



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2011 00011**

(22) Data de depozit: **13.01.2011**

(66) Prioritate internă:

15.12.2010 RO a 2010 01351
10.01.2011 RO a 2011 00006

(41) Data publicării cererii:

30.08.2012 BOPI nr. **8/2012**

(71) Solicitant:

• **DASS MOHAMMED MARWAN,**
STR. FOIȘORULUI NR. 1, BL. V 51,
AP. 129, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

• **DASS MOHAMMED MARWAN,**
STR. FOIȘORULUI NR. 1, BL. V 51,
AP. 129, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **MOSCOVICI MIȘU,** *STR. JEAN STERIADI*
NR. 7, BL. I 22, SC. B, ET. 2, AP. 16,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CASARICA ANGELA,**
STR. POPA STOICA FĂRCAȘ NR. 19,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **COSA ORTANSA,**
STR. ALEXANDRU MORUZZI NR. 9, BL. V
54 B, SC. 3, ET. 3, AP. 39, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **NIȚĂ SULTANA,** *STR. BĂRBAT VOIEVOD*
NR. 21, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **RASIT IUKSEL,** *BD. DINICU GOLESCU*
NR. 37, BL. 4, SC. B, ET. 1, AP. 40,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **DASS AHMAD,** *STR. FOIȘORULUI NR. 1,*
BL. V 51, AP. 129, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
B, RO;

• **PANTELI IRINA MINERVA,**
STR. SPĂTARU NICOLAE MILESCU
NR. 46-48, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CREȚU ALEXANDRA,**
STR. DAVID CONSTANTIN NR. 6,
VOLUNTARI, IF, RO;
• **DASS MARWA,** *STR. FOIȘORULUI NR. 1,*
BL. V 51, AP. 129, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
B, RO;
• **DASS ARIJ,** *STR. FOIȘORULUI NR. 1,*
BL. V 51, AP. 129, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
B, RO;
• **DASS MOROUJ,** *STR. FOIȘORULUI*
NR. 1, BL. V 51, AP. 129, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **GHERA DANIELA MARIANA,**
STR. ION BREZOIANU NR. 18, AP. 5,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **DASS NOUR,** *STR. FOIȘORULUI NR. 1,*
BL. V 51, AP. 129, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
B, RO;
• **BOGHIU ANASTASIA,** *STR. BĂLȚIȚA*
NR. 3, BL. B19, SC. 3, AP. 69, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO

(74) Mandatar:

CABINET INDIVIDUAL ANDRONACHE
PAUL - STR. SIBIU NR. 14, 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 oftalmologice ale corneei și în glaucom. Produsul conform invenției se obține din trufe brune de deșert, ale fungilor din genul *Terfezia*, care se extrag în apă demineralizată, în raport de 2-3: 1 g/v, la 4°C, extractul se separă prin filtrare pe strat de adjuvant (celită) sau prin centrifugare și se purifică prin ultrafiltrare pe membrane cu limita de excludere 10 kDa,

permeatul obținut fiind concentrat 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, cu obținerea unui produs ce se repartizează în flacoane sterile de 5...10 ml.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art. 32 din Legea nr. 64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art. 23 alin. (1) - (3).



8

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <i>a 2011 0001</i>
Data depozit ... <i>13.06.2011</i>

PRODUS DE ORIGINE NATURALĂ PENTRU TRATAMENT OFTALMIC ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Invenția se referă la un produs natural pentru tratamentul unor afecțiuni oftalmologice și procedeul de obținere a acestuia.

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 [1-6].

Pentru tratamentul afecțiunilor menționate mai sus, se utilizează antibiotice sau antivirale, atat local cat 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, afectand vederea.

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

Medicația antiglaucomatoasă cuprinde agenți topici (analogi de prostaglandine, β -blocante), cat 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 [1,3,4,5,6,7].

Din cererile de brevet CN 101579488(A) și CN 101647913(A) se cunosc medicamente chinezești de origine naturală pe baze tradiționale pentru tratamentul unor afecțiuni oftalmologice.

