerada invenção segundo o art. 10 (IX) da LPI.

[138] Além disso, quando os pedidos envolverem “variantes” ou “modificações” de proteínas naturais, atenção deve ser dada quanto à incidência no art. 10 (IX) da LPI, uma vez que tais “modificações” podem resultar em outra molécula biológica comprovadamente natural, oriunda apenas de uma espécie diferente daquela descrita no pedido.

Exemplo 30:

Um pedido descreve modificações em uma proteína bovina de forma a torná-la adequada para um determinado uso, e pleiteia a própria proteína modificada. Entretanto, a proteína resultante das alterações introduzidas, por exemplo, substituições, resulta numa sequência igual à da versão canina de tal proteína, já conhecida. Nesse caso, ainda que não seja igual ao equivalente natural do organismo em que foi obtida, a proteína pleiteada é igual a uma proteína ortóloga – natural de outra espécie –, e, consequentemente, também incide no art. 10 (IX) da LPI.

6.4.3 Fragmentos proteicos

[139] Um fragmento proteico, da mesma forma que uma proteína, deve ser caracterizado pelo menos por sua sequência de aminoácidos (vide item 6.4.1). Dessa forma, quando um fragmento proteico é reivindicado, e caracterizado apenas pela sua sequência linear, o examinador deve realizar a busca pela sequência de aminoácidos caracterizante. Caso a sequência seja encontrada no estado da técnica como parte de uma proteína ou peptídeo de origem natural, a matéria reivindicada incidirá no art. 10 (IX) da LPI, por constituir parte de seres vivos naturais e/ou materiais biológicos encontrados na natureza.

[140] Quando um peptídeo contendo poucos aminoácidos é reivindicado, é provável que seja encontrado em alguma proteína na natureza, mesmo sem função conhecida na proteína ou ainda que em um contexto diferente da matéria apresentada no pedido em exame. Ainda assim, a matéria reivindicada incide no disposto no art. 10 (IX) da LPI, já que não é feita nenhuma delimitação na LPI com relação a um tamanho mínimo para um fragmento constituir parte de um material biológico natural. Sendo assim, não deve ser considerada como invenção qualquer parte de seres vivos naturais e materiais biológicos (i.e. fragmentos) encontrados na natureza.

[141] É possível que um fragmento reivindicado seja idêntico a uma parte da molécula inteira encontrada na natureza. Nesses casos, mesmo quando o fragmento reivindicado apresentar atividade, função, ou propriedades químicas inovadoras para o estado da técnica, por constituir parte de um ser vivo natural ou um material biológico encontrado na natureza, não se trata de uma invenção segundo o art. 10 (IX) da LPI, não cabendo nenhum tipo de análise acerca da sua novidade e atividade inventiva.

[142] É importante observar que a presença ou inclusão do termo “recombinante” na reivindicação de moléculas naturais não pode ser aceita, uma vez que a molécula resultante seria indistinguível de sua contraparte natural, mesmo que produzida de forma recombinante.

[143] Sendo assim, está claro que qualquer porção de uma proteína encontrada na natureza, independente do número de aminoácidos, deve ser considerada parte de seres vivos naturais e materiais biológicos encontrados na natureza e, portanto, não considerada invenção segundo o art. 10 (IX) da LPI.

Exemplo 31:

Reivindicação: Peptídeo caracterizado pela sequência Ile-Leu-Arg.

É reivindicada a proteção para um peptídeo biologicamente ativo, obtido sinteticamente, com propriedades imuno-regulatórias, composto por três aminoácidos. Após a busca, foi evidenciado que a sequência está contida em diversas proteínas naturais. É argumentado no pedido que o peptídeo pode se diferenciar do polipeptídeo natural em diversos aspectos como enovelamento, conformação espacial, agregação e propriedades físico-químicas.

Apesar de existirem diferenças nas propriedades físico-químicas da molécula reivindicada com relação a polipeptídeos naturais que compreendem a mesma sequência, o peptídeo reivindicado apresenta uma sequência de aminoácidos encontrada na natureza, e por isso a matéria não é considerada invenção segundo o art. 10 (IX) da LPI.

Exemplo 32:

Reivindicação: Proteína caracterizada por apresentar a SEQ ID NO: 1 em que as posições 1 a 6 foram deletadas.

Uma citocina de 76 aminoácidos quando truncada no sexto aminoácido amino-terminal passa a exibir atividade antagônica da citocina inteira e dessa forma pode ser usada para fabricar medicamentos para tratar doenças em que seja necessário um antagonista da citocina.

Apesar da interferência humana ter resultado em uma atividade inovadora, tal fato se deu apenas pela deleção de parte da molécula, mantendo a sequência obtida idêntica à sequência dos aminoácidos 6-76 encontrada na molécula inteira natural 1-

76. Segundo o art. 10 (IX) da LPI, tal análogo não é considerado uma invenção por tratar-se de parte da molécula natural, e por isso não é patenteável.

6.4.4 Modificações na sequência

[144] As modificações nas sequências proteicas a fim de diferenciá-las de sequências naturais podem ser realizadas de diferentes formas. A princípio, qualquer característica introduzida na sequência que não tenha sido descrita como de ocorrência natural é aceitável como modificação de forma a não incidir no art. 10 (IX) da LPI.

6.4.4.1 Com aminoácidos naturais (substituições, inserções ou deleções)

[145] Conforme apontado acima para modificações de forma geral, as modificações de sequências biológicas através da inserção de L-aminoácidos naturais na sequência (no meio ou nas extremidades) são consideradas suficientes para não incidir no art. 10 (IX) da LPI, desde que a sequência resultante formada também não seja de ocorrência natural.

[146] Para a deleção de aminoácidos, a posição do aminoácido deletado resulta em diferentes situações a serem consideradas. Caso esse se localize na parte central da sequência da proteína, tal modificação é, a princípio, suficiente para diferenciá-la da molécula natural. Entretanto, no caso dos aminoácidos deletados serem contíguos e estarem na extremidade da sequência, a mesma ainda incide no art. 10 (IX) da LPI, uma vez que a sequência resultante continua sendo idêntica a parte da sequência natural (vide exemplo 32).

[147] Em relação à substituição de aminoácidos por outros aminoácidos naturais, considera-se que tal modificação é suficiente para que a sequência não incida no art. 10 (IX) da LPI, desde que não exista qualquer descrição de proteínas naturais em espécies relacionadas contendo tal substituição (vide item 6.4.2 sobre proteínas ortólogas).

