



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	102009901716920
Data Deposito	25/03/2009
Data Pubblicazione	25/09/2010

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P		

Titolo

UTILIZZO DELL'ESTRATTO SECCO DI CORTECCIA E DEI SUOI COMPOSTI ASSOCIATI DI JUGLANS REGIA COME POTENZIALI TRATTAMENTI PER LE INFEZIONI BATTERICHE E PROTOZOARIE QUALI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, SALMONELLA ENTERICA SEROVAR TYPHI, STAPHILOCOCCUS AUREUS, TRICHOMONAS VAGINALIS.

DESCRIZIONE

Dell'invenzione avente per titolo:

"Utilizzo dell'estratto secco di corteccia e dei suoi composti associati di *Juglans regia* come potenziali trattamenti per le infezioni batteriche e protozoarie quali *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Staphylococcus aureus*, *Trichomonas vaginalis*."

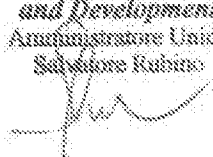
A nome di Sardinia Research and Development srl (SaRD), di nazionalità italiana con sede in Sassari, Strada Vicinale Costa Paloni, traversa, n.1 e domiciliato presso Porto Conte Ricerche, S.P. Porto Conte Capo Caccia Km.8,400, Loc. Tramariglio

Premessa

I batteri e i protozoi patogeni rappresentano uno dei maggiori problemi sanitari per la salute dell'uomo. Le infezioni causate da batteri e protozoi vengono attualmente trattate con differenti farmaci che ne inibiscono la crescita o ne riducono il numero.

Nell'era della multi resistenza agli antibiotici ed ai farmaci in generale, i microrganismi quali protozoi e batteri stanno divenendo sempre più resistenti ai farmaci convenzionali inficiando i trattamenti convenzionali. Uno degli esempi più tipici è dato da ceppi di *Mycobacterium tuberculosis*, di *Salmonella enterica* serovar Typhi multi resistenti (ceppi MDR) ed estremamente resistenti agli antibiotici (XDR), di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina(MRSA), di Enterobatteriacee resistenti agli antibiotici, ed, infine, di *Trichomonas vaginalis* resistente al metronidazolo etc. (1-4). Attualmente i ricercatori ritengono che per ovviare a questo problema, sia molto importante orientare la ricerca biomedica all'ottenimento di analoghi sintetici di farmaci di origine naturale. Sfortunatamente i nuovi analoghi si sono rivelati inefficaci in quanto molti batteri sono portatori di resistenza a questi antibiotici ed esprimono tale resistenza in un tempo molto breve. Per questa ragione è necessario studiare nuove sostanze ad attività antibatterica ed antimicrorganismi in generale che possano essere impiegate contro i microrganismi MDR e che, al contempo, non siano tossiche, siano di facile uso e facilmente reperibile in natura. E, ciò che è più auspicale, siano farmaci a basso costo.

SaRD srl
Sardinia Research
and Development
Amministratore Unico
Salvatore Rubino



Tenendo conto di quanto esposto, abbiamo portato avanti uno studio dettagliato allo scopo di scoprire nuovi agenti antimicrobici derivati dalle piante. Il nostro estratto è un preparato acquoso o alcolico di corteccia disidratata di *Juglans regia* che possiede una effettiva attività antimicrobica, particolarmente antimicobatterica ed anti-protozoaria. *Juglans regia* è un albero comune delle foreste temperate, conosciuto come "walnut tree" e si trova in tutto il mondo (5, 6). La corteccia dell'albero è comunemente utilizzata nella medicina tradizionale dalle donne in diverse parti del mondo, per esempio in Pakistan nella regione North West Frontier Province.

