



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28.03.2014** BOPI nr. 3/2014

(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

(73) Titular:

• **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;
• **CĂȘĂRICĂ ANGELA,**
STR.POPA STOICA DIN 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;
• **RAȘIT 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.SPĂTARUL 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, ET.2, 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.B 19, 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

(56) Documente din stadiul tehnicii:

WO 95/10294 A1; VARDA KAGAN-ZUR,
NURIT ROTH-BEJERANO,
"DESERT TRUFFLES", VOL.1: 3
SPECIAL ISSUE-TRUFFLES 2008,
LIFE SCIENCES DEPARTMENT,
BEN-GURION UNIVERSITY, BEER-SHEVA,
ISRAEL, P.33, CAP. "NUTRITIONAL
VALUE"; ELINOAR SHAVIT, TOM VOLK,
"TERFEZIA AND TIRMANIA, DESERT
TRUFFLES, DELICACIES IN THE SAND OR
MANNA FROM HEAVEN?"; TOM VOLK'S
FUNGUS OF THE MONTH FOR JANUARY
2007, [http://botit.botany.wisc.edu/](http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/jan2007)
toms_fungi/jan2007, PP.5-6; S.JANAKAT,
M.NASSAR, "HEPATOPROTECTIVE
ACTIVITY OF DESERT TRUFFLE
(TERFEZIA CLAVERYI) IN COMPARISON
WITH THE EFFECT OF NIGELLA SATIVA
IN THE RAT", DEPARTMENT OF
NUTRITION AND FOOD TECHNOLOGY,
JORDAN UNIVERSITY OF SCIENCE AND
TECHNOLOGY, IRBID, JORDAN,
PAKISTAN JOURNAL OF NUTRITION 9 (1);
PP. 52-56, 2010.

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

Examinator: ing. TEODORESCU DANIELA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 127733 B1

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

3 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].

7 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.

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

15 Medicația antiglaucomatoasă cuprinde agenți topici (analogi de prostaglandine, β -blo-cante), 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.

19 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.

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

27 În cererea 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.

31 Din texte religioase islamice și din medicina populară în Orientul Mijlociu, se cunoaște utilizarea sucului obținut din trufe de deșert în tratamentul unor boli infecțioase ale ochiului.

35 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).

39 Există însă puține publicații științifice care au identificat peptide antimicrobiene în extrac-tele din aceste trufe, fără a demonstra însă o acțiune terapeutică.

43 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este realizarea unui produs de origine natu-rală 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*.

47 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) substanță uscată, conținând %(g/v): 3,0...5,5% proteine, 0,1...0,2% aminoacizi, 0,4...0,6% carbohidrați, exprimați în glucoză, la care sunt adăugate 0,01% clorură de benzalconiu pentru conservare, 0,6% clorură de sodiu pentru izotonizare, până la 100% apă demineralizată. Produsul este steril, pentru administrare oftalmică sub formă de colir.

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

55 Trufele proaspete sau congelate se extrag în apă demineralizată la o temperatură de 4°C în raport de 2-3:1 (v/g), extractul se separă prin filtrare pe strat de adjuvant din celită sau prin centrifugare și se supune purificării prin ultrafiltrare pe membrane cu limită de excludere de 10 kDa. Permeatul obținut se concentrează sub vacuum la 1/6-1/9 (v/v), se adaugă 0,01% (g/v) clorură de benzalconiu și 0,6 % (g/v) clorură de sodiu, după care se filtrează steril și se obține astfel un colir care se repartizează în flacoane sterile de 5...10 ml.