[148] Quando se analisam proteínas já descritas no estado da técnica, deve-se avaliar cuidadosamente a atividade inventiva da modificação (inserção, deleção ou substituição) realizada, levando-se em conta o fato de que alguns grupos de aminoácidos apresentam propriedades comuns. Assim, a inventividade destas

alterações na sequência proteica, em geral, depende da demonstração de um efeito inesperado gerado pela modificação em relação ao estado da técnica.

6.4.4.2 Com aminoácidos não naturais (inclusive com grupos protetores)

[149] As inserções de aminoácidos que não são de ocorrência natural (derivados de aminoácidos naturais) são também consideradas modificações suficientes para que as sequências proteicas não incidam no art. 10 (IX) da LPI. Entretanto, para fins de clareza e precisão, ditos aminoácidos devem estar apropriadamente identificados nas reivindicações, de forma a evitar que os aminoácidos naturais estejam indiretamente incluídos, e dessa forma, resultem na sequência biológica natural.

[150] A inclusão de tais aminoácidos nas sequências apresentadas nos pedidos de patente também é abordada na Resolução PR Nº 187/2017 do INPI, citada no item 2.2.2 destas Diretrizes; e uma lista com exemplos de aminoácidos não naturais e as siglas aceitáveis na sua definição está disponível na Tabela 4 do Anexo desta Resolução.

6.4.4.3 Grupamentos adicionados ao carboxi ou amino terminal

[151] Uma sequência proteica pode ser ainda alterada através da ligação de grupamentos químicos às suas extremidades, tendo esses a finalidade de permitir sua ancoragem a determinada superfície ou estrutura, aumento da atividade proteica, modulação da biodisponibilidade e/ou meia-vida circulante, etc.

[152] Mais uma vez, atenção deve ser dada à forma como tal molécula é reivindicada, a fim de garantir a presença do grupamento químico na dita molécula, uma vez que esse grupamento é que irá diferenciá-la de seu equivalente natural. Fmoc, t-boc, outros grupamentos químicos, grupos prostéticos, lipídeos, carboidratos, ferro, cálcio, heme, são exemplos de grupamentos que quando adicionados às proteínas podem eventualmente diferenciá-las das naturais.

6.4.5 Proteínas de fusão

[153] Por definição, são proteínas criadas pela união (fusão) de partes de duas ou mais sequências proteicas diferentes. Dessa forma, uma proteína de fusão envolvida

em um pedido de patente é formada por pelo menos uma porção “funcional”, responsável pela propriedade relacionada à invenção.

[154] Assim, para fins de definição de acordo com o art. 25 da LPI, é importante ressaltar que, numa proteína de fusão, todas as porções funcionais que constituem a proteína final devem estar descritas no pedido.

6.4.5.1 De ocorrência natural

[155] Casos raros de proteínas de fusão naturalmente expressas são observados em alguns tipos de câncer, devido à translocação cromossomal, que pode levar à fusão de diferentes genes, por exemplo: proteínas de fusão gag-onc, Bcr-abl, e Tpr-met.

[156] Uma vez que fique comprovada a ocorrência de uma estrutura natural idêntica, observando o disposto no item 4.2.1 (por exemplo, Bcr-abl, com a porção 1-50 de Bcr fusionada à porção 13-78 de abl), tais proteínas não poderão ser consideradas invenção segundo o art. 10 (IX) da LPI.

6.4.5.2 Como caracterizar

[157] De forma geral, na definição das proteínas de fusão valem as regras definidas para outras sequências proteicas quaisquer (vide item 6.4.1). Assim, não são aceitas referências a percentagens de homologia/similaridade/identidade, e as proteínas devem ser referidas através de pelo menos uma de suas sequências de aminoácidos ou da SEQ ID NO: correspondente à porção funcional.

6.4.5.3 Seq ID integral

[158] Quando a sequência polipeptídica descrita no pedido de patente é pleiteada na forma de proteína de fusão, esta deve sempre ser referida através de pelo menos sua sequência de aminoácidos ou da SEQ ID NO: correspondente, de forma a definir clara e precisamente a matéria pleiteada relacionada à invenção.

[159] Quando diversos peptídeos estão relacionados à propriedade descrita na invenção, e todos estão presentes na proteína de fusão pleiteada, todos esses

peptídeos devem ser referidos através de pelo menos sua sequência de aminoácidos ou da SEQ ID NO: correspondente.

[160] Especial atenção deve ser dada aos casos em que a proteína de “fusão” é na verdade formada por fragmentos de uma mesma proteína de ocorrência natural: de acordo com a forma como é pleiteada, a proteína final produzida (proteína de fusão) pode resultar igual à molécula natural.

Exemplo 33:

Reivindicação: Proteína de fusão caracterizada pelo fato de que compreende:

- a) um primeiro polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácidos 41-56 da SEQ ID NO: 2;
- b) um primeiro espaçador de 6-27 aminoácidos;
- c) um segundo polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácidos 69-84 da SEQ ID NO: 2;
- d) um segundo espaçador de 5-11 aminoácidos; e
- e) um terceiro polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácidos 92-105 da SEQ ID NO: 2.

Nesta reivindicação, como não são definidos quais são os espaçadores de interesse, sendo mencionadas faixas compatíveis com o intervalo entre as sequências definidas, a proteína de “fusão” resultante engloba em seu escopo a própria proteína cuja sequência está descrita na SEQ ID NO: 2, que é de ocorrência natural, incidindo no art. 10 (IX) da LPI.

6.4.5.4 Definição de apenas uma das sequências presentes na proteína da fusão

[161] Quando a proteína de interesse é fusionada a um outro polipeptídeo que irá apenas funcionar como “etiqueta/repórter”, o dito repórter pode ser definido através de sua sequência de aminoácidos ou da SEQ ID NO: correspondente, conforme estabelecido anteriormente para quaisquer polipeptídeos. Entretanto, uma vez que tal polipeptídeo “repórter” seja amplamente conhecido da técnica, opcionalmente a referência a ele pode ser feita apenas através de sua sigla, por exemplo, a moléculas tais como GFP (proteína verde fluorescente), GST (glutationa S-transferase), CAT, c-Myc, FLAG, dentre outros.

[162] Eventualmente, um pedido pode apresentar o tipo de situação em que a característica inventiva da proteína de fusão está unicamente na presença da proteína descrita no pedido – que pode ser, inclusive, a porção repórter – e esta pode ser fusionada a diversas outras.