Cererea de brevet CN 101579488(A) se referă la un medicament pentru tratarea cataractei și a glaucomului preparat cu 8 ingrediente naturale, din care 5 sunt de origine vegetală [8].

În cerea de brevet CN 101647913(A) se revendică un procedeu de preparare a unui medicament pentru tratamentul cataractei senile și cheratitei virale din 12 specii vegetale, prezentându-se date statistice promițătoare privind îmbunătățirea vederii bolnavilor [9].

Din texte religioase islamice [10] și din medicina populară în Orientul Mijlociu se cunoaște utilizarea sucului obținut din trufe de deșert în tratamentul unor boli de ochi [11].

In general, trufele sunt larg utilizate în alimentație, avand un conținut ridicat de proteine și grăsimi, alte substanțe nutritive fiind carbohidrați, aminoacizi și vitamine (în special vitamina C) [12].

Există însă puține publicații științifice care au identificat peptide antimicrobiene în extracte din aceste trufe, fără a demonstra însă o acțiune terapeutică [13,14].

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este realizarea unui produs de origine naturală de uz terapeutic foarte activ în afecțiuni oculare ale corneei și moderat activ în glaucom, printr-un procedeu cu faze și parametri prestabiliți. Sursa vegetală de obținere constă în trufe brune de deșert ale fungilor din genul *Terfezia*.

Produsul conform invenției este constituit dintr-un extract apos din trufe brune de deșert din genul *Terfezia* cu o concentrație de 13...17%(g/v) ca substanță uscată, conținând %(g/v):

- proteine 3,0...5,5
- aminoacizi 0,1...0,2
- carbohidrați(exprimați în glucoză) 0,4...0,6 la care sunt adăugate
- clorură de benzalconiu 0,01 pentru conservare
- clorură de sodiu 0,6 pentru izotonizare
- apă demineralizată până la 100.



Produsul este steril, pentru administrare oftalmică sub formă de colir.

Procedeul de obținere a produsului conform invenției constă în aceea că:

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 (celită) sau centrifugare și se supune purificării prin ultrafiltrare pe membrane cu limita de excludere de 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), 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 dintr-o singură sursă vegetală, foarte activ în afecțiunile corneei și moderat activ în glaucom, lipsit de efect proliferativ, regenerarea având loc fără a lăsa cicatrice; produsul e 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. După extracție, se separă faza solidă prin filtrare sub vid, pe pâlnie Buchner, prin strat de adjuvant de filtrare (celită). Rezultă 3370 ml filtrat (extract apos) cu o concentrație în proteine (metoda Lowry) de 6,7 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 5,5 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 450 ml.

Soluția activă rezultată astfel are 35,8 mg proteina/ml. Aceasta se formulează sub formă de colir prin adăugare la 100 ml soluție a 0,5 ml clorură de benzalconiu 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.

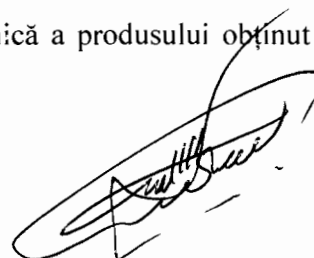
Caracterizarea fizico-chimică a produsului s-a efectuat prin cromatografie de lichide de înaltă performanță HPLC-DAD, cuplată cu spectrometrie de masă (HPLC-MS-MS) și spectrometrie atomică de emisie (ICP-MS).

Determinarea HPLC (coloană Kromasil 100-5CB, două faze mobile, cromatograf Merck-Hitachi Lachrom) a evidențiat un complex de proteine (polipeptide).

Cromatogramele HPLC-MS-MS (coloană Zorbax-SB-C18, două faze mobile, cromatograf LC/MS Triplu Quad Agilent) au prezentat o masă moleculară a componentelor proteice de până la 420 Da.

Analiza spectrometrică de emisie atomică în plasmă cuplată inductiv (ICP-MS Elan DRC-e Perkin Elmer) și de absorbție atomică (Analyst 800, Perkin Elmer) a evidențiat prezența în calitate de macro- și microelemente a metalelor Na, K, 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.