RO 127733 B1

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. 1
3

Se prezintă în continuare două exemple de realizare a invenției: 5

Exemplul 1. O cantitate de 2 kg trufe brune de deșert (din genul *Terfezia*), congelate timp de 4 luni la o temperatură de -17...-19°C, se supune extracției prin agitare cu 4 L apă demineralizată, timp de 24 h. 7

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. 9
11

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. 13
15
17

Soluția activă rezultată astfel are 35,8 mg proteină/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. 19
21
23

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). 25

Determinarea HPLC (coloană Kromasil 100-5CB, două faze mobile, cromatograf Merck-Hitachi Lachrom) a evidențiat un complex de proteine (polipeptide). 27

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. 29
31

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. 33
35

În tabelele următoare, se prezintă compoziția chimică a produsului obținut și conținutul în metale al acestuia. 37

Tabelul 1 39

Compoziția chimică a produsului

Compoziție	Concentrații, %(g/v)	
Conținut în substanță uscată	14,996	41
Proteine totale, reprezentate de polipeptide cu masa cuprinsă între 300 și 420 Da	3,4673	43
Aminoacizi, din care	0,17	45
- Alanina	0,067	47

RO 127733 B1

Tabelul 1 (continuare)

Compoziție	Concentrații, %(g/v)
- 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 2

Conținutul în metale al produsului

Tipul de element	Conținut	
	ppm (μg/g)	mg/100 g
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 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

*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. 11

Volumul de probă maxim administrat a fost de 25 ml/kgc. Animalele au fost supravegheate și observate până la finalul perioadei de 14 zile. 13

Produsul, administrat la șoareci pe cale orală, nu induce fenomene toxice în cazul administrării acestui volum maxim pentru calea orală. 15

Testarea toleranței locale oculare a produsului s-a efectuat în două faze, în administrare unică și repetată, pe iepuri New Zealand. 17

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 h. 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. 23

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) diagnosticate cu glaucom secundar (distopiilor cristalinelor, tumorilor de corp ciliar) și cheratite de diverse etiologii (superficială cronică, eozinofilică, proliferativă secundară cicatrizării, sechestrul cornean). 27

Diagnosticul cazurilor cu glaucom secundar luxației anterioare de cristalin s-a stabilit prin examen clinic oftalmologic, oftalmoscopic, tonometrie și ecografie oculară. Presiunea intraoculară (PIO) a fost măsurată cu Tono Vet la 2 h, la 6 h și la 24 h de la administrarea colirului. 31

Diagnosticul cazurilor de cheratită s-a efectuat prin testul lămpii cu fantă și utilizarea coloranților (fluoresceină). 33

Tratamentul a constat în administrarea a 1-2 picături de 3 ori pe zi, timp de 14 zile, pentru toate afecțiunile luate în studiu. 35

În cazurile de glaucom secundar distopiilor cristalinelor, colirul a prezentat o acțiune moderată de scădere a PIO și lipsa acțiunii hipotensoare în glaucomul secundar tumorilor de corp ciliar. 37

În cazurile de cheratită superficială cronică (a câinelui) și cheratită eozinofilică (a pisicii), s-a constatat o importantă acțiune de reducere a proliferării conjunctive și a neovascularizației corneene. 41

Revendicări

1

3

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): 3,0...5,5% proteine, 0,1...0,2% aminoacizi, 0,4...0,6% carbohidrați, 0,01% clorură de benzalconiu, cu efect de conservant, 0,6% clorură de sodiu, cu efect de izotonizant, până la 100% apă demineralizată, sterilă, pentru administrare oftalmică sub formă de colir.

9

11

2. Procedeu de obținere a unui produs pentru tratament oftalmic, definit în revendicarea 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 o temperatură de 4°C, extractul se separă prin filtrare pe strat de adjuvant de celită sau prin centrifugare și se purifică apoi prin ultrafiltrare pe membrane cu limită de excludere 10 kDa; permeatul obținut se concentrează sub vacuum la un raport 1/6...1/9 (v/v), se adaugă 0,01% (g/v) clorură de benzalconiu și 0,6% (g/v) clorură de sodiu, obținându-se astfel un colir ce se repartizează în flacoane sterile de 5...10 ml.

13

15

17