Exemplo 34:

O pedido descreve um polipeptídeo X que, isoladamente, não possui nenhuma atividade surpreendente, mas que é capaz de aumentar a resposta imunológica de抗ígenos a ele fusionados. No quadro reivindicatório, é pleiteada uma “proteína de fusão caracterizada por consistir na proteína X (definida pela SEQ ID NO: correspondente) ligada a um抗ígeno”.

Nesse caso, deve-se atentar para a clareza e precisão da forma como a proteína de fusão é pleiteada, uma vez que o抗ígeno a ela fusionado não é definido na reivindicação, e a decisão a ser tomada deverá considerar as informações disponíveis no relatório descritivo.

Situação 1: o relatório descritivo apresenta exemplos da proteína X fusionada com diversos抗ígenos diferentes, não relacionados, e demonstra a eficácia indiscutível de todas as proteínas resultantes para o objetivo proposto, não havendo portanto nenhum indicativo de que um outro抗ígeno não funcionaria da mesma forma. Nesse caso, não é necessário exigir que o pedido liste todos os抗ígenos possíveis de se utilizar na proteína de fusão, e considera-se que a reivindicação conforme redigida acima é aceitável.

Situação 2: o pedido apresenta exemplos da proteína X fusionada com diversos抗ígenos diferentes, não relacionados, mas os resultados demonstrados não apresentam consistência, evidenciando que a proteína de fusão é eficaz para alguns抗ígenos e não para outros. Nesse caso, o próprio pedido não oferece suficiência descritiva e fundamentação de acordo com os arts. 24 e 25 da LPI para sustentar que a proteína de fusão funcione com qualquer抗ígeno (pode incluir抗ígenos para os quais não há evidências de que funcionem conforme descrito). Portanto, o quadro reivindicatório deve limitar-se à matéria descrita e fundamentada no pedido de acordo com os arts. 24 e 25 da LPI, ou seja, deve-se especificar nas reivindicações quais são os抗ígenos de interesse presentes na proteína de fusão pleiteada.

6.4.6 Anticorpos

[163] Anticorpos são proteínas plasmáticas que se ligam especificamente a substâncias conhecidas como抗ígenos, e incluem os policlonais e monoclonais; portanto, devem ser analisados como proteínas, inclusive quanto ao disposto no art. 10 (IX) da LPI (vide item 6.4 e seus subitens).

[164] Caso a busca determine que a sequência do anticorpo já existe na natureza, o anticorpo será considerado natural e, portanto, incidirá no art. 10 (IX) da LPI (vide também item 4.2.1). Além disso, se o pedido descreve claramente que o anticorpo foi obtido a partir de um organismo naturalmente exposto ao抗ígeno, o anticorpo também é considerado natural, incidindo no art. 10 (IX) da LPI.

[165] No entanto, em muitos casos o anticorpo não existiria sem uma intervenção humana significativa, já que dependeria da exposição ao抗ígeno de forma controlada e repetida, incluindo o uso de adjuvantes, para garantir a ativação de células específicas para a resposta humorada. Desse modo, tal anticorpo e seu processo de obtenção não são considerados naturais, dado o entendimento que a intervenção humana é decisiva para o resultado final. Cabe ressaltar que a forma de definir o anticorpo deve ser por meio de sua SEQ ID ou do depósito de material biológico.

[166] Anticorpos policlonais são derivados de diferentes linhagens de células B. Eles são uma mistura de moléculas de imunoglobulinas secretadas contra um抗ígeno específico, cada uma reconhecendo um epítopo diferente. Assim, uma vez que compreendem uma mistura indeterminada de anticorpos, considera-se que os mesmos apresentam problema de clareza e precisão na definição de suas características (art. 25 da LPI). Além disso, por mais que o processo de obtenção desses anticorpos seja detalhadamente descrito, um técnico no assunto que execute tal método não chegaria ao mesmo produto final, o que acarreta em falta de reproduzibilidade/suficiência descritiva dos anticorpos policlonais (art. 24 da LPI).

[167] Por outro lado, com relação às reivindicações de processo de obtenção de anticorpos policlonais, é possível que um técnico no assunto reproduza a invenção, desde que as etapas do referido método estejam suficientemente descritas no pedido (art. 24 da LPI). Adicionalmente, deve-se atentar que a definição das etapas também é importante para que a matéria não incida no art. 10 (IX) da LPI (vide item 4.2.1.2). Atenção deve ser dada também a possível incidência no art. 10 (VIII) da LPI (p.ex. método para imunização/vacinação).

[168] Anticorpos monoclonais são anticorpos específicos para um único epítopo de um antígeno. Através da intervenção humana, um anticorpo monoclonal pode ser obtido por meio de diferentes técnicas, tais como hibridoma (vide item 6.4.6.1) ou técnicas de engenharia genética. Dentre essas técnicas, inclui-se a seleção de células B individualizadas (p. ex. por meio de citometria de fluxo – FACS) com subsequente clonagem das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas.

Exemplo 35: Redação de reivindicações de anticorpos passíveis de proteção.

Reivindicação: Anticorpo monoclonal contra a proteína X caracterizado pelo fato de que é produzido pelo hibridoma HHH, depositado sob o número YYYY.

Reivindicação: Anticorpo caracterizado por compreender as regiões determinantes de complementaridade (CDR1; CDR2; CDR3) que consistem das SEQ ID NO: X, SEQ ID NO: Y e SEQ ID NO: Z na cadeia leve e SEQ ID NO: A, SEQ ID NO: B e SEQ ID NO: C na cadeia pesada e regiões constantes da cadeia γ humana.

No exame desse tipo de reivindicação, devem ser observadas as questões relativas ao art. 10 (IX) da LPI mencionadas acima (vide § [164]).

Exemplo 36: Reivindicações de anticorpos não aceitáveis.

- a) Reivindicação: Anticorpos caracterizados pelo fato de que são específicos para a proteína X.
- b) Reivindicação: Anticorpo monoclonal humano caracterizado pelo fato de que reconhece a proteína X e que possui uma afinidade de 2×10^{-9} M.
- c) Reivindicação: Anticorpo monoclonal e seus fragmentos caracterizado pelo fato de que é capaz de se ligar à proteína X.
- d) Reivindicação: Anticorpo monoclonal caracterizado por compreender a região determinante de complementaridade (CDR3) que consiste da SEQ ID NO: X na cadeia leve e SEQ ID NO: A na cadeia pesada e regiões constantes da cadeia γ humana.

