



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01351**

(22) Data de depozit: **15.12.2010**

(41) Data publicării cererii:
28.10.2011 BOPI nr. **10/2011**

(71) Solicitant:
• **DAAS MOHAMMED MARWAN,**
STR.FOIȘORULUI NR.1, BL.V 51, AP.129,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **DAAS MOHAMMED MARWAN,**
STR.FOIȘORULUI NR.1, BL.V 51, AP.129,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(74) Mandatar:
CABINET INDIVIDUAL PAUL
ANDRONACHE,
ALEEA COMPOZITORILOR NR.1, BL.E21,
ET.6, AP.35, SECTOR 6, BUCUREȘTI

(54) **PRODUS DE ORIGINE NATURALĂ PENTRU TRATAMENT
OFTALMIC ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un tratament oftalmic activ în afecțiuni ale corneei și moderat activ în glaucom. Produsul conform invenției se obține din trufe brune de deșert ale fungilor din genul *Terfezia*, care se extrag cu apă demineralizată în raport 3-3 : 1 g/v, la 4°C, extractul se separă prin filtrare pe strat adjuvant sau prin centrifugare, și se purifică prin ultrafiltrare pe

membrane cu limită de excludere 10 kDa, permeatul obținut fiind concentrat sub vacuum la 1/6...1/9 v/v, se adaugă clorură de banzalconiu 0,01 g/v și clorură de sodiu 0,6%, cu obținerea unui produs care se repartizează în flacoane sterile de 5...10 ml.

Revendicări: 1



PRODUS DE ORIGINE NATURALĂ PENTRU TRATAMENT OFTALMIC ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Invenția se referă la un produs de extracție vegetală cu acțiune terapeutică în afecțiuni oftalmologice și procedeul de obținere a acestuia.

Sursa vegetală de obținere constă în trufe brune de deșert ale fungilor din genul *Terfezia*.

În general, trufele sunt larg utilizate în alimentație, având un conținut ridicat de proteine și grăsimi, alte substanțe nutritive fiind carbohidrați, aminoacizi și vitamine (în special vitamina C) [1].

Din texte religioase islamice [2] și din medicina populară în Orientul Mijlociu se cunoaște utilizarea sucului obținut din trufe de deșert în tratamentul unor boli de ochi [3].

Există însă puține publicații științifice care au identificat peptide antimicrobiene în extracte din aceste trufe, fără a demonstra însă o acțiune terapeutică [4,5].

Se cunosc numeroase afecțiuni oftalmologice ce lezează corneea: ulcerul corneean, keratite (infecții de diferite origini, în special virale sau microbiene). Alte leziuni se datorează abraziunii provocate de corpi străini sau șocuri mecanice. Pe plan mondial, afecțiunile corneei urmează imediat cataractei între factorii determinanți ai orbirii [6-11].

Pentru tratamentul afecțiunilor menționate mai sus, se utilizează antibiotice sau antivirale, atât local cât și sistemic. Numeroase preparate dintre acestea pot determina reacții adverse sau alergice, cu consecințe neplăcute sau chiar grave. De asemenea, vindecarea poate fi însoțită de efecte proliferative, lăsând cicatrice supărătoare, afectând vederea.

Glaucoamele sunt un grup de boli ale ochiului caracterizate prin afectarea progresivă a nervului optic și campului vizual, datorate creșterii presiunii intraoculare, reprezentând la nivel mondial, a treia cauză de orbire.

Medicația antiglaucomatoasă cuprinde agenți topici (analogi de prostaglandine, β -blocante), cât și medicamente sistemice. Administrarea acestora poate fi limitată de reacții alergice sau efecte adverse, unele serioase, ca de exemplu tulburări cardiace sau la nivelul sistemului nervos central [6,8,9,10,11,12].

Invenția realizează un produs de origine naturală de uz terapeutic foarte activ în afecțiuni oculare ale corneei și moderat activ în glaucom.

Produsul conform invenției se obține prin extracție apoasă a trufelor, după care extractul este supus purificării prin ultrafiltrare, concentrării și formulării sub formă de colir.