În tabelele următoare se prezintă compoziția chimică a produsului obținut și conținutul în metale al acestuia.



Tabelul nr.1. Compoziția chimică a produsului

Compoziție	Concentrații, %(g/v)
Conținut în substanță uscată,	14,996
Proteine totale, reprezentate de polipeptide cu masa cuprinsă între 300 și 420 Da,	3,4673
Aminoacizi, din care	0,17
- Alanina	0,067
- Serina	0,033
- Prolina	0,045
- Metionina	0,005
- Tirozina	0,021
Carbohidrați, exprimați în glucoză	0,499
Minerale (reziduu la calcinare)	1,61

Tabelul nr. 2. Conținutul în metale al produsului

Tipul de element	Conținut	
	ppm (μg/g)	mg/100g
Sodiu	1435,5	143,50
Potasiu	4497,4	449,74
Magneziu	179,5800	17,9580
Crom	0,3379	0,0338
Fier	11,0600	1,1000
Cupru	0,4756	0,0476
Zinc	7,5723	0,7572
Mangan	11,53	1,1530
Cobalt	7,0371	0,7037
Arsen	0,0321	0,0032



Seleniu	< 0,0010	< 0,0001
Cadmium	0,0323	0,00323
Plumb	< 0,0010	< 0,0001

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 5,1 mg proteină/ml care se prelucrează în continuare ca în exemplul 1.

Produsul a prezentat activitate antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Escherichia coli* ATCC 25922.

În tabelele următoare se exemplifică acest efect.

Tabelul nr. 3. Determinarea activității antimicrobiene la diferite diluții ale produsului (mediu bulion simplu pentru bacterii, pH 7,4).

Diluție %(v/v)	Microorganism	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2592	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
50	activ	activ
25	activ	activ
12,5	activ	activ
6,2	activ	activ
3,1	inactiv	inactiv

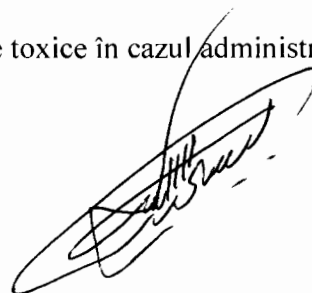
Tabelul nr. 4. Determinarea comparativă a activității antimicrobiene față de *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 (mediu TSA Agar, tampon pH 6, pH final 7,4).

Probă	Zonă de inhibiție (medie) mm
Produs conform invenției	25,5
Soluție cefalexină 10 µg/mL	13,8
20 µg/mL	17,1

Testul de toxicitate după doză unică a fost realizat pe șoareci NMRI, prin administrare în doză unică pe cale orală, prin gavaj intragastric.

Volumul de probă maxim administrat a fost de 25 ml/kgc. Animalele au fost supravegheate și observate până la finalul perioadei de 14 zile.

Produsul, administrat la șoareci pe cale orală, nu induce fenomene toxice în cazul administrării acestui volum maxim pentru calea orală.



Testarea toleranței locale oculare a produsului s-a efectuat în două faze, în administrare unică și repetată, pe iepuri New Zealand.

Pentru testarea toleranței în administrare unică, proba test a fost administrată unic prin instilarea unei picături (0,02 ml) în sacul conjunctival cu o perioadă de observație de 72 de ore.

Pentru testarea toleranței în administrare repetată proba a fost instilată zilnic timp de 28 de zile în sacul conjunctival, cu o perioadă de urmărire de încă două săptămâni de la încetarea aplicării probei. Conform evaluării oculare Draize, produsul a prezentat caracter "Neiritant" ca urmare a testării toleranței locale oculare în administrarea unică, respectiv "Practic Neiritant" în urma testării în administrare repetată, 28 de zile.

S-a efectuat un studiu clinic în cadrul Facultății de Medicină Veterinară București 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, sechestru cornean).