Por não definirem clara e precisamente os anticorpos e/ou fragmentos que estão sendo pleiteados, estas reivindicações não podem ser aceitas por infringirem o art. 25 da LPI. No caso da redação no item d) acima, é necessário definir pelo menos as sequências dos 3 (três) CDRs das cadeias presentes, para definir de maneira clara e precisa o dito anticorpo.

6.4.6.1 Hibridomas

[169] Os hibridomas são resultantes de uma fusão de dois tipos celulares, um mieloma com um linfócito B, e produzem anticorpos. Apresentam características não alcançáveis por tais tipos celulares em condições naturais, sendo produto da intervenção humana direta. Conforme o entendimento adotado por esse Instituto, do ponto de vista técnico, um hibridoma é considerado um microrganismo transgênico, e dessa forma, tal matéria é patenteável por não incidir nos arts. 10 e 18 da LPI.

[170] Ao mesmo tempo, por se tratar de um material biológico essencial à realização prática do objeto do pedido de patente, e não poder ser caracterizado de forma clara e precisa no relatório descritivo, para que se atenda ao parágrafo único do art. 24 da LPI, é essencial o depósito do hibridoma até a data do depósito do pedido de patente ou da sua prioridade, e a apresentação do número do depósito no pedido de patente (ver item 2.2.1).

6.4.6.2 Anticorpos obtidos por engenharia genética

[171] Os anticorpos monoclonais de camundongos, coelhos, etc., quando usados como agentes terapêuticos em humanos, podem ser reconhecidos como proteínas estranhas pelo sistema imune do hospedeiro humano. Assim, o advento de anticorpos quiméricos, humanizados e “totalmente humanos” são mecanismos utilizados para minimizar esse obstáculo terapêutico.

[172] Os anticorpos quiméricos são compreendidos por porções Fc humana e Fab não humana. Já os anticorpos humanizados possuem apenas a porção variável do fragmento Fab não humano. Em ambos, as sequências das porções Fc e Fab são clonadas em um vetor de expressão para posterior cultivo da célula hospedeira transfetada e subsequentes etapas de purificação.

[173] Os anticorpos monoclonais denominados “totalmente humanos” são anticorpos obtidos pela recombinação de genes humanos de imunoglobulinas. Tais anticorpos são, atualmente, obtidos por duas categorias de técnicas: bibliotecas de anticorpos recombinantes montadas *in vitro* e camundongos transgênicos.

[174] No método de bibliotecas recombinantes, genes humanos para imunoglobulinas são recombinados *in vitro* e expressos em fagos (técnica de *phage display*), leveduras, dentre outros, de forma a expressar a região variável do anticorpo

em sua superfície. A partir destas bibliotecas, o fenótipo expresso na superfície pode ser utilizado para seleção do clone recombinante que possui o genótipo de interesse.

[175] No método utilizando camundongos transgênicos, camundongos compreendendo sequências de genes de imunoglobulina de linhagem germinal humana são imunizados para produção de anticorpos, e os anticorpos monoclonais são obtidos pelos métodos convencionais (hibridoma ou isolamento por FACS, seguido de sequenciamento e expressão recombinante).

[176] Embora os anticorpos monoclonais denominados “totalmente humanos” (vide § [173]) possam ser potencialmente gerados na natureza, a produção destes depende da exposição do ser humano ao antígeno de forma controlada e repetida, incluindo o uso de adjuvantes, para garantir a ativação de células específicas para a resposta humoral contra o antígeno. Assim, conforme discutido no item 6.4.6 acima, tais anticorpos não serão considerados naturais, a menos que sua sequência comprovadamente já exista na natureza (vide item 4.2.1).

[177] Além dos anticorpos químéricos/humanizados/“totalmente humanos”, outras tecnologias vêm sendo empregadas. Estas incluem anticorpos bi-específicos, anticorpos de cadeia única, anticorpos PEGuilados, anticorpos com padrões de glicosilação ou porção Fc alterados, anticorpos derivados de camelídeos (nanocorpos), anticorpos fusionados com fármacos ou com outras proteínas, entre outros. Tais matérias podem ser passíveis de proteção desde que estejam de acordo com os requisitos de patenteabilidade.

Exemplo 37: Redação de reivindicações de anticorpos passíveis de proteção.

Reivindicação: Anticorpo humanizado contra α -actina caracterizado por compreender a região murina variável que consiste da SEQ ID NO: X e regiões constantes da cadeia γ humana.

Reivindicação: Anticorpo humanizado contra α -actina caracterizado por compreender as regiões murinas determinantes de complementaridade (CDR1; CDR2; CDR3) que consistem das SEQ ID NO: X, SEQ ID NO: Y e SEQ ID NO: Z na cadeia leve e SEQ ID NO: A, SEQ ID NO: B e SEQ ID NO: C na cadeia pesada e regiões constantes da cadeia γ humana.

6.4.6.3 Fragmentos de anticorpos

[178] A molécula de anticorpo pode ser clivada gerando diferentes fragmentos com funções distintas. Os fragmentos em si, caso originados de anticorpos encontrados na natureza, ou que façam parte de outras proteínas naturais, não são privilegiáveis em função do art. 10 (IX) da LPI (vide item 6.4.3).

[179] Cabe ressaltar que os fragmentos derivados de anticorpos não encontrados na natureza podem, mesmo assim, ser considerados naturais caso contenham apenas as porções constantes (Fc) do anticorpo de origem. Em última análise, tais fragmentos são idênticos às porções constantes de outros anticorpos naturais.

[180] Modificações de fragmentos de anticorpos também podem constituir matéria passível de proteção, como no caso dos fragmentos variáveis de cadeia única (ScFv). Os fragmentos Fv não são covalentemente ligados, dessa forma os heterodímeros dos domínios V_H e V_L podem dissociar facilmente. No entanto, fragmentos Fv podem ser construídos de forma a não se dissociarem, ou seja, os domínios V_H e V_L podem ser unidos por um conector, criando um fragmento Fv de cadeia única. Essa construção, apesar de ser um fragmento de anticorpo, não incide no art. 10 (IX) da LPI, pois esses fragmentos não são encontrados na natureza unidos pelo conector.

7 Animais, plantas, suas partes e processos de obtenção

7.1 Animais, plantas e suas partes

[181] Se forem naturais ou isolados não são considerados como invenção, segundo o art. 10 (IX) da LPI. Quando resultantes de manipulação genética pelo ser humano, não são patenteáveis, segundo o art. 18 (III) da LPI.