Astfel, trufele proaspete sau congelate, se extrag în apă demineralizată la 4°C în raport de 2-3:1 (v/g), extractul se separă prin filtrare pe strat de adjuvant sau centrifugare și se supune purificării prin ultrafiltrare pe membrana cu limita de excludere de 10 kDa. Permeatul obținut se concentrează sub vacuum la 1/6-1/9 (v/v) și se adaugă clorură de benزالconiu 0.01% (g/v) și clorură de sodiu 0.6 % (g/v), după care se filtrează steril și se obține astfel un colir care se repartizează în flacoane sterile de 5-10 ml.

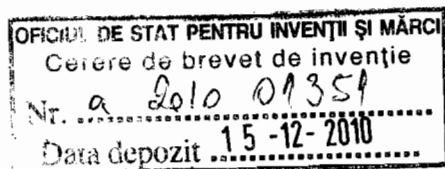
Avantajele invenției constau în principal în aceea că: se obține un produs de origine naturală foarte activ în afecțiunile corneei și moderat activ în glaucom, lipsit de efect proliferativ, regenerarea având loc fără a lăsa cicatrice; produsul este lipsit de toxicitate și neiritant.

Se prezintă în continuare două exemple de realizare a invenției:

Exemplul 1

O cantitate de 2 Kg trufe brune de deșert (din genul *Terfezia*), congelate timp de 4 luni la -17.....-19°C, se supune extracției prin agitare cu 4L apă demineralizată, timp de 24h, la 4°C. După extracție, se separă faza solidă prin filtrare sub vid, pe palmie Buchner, prin strat de adjuvant de filtrare (celită). Rezultă 3370 ml filtrat (extract apos) cu o concentrație în proteine (metoda Lowry) de 6.72 mg/ml.

Extractul se purifică de proteinele balast prin ultrafiltrare pe un modul cu o casetă de membrane de celuloză având limita de excludere de 10 kDa și o suprafață de filtrare de 0.5 m² (PLCGC- Pellicon, Millipore), cu recircularea retentatului și adăugare în final de apă demineralizată pentru recuperarea



produsului activ. Se obțin 3250 ml permeat (filtrat) cu o concentrație în proteine de 3.9 mg/ml, reprezentând fracția activă și 150 ml retentat cu 17.4 mg/ml (balast proteic). Filtratul se concentrează într-un rotavapor, sub vid (temperatura maximă 37°C) până la un volum de 510 ml.

Soluția activă rezultată astfel are 22.5 mg proteina/ml. Aceasta se formulează sub formă de colir prin adăugare la 100 ml soluție a 0.5 ml clorură de benزالconiu 2% (g/v)-0.01% (g/v) față de soluția activă și 0.6 g NaCl - 0.6% (g/v), după care se filtrează în condiții aseptice pe filtru steril cu membrană de 0.22 μm și se repartizează în flacoane sterile cu picător de 5 și 10 ml.

Exemplul 2

Se procedează ca în exemplul 1, cu diferența că materia primă de extracție o constituie trufe proaspete, extrase cu apă demineralizată în raport de 3:1 (g/v), iar extractul se separă prin centrifugare la 7000-8000 rpm. Din 2 Kg de trufe proaspete se obțin 4580 ml extract cu 16.7 mg proteina/ml care se prelucurează în continuare ca în exemplul 1.

Soluția activă a prezentat activitate antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus* ATCC 65338P.

Caracterizarea fizico-chimică a soluției active și a colirului s-a efectuat prin cromatografie de lichide de înaltă performanță HPLC-DAD, cuplată cu spectrometrie de masă (HPLC-MS-MS) și spectrometrie atomică de emisie (ICP-MS).

Determinarea HPLC (coloană Kromasil 100-5CB, două faze mobile, cromatograf Merck-Hitachi Lachrom) a evidențiat un complex de peptide cu un compus majoritar în proporție de 55%.

Cromatogramele HPLC-MS-MS (coloană Zorbax-SB-C18, două faze mobile, cromatograf LC/MS Triplu Quad Agilent) au prezentat o masă moleculară a componentelor de până la 500 Da și o masă de 271 Da pentru compusul majoritar.

Analiza spectrometrică de emisie atomică în plasmă cuplată inductiv (ICP-MS Elan DRC-e Perkin Elmer) a evidențiat prezența în calitate de microelemente a metalelor Mg, Fe, Zn, Cu, Cr, Cd, As, Se, Pb. Zincul, cromul și seleniul pot fi utile acțiunii terapeutice, iar metalele toxice (Cd, As, Pb) sunt în limitele admise de Farmacopeea Europeană, ed.6.