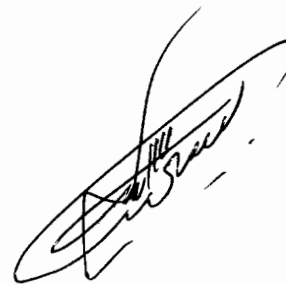
Diagnosticul cazurilor cu glaucom secundar luxației anterioare de cristalin s-a stabilit prin examen clinic oftalmologic, oftalmoscopie, tonometrie și ecografie oculară. Presiunea intraoculară (PIO) a fost măsurată cu Tono Vet la 2 ore, la 6 ore și la 24 de ore de la administrarea colirului.

Diagnosticul cazurilor de cheratită s-a efectuat prin testul lămpii cu fantă și utilizarea coloranților (fluoresceină).

Tratamentul a constat în administrarea a 1-2 picături de 3 ori pe zi, timp de 14 zile, pentru toate afecțiunile luate în studiu.

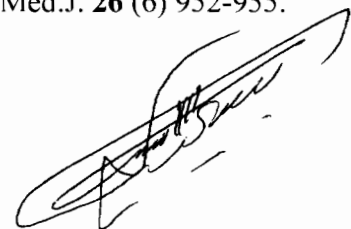
În cazurile de glaucom secundar distopiilor cristalinului, colirul a prezentat o acțiune moderată de scădere a PIO și lipsa acțiunii hipotensoare în glaucomul secundar tumorilor de corp ciliar.

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



Bibliografie

1. Leonard A. Levin, Daniel M. Albert, Ocular Disease: Mechanisms and Management, 2010, Elsevier Inc., (2010);
2. Douglas J Coster, Fundamentals of Clinical Ophthalmology – Cornea, BMJ Books, London, (2002);
3. David A. Palay, Jay H. Krachmer, Primary Care Ophthalmology, Elsevier Mosby Inc., (2005);
4. Jimmy D. Bartlett, Siret D Jaanus, Clinical Ocular Pharmacology, fifth edition, by Butterworth-Heinemann, Elsevier, (2008);
5. Jack J. Kanski, Clinical Ophthalmology - A Systematic Approach, sixth edition, by Butterworth-Heinemann, Elsevier, (2007);
6. Merck Manual Online, Corneal Disorders by Melvin I. Roat, Glaucoma by Douglas J. Rhee, (2008);
7. Peter A. Netland , Glaucoma Medical Therapy: Principles and Management, second edition, Oxford University Press, Inc., (2008);
8. Kai Tang, CN 101579488 (A), 2009;
9. Jian Ren, Lan Zhang, Junling Yang, CN 101647913 (A), 2010;
10. Zaghoul El-Nagar “Prophetic Medicine Part 2”-Truffles healing the eye, June 2009; <http://www.elakiri.com/forum/showthread.php?t=483023&highlight=Truffles>
11. 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;
12. 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;
13. Janakat S., Al-Fakhiri S., Sallal A.-K. (2004) Phytother.Res. **18**, 810-813;
14. Janakat S.M., Al-Fakhiri S.M., Sallal A.-K.J. (2005) Saudi Med.J. **26** (6) 952-955.



PRODUS DE ORIGINE NATURALĂ PENTRU TRATAMENT OFTALMIC ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

REVENDICĂRI

1. Produs de origine naturală pentru tratament oftalmic, activ în afecțiuni ale corneei și moderat activ în glaucom, **caracterizat prin aceea că** este constituit dintr-un extract apos din trufe brune de deșert din genul *Terfezia* cu o concentrație de 13...17%(g/v) ca substanță uscată, conținând %(g/v):

- proteine 3,0...5,5
- aminoacizi 0,1...0,2
- carbohidrați 0,4...0,6 la care sunt adăugate
- clorură de benzalconiu 0,01, conservant,
- clorură de sodiu 0,6, izotonizant,
- apă demineralizată până la 100%,
steril, pentru administrare oftalmică sub formă de colir.

2. Procedeu de obținere a produsului conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** trufe brune de deșert ale fungilor din genul *Terfezia*, proaspete sau congelate, 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.