7.1.1 Células-tronco

[182] As células-tronco são células capazes de se diferenciar nos tecidos que compõem o corpo humano ou animal, e podem ser obtidas diretamente (i) do embrião; (ii) de vários tecidos do organismo adulto (como por exemplo, da medula óssea, do tecido adiposo); (iii) do sangue de cordão umbilical e placentário; ou podem ser obtidas indiretamente a partir da reprogramação de uma célula adulta diferenciada (célula-tronco pluripotente induzida – iPS).

[183] As células-tronco embrionárias podem ser obtidas da massa interna dos blastocistos provenientes de embriões produzidos por fertilização *in vitro*.

[184] As células-tronco embrionárias humanas são mencionadas no art. 5º da Lei de Biossegurança nº 11.105/2005, que dispõe:

"Art. 5º É permitida, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização in vitro e não utilizados no respectivo procedimento, atendidas as seguintes condições:

I – sejam embriões inviáveis; ou

II – sejam embriões congelados há 3 (três) anos ou mais, na data da publicação desta Lei, ou que, já congelados na data da publicação desta Lei, depois de completarem 3 (três) anos, contados a partir da data de congelamento.

§ 1º Em qualquer caso, é necessário o consentimento dos genitores.

§ 2º Instituições de pesquisa e serviços de saúde que realizem pesquisa ou terapia com células-tronco embrionárias humanas deverão submeter seus projetos à apreciação e aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa.

§ 3º É vedada a comercialização do material biológico a que se refere este artigo e sua prática implica o crime tipificado no art. 15 da Lei no 9.434, de 4 de fevereiro de 1997.”

[185] Em resposta à consulta efetuada pela CGPAT II sobre a aplicação da Lei de Biossegurança aos pedidos de patentes com processos ou composições envolvendo células-tronco embrionárias humanas, a Procuradoria Federal Especializada junto ao INPI manifestou-se, por meio do Parecer nº 00037/2018/PROCGAB/PFE-INPI/PGF/AGU, apontando que não identifica óbice legal ao patenteamento de produtos, processos de obtenção e aplicação de células-tronco embrionárias humanas. A Procuradoria esclareceu que as condições dispostas no art. 5º para fins de pesquisa e terapia não existem em igual medida para o patenteamento; e que a vedação de comercialização contida no art. 5º, § 3º, da Lei de Biossegurança não se estende ao patenteamento, pois comercialização e patenteamento são atividades distintas.

7.1.2 Produtos e processos envolvendo células-tronco

[186] De acordo com a LPI, as células-tronco *per se*, obtidas de um animal ou com alguma modificação genética, não são passíveis de proteção diante do disposto nos arts. 10 (IX) ou 18 (III), respectivamente. Nos casos em que composições ou kits contenham células-tronco, tais produtos podem ser considerados patenteáveis.

[187] Os processos de obtenção/cultivo de células-tronco e aplicação (usos) das mesmas podem ser considerados patenteáveis desde que não impliquem ou incluam um método terapêutico e/ou cirúrgico (art. 10 (VIII) da LPI).

[188] Seguem exemplos de matérias que podem ser passíveis de patenteamento:

- composições contendo células-tronco e outros ingredientes (implantes diversos contendo células, formulações de célula e matriz, células e fatores de crescimento, etc.);
- composição contendo misturas de diferentes tipos de células-tronco;
- processos de purificação, preparo, condicionamento, diferenciação, reprogramação, ou qualquer processamento de células-tronco desde que seja realizado *in vitro*;

- usos de células-tronco para o preparo de medicamento para tratar a doença X;
- usos de células-tronco para o preparo de implantes para tratar a doença X;
- usos de células-tronco para o preparo de composições para o diagnóstico da doença X;
- processos de diagnóstico que incluem etapas que empregam células-tronco ou tecidos sintéticos, desde que sejam realizados *in vitro*;
- testes de drogas que incluem etapas que empregam células-tronco ou tecidos sintéticos, desde que realizados *in vitro*;
- processos de cultivo de células-tronco;
- meios de cultura condicionados obtidos durante o cultivo de células-tronco.

7.2 Plantas transgênicas, suas partes e seus processos de obtenção

[189] São plantas que tiveram o seu genoma modificado pela introdução de um DNA manipulado pelas técnicas de DNA recombinante, e cuja modificação não aconteceria em condições naturais de cruzamentos ou recombinação.

[190] Plantas transgênicas e suas partes (por exemplo, célula transgênica, tecido transgênico e órgão transgênico) não são consideradas como matérias patenteáveis segundo o art. 18 (III e parágrafo único) da LPI.

[191] Ainda que o processo de obtenção de plantas transgênicas seja patenteável, é importante ressaltar que os produtos intermediários e/ou finais desse processo, ou seja, a planta transgênica e/ou as partes dessa planta constituem matérias expressamente proibidas de patenteabilidade segundo o art. 18 (III e parágrafo único) da LPI. Entretanto, não há restrição ao patenteamento dos processos de obtenção dessas plantas, exceto os que envolverem tecnologias de restrição de uso, vide item 7.4.

Exemplos de reivindicações passíveis de proteção

- Método de produção de planta transgênica caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:
 - (a) obtenção de um explante da planta;
 - (b) exposição do explante à cultura de *Agrobacterium tumefaciens* que contém o vetor definido pela reivindicação X (devidamente descrito com um gene de seleção, um gene heterólogo e a(s) sequência(s) promotoras);
 - (c) cultivo do explante em um meio com as condições específicas de cultivo de um tecido vegetal; e
 - (d) seleção e cultivo de calos transformados que expressam o gene heterólogo, para induzir a formação do calo embrionário.
- Método para produzir uma planta dicotiledônea transgênica, caracterizado pelo fato de que compreende:
 - (a) transformar células de planta usando um vetor de transformação de *Agrobacterium* que compreende uma construção gênica químérica Y;
 - (b) obter uma célula de planta transformada; e
 - (c) regenerar a partir da célula de planta transformada uma planta geneticamente transformada.

7.3 Processo de obtenção de plantas por cruzamento

[192] O art. 10 (IX) da LPI estabelece que processos biológicos naturais não são considerados invenção, e portanto exclui o patenteamento de processos biológicos naturais, inclusive aqueles para a produção de plantas.

[193] Entende-se por “processo biológico natural” todo processo que não utilize meios técnicos para a obtenção de produtos biológicos ou que, mesmo utilizando um meio técnico, seria possível de ocorrer na natureza sem a intervenção humana, consistindo inteiramente de fenômenos naturais. Nesse sentido, processos biológicos serão considerados não naturais quando a intervenção humana for direta na composição genética e tiver caráter permanente.