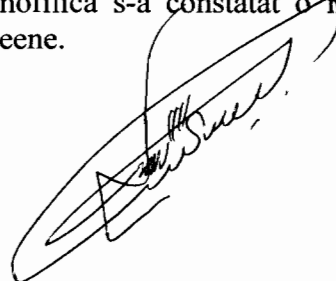
Testele de toxicitate a colirului după doză orală unică, efectuate pe șoareci, au arătat că produsul e lipsit de toxicitate.

Testarea toleranței oculare a colirului, în administrare unică și repetată, efectuată pe iepuri New-Zealand, a clasificat produsul, conform scării de evaluare Draize, ca "neiritant" și, respectiv, "practic neiritant".

S-a efectuat un studiu clinic care a cuprins un număr de 16 cazuri (7 pisici și 9 câini) diagnosticați cu glaucom secundar (distopiilor cristalinului, tumorilor de corp ciliar) și cheratite de diverse etiologii (superficială cronică, eozinofilică, proliferativă secundară cicatrizării, sechestrului corneean). Tratamentul a constat în administrarea de 1-2 picături de 3 ori pe zi, timp de 14 zile, pentru toate afecțiunile luate în studiu.

În cazurile de glaucom secundar distopiilor cristalinului, colirul a prezentat o acțiune moderată de scădere a presiunii intraoculare (PIO).

În cazurile de cheratită superficială cronică și cheratită eozinofilică s-a constatat o importantă acțiune de reducere a proliferării conjunctive și a neovascularizației corneene.



Bibliografie

1. Murcia M. A., Martinez – Tome M., Vera A., Morte A., Gutierrez A., Honrubia M., Jimenez A. M. (2003) J.Sci. Food Agr. **83**, 535-541;
2. Zaghloul El-Nagar "Prophetic Medicine Part 2"-Truffles healing the eye, June 2009; <http://www.elakiri.com/forum/showthread.php?t=4830238&highlight=Truffles>
3. Abu-Rabia A. (1983) "Folk medicine among the Bedouin tribes in the Negev", Social studies center of the Jacob Blaustein Institute for Desert Research, Ben-Gurion University of the Negev, Ierusalem, p. 17;
4. Janakat S., Al-Fakhiri S., Sallal A.-K. (2004) Phytother.Res. **18**, 810-813;
5. Janakat S.M., Al-Fakhiri S.M., Sallal A.-K.J. (2005) Saudi Med.J. **26** (6) 952-955;
6. Leonard A. Levin, Daniel M. Albert, Ocular Disease: Mechanisms and Management, 2010, Elsevier Inc., (2010);
7. Douglas J Coster, Fundamentals of Clinical Ophthalmology – Cornea, BMJ Books, London, (2002);
8. David A. Palay, Jay H. Krachmer, Primary Care Ophthalmology, Elsevier Mosby Inc., (2005);
9. Jimmy D. Bartlett, Siret D Jaanus, Clinical Ocular Pharmacology, fifth edition, by Butterworth-Heinemann, Elsevier, (2008);
10. Jack J. Kanski, Clinical Ophthalmology - A Systematic Approach, sixth edition, by Butterworth-Heinemann, Elsevier, (2007);
11. Merck Manual Online, Corneal Disorders by Melvin I. Roat, Glaucoma by Douglas J. Rhee, (2008);
12. Peter A. Netland , Glaucoma Medical Therapy: Principles and Management, second edition, Oxford University Press, Inc., (2008).



PRODUS DE ORIGINE NATURALĂ PENTRU TRATAMENT OFTALMIC ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE

REVENDICARE

Produs de origine naturală pentru tratament oftalmic, activ în afecțiuni ale corneei și moderat activ în glaucom, **caracterizat prin aceea că** se obține din trufe brune de deșert ale fungilor din genul *Terfezia*, proaspete sau congelate, care se extrag cu apă demineralizată, în raport de 2-3:1 (g/v) la 4°C, extractul se separă prin filtrare pe strat de adjuvant (celită) sau centrifugare și se purifică prin ultrafiltrare pe membrane cu limita de excludere 10 kDa; permeatul obținut se concentrează sub vacuum la 1/6-1/9 (v/v), se adaugă clorură de benzalconiu 0.01% (g/v) și clorură de sodiu 0.6% (g/v), obținându-se astfel un colir ce se repartizează în flacoane sterile de 5-10 ml.