[194] Assim, processos envolvendo o cruzamento de plantas geneticamente modificadas por intervenção humana direta são passíveis de proteção.

Exemplo 38: Parentais não transgênicos.

Reivindicação: Método para produzir uma planta de X caracterizado por compreender as etapas de:

- a) selecionar uma planta de X homozigota para o gene A;
- b) selecionar uma planta de X homozigota para o gene B; e
- c) cruzar as plantas selecionadas nas etapas (a) e (b) para produzir uma planta híbrida.

Métodos convencionais de produção de plantas baseados em etapas de seleção, cruzamento e propagação são considerados processos biológicos naturais, incidindo no art. 10 (IX) da LPI. Nesses casos a interferência humana através da seleção e indução de cruzamentos específicos não é essencial para que o processo ocorra, apenas acelerando ou limitando aquilo que ocorreria na natureza.

Exemplo 39: Parentais não transgênicos.

Reivindicação: Método para produzir uma planta de X com elevados níveis de compostos W caracterizado por compreender as etapas de:

- a) identificar os marcadores gênicos ligados a níveis elevados de W;
- b) selecionar os indivíduos compreendendo os marcadores identificados na etapa (a); e
- c) cruzar os indivíduos selecionados na etapa (b).

Métodos convencionais de produção de plantas baseados em etapas de seleção, cruzamento e propagação em que a intervenção humana consiste apenas em fornecer meios técnicos adicionais para facilitar ou direcionar o processo – nesse caso, a identificação de marcadores gênicos – são considerados processos biológicos naturais, incidindo no art. 10 (IX) da LPI. Nesses casos a interferência humana não é decisiva para a obtenção do resultado final, meramente acelerando ou limitando aquilo que ocorreria naturalmente.

Exemplo 40: Parentais transgênicos.

Reivindicação 1: Método de produção de sementes híbridas caracterizado por compreender o cruzamento de uma planta resistente a herbicida com uma planta dotada de valor nutricional aumentado compreendendo no seu genoma um gene heterólogo codificando uma albumina modificada.

Reivindicação 2: Método de introdução da característica de resistência a um herbicida em uma planta dotada de valor nutricional aumentado caracterizado por compreender as etapas de:

- a) cruzar uma planta resistente a pelo menos um herbicida com uma planta compreendendo no seu genoma um gene heterólogo codificando uma albumina modificada;
- b) desenvolver populações de base;
- c) avaliar as plantas obtidas individualmente; e
- d) selecionar plantas dotadas de valor nutricional aumentado compreendendo a característica de resistência a herbicida.

Esse processo envolve uma etapa técnica essencial para a obtenção de plantas que não ocorrem na natureza e, portanto, não incide no art. 10 (IX) da LPI.

7.4 Tecnologias genéticas de restrição de uso

[195] De acordo com o parágrafo único do art. 6º da Lei nº 11.105/05 (Lei de Biossegurança), “entende-se por tecnologias genéticas de restrição do uso qualquer processo de intervenção humana para geração ou multiplicação de plantas geneticamente modificadas para produzir estruturas reprodutivas estéreis, bem como qualquer forma de manipulação genética que vise à ativação ou desativação de genes relacionados à fertilidade das plantas por induidores químicos externos”.

[196] Nesse contexto, o inciso VII do art. 6º da Lei de Biossegurança **veda** “a utilização, a comercialização, o registro, o patenteamento e o licenciamento de tecnologias genéticas de restrição do uso”. Dessa forma, não é permitido o patenteamento de processos de intervenção humana para a geração/multiplicação de plantas geneticamente modificadas no que diz respeito à produção de estruturas reprodutivas estéreis.

[197] Em resposta à consulta efetuada pela CGPAT II sobre a aplicabilidade da proibição estabelecida no art. 6º (VII) da Lei de Biossegurança, quando do exame dos pedidos de patente que envolvam tecnologias de restrição de uso, a Procuradoria Federal Especializada junto ao INPI manifestou-se, por meio da nota nº 0182-2012-AGU/PGF/PFE/INPI/COOPI-ALB-2.2, indicando que sejam indeferidos os pedidos de patente que se enquadram na referida proibição. Esse entendimento foi normatizado na RPI nº 2172 de 21/08/2012.

[198] Assim, ao identificar em um pedido de patente que a matéria reivindicada se enquadra no escopo da Lei nº 11.105/05, ou seja, em processos que envolvem tecnologia de restrição de uso, o examinador deve emitir objeção com base no art. 6º (VII) da Lei de Biossegurança. No exame subsequente, caso o depositante mantenha o processo que envolve tecnologia de restrição de uso, o examinador poderá indeferir o pedido, com a mesma base legal.

[199] Para os fins dessas Diretrizes, entende-se que processos e/ou manipulação genética que produzam estruturas reprodutivas estéreis (pólen, óvulo, estigma, antera, fruto, e tecidos destes), ou que visem à ativação ou desativação de genes relacionados à fertilidade das plantas por indutores químicos externos, incidem nas proibições do art. 6º (VII) da Lei de Biossegurança.

Exemplos de reivindicações de processos envolvendo tecnologia de restrição de uso não permitidas:

- Método para produzir uma variedade capaz de possuir frutos sem sementes, caracterizado pelo fato de que uma variedade de esterilidade masculina tendo uma característica partenocárpica é retrocruzada com uma planta de uma linhagem fixa.
- Método para produção de uma planta híbrida caracterizado por fundir protoplastos de uma planta macho estéril com protoplastos de uma segunda variedade, para conferir a característica de esterilidade à segunda variedade.

Exemplos de matérias que não incidem nas proibições do art. 6º (VII) da Lei de Biossegurança:

- produtos intermediários, tais como vetores e construções (desde que atendam aos demais requisitos da LPI); e

- processos para restauração da fertilidade baseados na ativação/desativação de genes desde que não envolvam o uso de indutores químicos externos.

[200] Reivindicações de processo amplas, envolvendo a manipulação da fertilidade, que incluem tanto a produção de estruturas inférteis quanto férteis, devem ser objetadas com base no art. 6º (VII) da Lei de Biossegurança. Cabe ao examinador avaliar se é possível a restrição da matéria reivindicada ao que não incide nas proibições da Lei de Biossegurança.

Exemplos de reivindicações aceitas:

- Construção gênica caracterizada por compreender um gene de SEQ ID NO: X cuja expressão gênica de inibição da fertilidade está ativa e apenas é inativada com a aplicação de um indutor químico externo.
- Cassete de expressão, caracterizado por:
 - a) uma primeira sequência de promotor específico de flor masculina de SEQ ID NO: X operacionalmente ligada ao gene de SEQ ID NO: Y, que codifica a expressão de um fator transcricional capaz de regular a expressão de um gene operacionalmente ligado a uma sequência promotora de SEQ ID NO: Z, na presença de um indutor químico externo;
 - b) uma segunda sequência de promotor de SEQ ID NO: Z operacionalmente ligada a um gene restaurador de SEQ ID NO: W codificando um produto capaz de restaurar a fertilidade masculina.
- Processo de restauração da fertilidade de plantas caracterizado por ativar a expressão do gene de SEQ ID NO: X, operacionalmente ligado à sequência promotora de SEQ ID NO: Y, submetendo as plantas a uma temperatura entre 25 e 32 °C.

8 Pedidos de patente envolvendo componentes do patrimônio genético nacional

[201] Em novembro de 2015 entrou em vigor a Lei nº 13.123, que regula as atividades de acesso ao patrimônio genético nacional e ao conhecimento tradicional associado no Brasil, em substituição a MP 2.186-16/2001. De acordo com o art. 47 da Lei nº 13.123/2015, “*a concessão de direito de propriedade intelectual pelo órgão competente sobre produto acabado ou sobre material reprodutivo obtido a partir de acesso a patrimônio genético ou a conhecimento tradicional associado fica condicionada ao cadastramento ou autorização, nos termos desta Lei*”.

[202] O referido cadastramento de atividades é obrigatório (art. 2º, XII da Lei nº 13.123/2015) e deve ocorrer previamente ao requerimento da patente (art. 12, § 2º da Lei nº 13.123/2015), nos termos do Decreto nº 8.772/2016 (art. 20, § 1º, II). No ato do depósito de um pedido de patente o usuário deverá informar se houve acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado, como também se há cadastro de acesso (art. 109 do Decreto nº 8.772/2016).

[203] O cadastramento de atividades de acesso é realizado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen, (<http://sisgen.gov.br>), e deve seguir os prazos estabelecidos pelo CGEN.

[204] Os pedidos em andamento que não contêm informação sobre a ocorrência de acesso poderão receber exigência para apresentar manifestação sobre esta questão. Nesses casos, o depositante do pedido cujo objeto decorre de acesso deverá apresentar o comprovante de cadastro ou de autorização.

9 Referências

- Correa, C. M. (2000). "Intellectual Property Rights. The WTO and Developing Countries. The TRIPS Agreement and Policy Options". Third World Network, Malaysia.
- Das, M.K. & Dai, H.K. (2007). "A survey of DNA motif finding algorithms". *BMC Bioinformatics* 8(Suppl 7):S21.
- Eden, E., Lipson, D., Yogev, S. & Yakhini, Z. (2007). "Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences". *PLoS Comput Biol.* 3(3):39.
- EPO – European Patent Office (2006). "Case Law of the Boards of Appeal of the European Patent Office", Fifth Edition, Germany. Disponível em: <http://www.europeanpatent-office.org>.
- EPO – European Patent Office (2010). "Guidelines for Examination in the European Patent Office", Germany. Disponível em: <http://www.epo.org/law-practice/legal-texts/guidelines.html>.
- Fickett, J. W. & Hatzigeorgiou, A. G. (1997). "Eukaryotic promoter recognition". *Genome Res.* 7(9):861-78.
- Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H. & Lewontin, R.C. (1999). "Modern Genetic Analysis". New York: W. H. Freeman & Co.
- India – (2008). "Manual of patent practice and procedure". Disponível em: http://ipindia.nic.in/ipr/patent/DraftPatent_Manual_2008.pdf.
- INPI – "Diretrizes para o exame de pedidos de patente nas áreas de biotecnologia e farmacêutica depositados após 31/12/1994".
- INPI (Argentina) – (2003). "Directrices sobre Patentamiento". Disponível em: <http://www.inpi.gov.ar>.
- JPO – Japan Patent Office (2011). "Examination Guideline for Patent and Utility Model in Japan". Disponível em: http://www.jpo.go.jp/quick_e/index_tokkyo.htm.
- Lewin, B. (2001). "Genes VII". Trad. Ferreira, H. & Pasquali, G. Porto Alegre, Astmed Editora Ltda.
- Oficina Internacional de la OMPI (2004). "Manual para el examen de solicitudes de Patentes de invención en las oficinas de propiedad Industrial de los países de la comunidad Andina". Disponível em: <http://www.comunidadandina.org>.
- Pertsemidis, A. & Fondon, J. W. (2001). "Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy)". *Genome Biol.* 2(10):1-10.
- Petsko, G. A. (2001). "Homologuephobia". *Genome Biol.* 2(2):COMMENT1002.

- Pevsner, J. (2009). "Bioinformatics and Functional Genomics". John Wiley, New York, 2^a ed., 2009, p.48, 49, 53 e 123.
- Simmons, S. E. (2003). "Markush structure searching over the years". *World Patent Information*, 25:195-202.
- Simmons, S. E. (1991). "The Grammar of Markush Structure Searching: Vocabulary vs Syntax". *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 31:45-53.
- Smith, S.A., Silva, L.A., Fox, J.M., Flyak, A.I., Kose, N., Sapparapu, G., Khomandiak, S., Ashbrook A.W., Kahle, K.M., Fong, R.H., Swayne, S., Doranz, B.J., McGee, C.E., Heise, M.T., Pal, P., Brien, J.D., Austin, S.K., Diamond, M.S., Dermody, T.S. & Crowe, J.E., Jr. (2015). "Isolation and Characterization of Broad and Ultrapotent Human Monoclonal Antibodies with Therapeutic Activity against Chikungunya Virus". *Cell Host & Microbe* 18: 86-95.
- Stryer, L. (1996). "Bioquímica". 4^a ed. Trad. de A. J. M. da S. Moreira; J. P. de Campos. L. F. Macedo; P. A. Motta; P. R. P. Elias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Tiller, T., Busse, C.E. & Wardemann, H. (2009). "Cloning and expression of murine Ig genes from single B cells". *J. Immunol. Methods*, 350:183-193.
- USPTO – United States Patent and Trademark Office (2010). "Manual of Patent Examining Procedure (MPEP)". Original 8th Edition, August 2001, Latest Revision July 2010. Disponível em: <http://www.uspto.gov/web/offices/pac/mpep/index.htm>.
- Webber, C. & Ponting, C.P. (2004). "Genes and homology". *Curr. Biol.* 14(9):R332-3.
- WIPO – (2004). "PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines". Disponível em: <http://www.wipo.int>.
- Whyte, B., Persson, B. & Jörnvall, H. (1996). "Primary structure and homology". *FEBS Letters*. 380(3):301.



**MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE ADMINISTRAÇÃO
COORDENAÇÃO-GERAL DE ORÇAMENTO E FINANÇAS
DIVISÃO DE CONTABILIDADE GERAL
SERVIÇO DE ARRECADAÇÃO**

C O M U N I C A D O

Processos de Restituição de Retribuição Indeferidos

Segue abaixo a relação de processos de restituição de retribuição indeferidos. Segundo a Resolução INPI nº 204/2017, art. 14 §1º, a partir desta publicação o requerente tem 30 dias corridos para interpor recurso contra o indeferimento, sob pena de arquivamento definitivo do pedido. Referência: Resolução INPI nº 148/2015 para os processos protocolados de 12 de agosto de 2015 até 25 de dezembro de 2017; Resolução INPI nº 204/2017 a partir de 26 de dezembro de 2017; e Nota Procuradoria Federal-INPI/CJCONS nº 045/2009 e Decreto 20.910/1932, nos demais casos.

Eventuais recursos devem ser enviados para searc@inpi.gov.br com o assunto “Recurso Contra Indeferimento”. Possíveis dúvidas podem ser enviadas para o mesmo endereço eletrônico com o assunto “Dúvidas Quanto ao Indeferimento”.

Nº DO PROCESSO ADMINISTRATIVO	NÚMERO DA GRU	MOTIVO DA NEGATIVA
52402.005936/2018	29409171806414445	Pedido movimentou a máquina pública. Negado conforme o § 2º, do art. 3º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011695/2019	29409171910907371	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011605/2019	29409171910957476	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011744/2019	29409171910905093	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.013790/2019	29409171910955422	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.013386/2019	29409171910905387	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.000015/2019	0000231705139770	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011929/2019	29409171910897635	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.009105/2019	29409171908333584	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.009107/2019	29409171908333533	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.009108/2019	29409171908333509	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.009897/2019	29409171908391681	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.012134/2019	29409231911011786	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011764/2019	29409171911023469	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011762/2019	29409171910905301	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011747/2019	29409171910976411	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.



MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Nº DO PROCESSO ADMINISTRATIVO	NÚMERO DA GRU	MOTIVO DA NEGATIVA
52402.011748/2019	29409171910976667	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011745/2019	29409171910974818	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.004608/2018	29409171806282166	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011598/2019	29409171910991976	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011535/2019	29409171910928913	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011531/2019	29409171910946849	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011532/2019	29409171911001678	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011507/2019	29409171910875356	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011516/2019	29409171910968168	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011603/2019	29409171910985470	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011548/2019	29409171910901063	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011586/2019	29409171911051411	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011585/2019	29409171911031178	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.011518/2019	29409171910926066	Indeferido por não cumprimento de exigência. Negado conforme o § 2º do art. 12º da Resolução INPI 204/2017.
52402.009067/2020	29409231922054643	Pedido de restituição cancelado por solicitação do requerente.

Fernando Cavalcante Pinheiro
Chefe do Serviço de Arrecadação



MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS INTEGRADOS.

COMUNICADO

Considerando a publicação da portaria nº 348, de 09/10/2020, na seção "Comunicados" da RPI 2597, de 13/10/2020, revogando o artigo 13, da resolução 113/2013, a Diretoria de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados vem esclarecer que:

- 1) Todos os arquivamentos e extinções definitivos publicados com base no artigo 13, da resolução 113/2013, serão anulados com a publicação, na RPI, do despacho 8.9, referente aos pedidos de patente, e despacho 24.6, referente às patentes.
- 2) Os pedidos de patente e patentes que estiverem inadimplentes com as retribuições anuais previstas no art. 84, da LPI, serão arquivados ou extintos, nos termos do art. 86, da LPI, e poderão ser restaurados, se o depositante ou titular assim o requerer, no prazo de 3 meses, conforme o disposto no art. 87, da LPI.
- 3) A restauração de que trata o art. 87, da LPI, deverá ser realizada nos moldes do disposto no artigo 4º, da portaria supracitada, e em consonância com a portaria 302, de 12/08/2020, sob pena de manutenção do arquivamento do pedido ou manutenção da extinção da patente.
- 4) Para melhor orientar os usuários, cabe ressaltar que para o devido cumprimento dos dispositivos legais acima referenciados, o depositante do pedido ou o titular da patente deverão, dentro do prazo legal, recolher a retribuição específica prevista no art. 87, da LPI, referente à taxa de restauração, acompanhada de cada uma das retribuições anuais em débito recolhidas na forma da retribuição adicional de que trata o art. 84 §2º, da LPI.
- 5) Os serviços e valores eventualmente já recolhidos referentes à restauração e às anuidades em débito serão analisados e aproveitados caso estejam em consonância com as disposições da legislação e normas vigentes, havendo a notificação de arquivamento ou extinção somente das anuidades pendentes de regularização.



**MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

Revisão das Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente na Área de Biotecnologia

A Instrução Normativa/INPI/PR Nº 118, de 12/11/2020, institui a nova versão das Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente na Área de Biotecnologia, que entram em vigor em 01/12/2020. O objetivo desta nova versão é atualizar e detalhar as Diretrizes de Biotecnologia vigentes, publicadas em março/2015. Melhorias e revisões contínuas são essenciais para a melhor harmonização interna dos exames técnicos da matéria, tendo como objetivo o continuado aperfeiçoamento do exame de patente no campo da Biotecnologia, bem como nos demais.

O processo de elaboração das Diretrizes incluiu etapas de consulta interna e consulta pública, permitindo amplo aporte de sugestões e de comentários de 20 organizações envolvidas no tema. Todas as sugestões e todos os comentários foram compilados e analisados pelo Grupo de Revisão da DIRPA.

O claro entendimento da matéria passível de proteção por patentes no Brasil, no que compete à área de Biotecnologia, contribui assim para o aumento da segurança jurídica do sistema de propriedade industrial, em consonância com a política industrial de incentivo ao desenvolvimento da bioeconomia no Brasil.

Essa nova versão das Diretrizes de Exame de Pedidos de Patentes foi apresentada ao vice-presidente da República, General Hamilton Mourão, em encontro ocorrido em seu gabinete na semana que passou.



Todo o material gerado pelo Grupo de Revisão (incluindo a nova versão) pode ser visualizado em https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/patentes/pagina_consultas-publicas