Descrizione dell'invenzione

L'estratto di cui si richiede il brevetto è in soluzione acquosa e/o organica derivata dalla corteccia di *Juglans regia* che possiede attività antimicrobica nei confronti di *Salmonella enterica* serovar Typhi, agente responsabile della Febbre Tifoide. E' noto che questo batterio tende a divenire resistente agli antibiotici usati normalmente nella pratica clinica (7-9). Abbiamo testato le proprietà antibatteriche con numerosi saggi biologici inclusi la diluizione in agar, la micro diluizione in brodo e il metodo della diffusione in agar. L'estratto, ha un effetto inibitorio sulla crescita batterica che abbiamo studiato attraverso studi di cinetica. L'attività antimicrobica è stata osservata a concentrazioni comprese tra 0,5 e 0,1 % del preparato finale. L'estratto su menzionato mostra una forte attività antimicrobica nei confronti di microrganismi Gram positivi quali *Staphylococcus aureus*, responsabile di infezioni cutanee, di setticemia e di altre malattie invasive. L'estratto mostra un'effetto antimicrobico sinergico in combinazione con oxacillina un antibiotico utilizzato per i ceppi di *Staphylococcus aureus* resistenti a oxacillina / meticillina (MRSA). Il forte effetto sinergico è stato valutato tramite titolazione, analisi della curva di crescita e FICI (i.e. ≤ 0.3). L'effetto antimicrobico nei confronti sia dei batteri gram negativi che gram positivi conferma l'ampio spettro di attività antimicrobico della sostanza. In aggiunta il detto estratto mostra di avere attività antimicobatterica nei confronti sia di ceppi di referenza che clinici di *Mycobacterium tuberculosis* e di specie di Micobatteri non tubercolari (MOTT). L'attività antimicobatterica è stata valutata con il metodo di diluizione in agar utilizzando il terreno 7H11 agar. È di particolare interesse che il detto estratto si sia mostrato capace di uccidere ceppi di *Mycobacterium* resistenti agli antibiotici comunemente utilizzati nella pratica clinica denominati MDR e XDR-TB.

Una proprietà dell'estratto, finora non conosciuta, ma da noi messa in evidenza, è quella di avere un'attività contro *Trichomonas vaginalis*, questo protozoo è la principale causa di malattia sessualmente trasmessa. L'estratto ha una azione immediata sulla morfologia e sulla motilità del microorganismo inibendo la sua capacità infettiva e/o la sua adesione alle cellule vaginali umane. I nostri studi hanno evidenziato che l'effetto dell'estratto non dipende dall'associazione tra il bersaglio *Trichomonas vaginalis* e *Mycoplasma hominis* ed è pressochè immediato e prolungato nel tempo.

L'estratto possiede attività antimicrobica nei confronti di *Salmonella enterica* serovar Typhi, agente responsabile della Febbre Tifoide. E' noto che questo batterio tende a divenire resistente agli antibiotici usati normalmente nella pratica clinica (7-9). Tutto ciò è molto importante in quanto l'estratto.

È stato sorprendente scoprire che l'estratto risulta tossico nei confronti di cellule di linea tumorale ma non esplica lo stesso effetto su cellule di linea normali. Per questo motivo noi rivendichiamo le proprietà antitumorali di questo estratto. Esso esercita gli effetti biologici, di quanto asserito, a concentrazioni che sono comprese tra 0,5 e 0,05 % del preparato di base. La composizione dell'estratto in oggetto è ottenuta dalla corteccia secca di *Juglans regia* a concentrazioni comprese tra 5 e 35 % di acqua e/o di solvente/i organici quali etanolo, acetone, metanolo, esano e etil acetato etc. E' possibile includere acqua e/o solvente/i organici per estrarre il/i composto/i bioattivi. Se è presente più di un composto bioattivo, questi possono essere estratti simultaneamente a determinate condizioni chimico-fisiche. In ogni caso, l'ammontare delle sostanze bioattive dipende dalla quantità iniziale di materiale vegetale trattato. Il preparato, o estratto, in o/ solvente/i organici deve essere utilizzato entro un breve periodo di tempo. L'estratto può essere preparato a temperature comprese tra 20°C e 80°C ma è preferibile non effettuare l'estrazione ad alte temperature poiché possono essere persi composti bioattivi. E' importante segnalare che gli effetti biologici dell'estratto possono essere ottenuti sia dopo poche ore che dopo giorni e rimangono effettivi per periodi prolungati. La manifestazione degli effetti biologici è un processo semplice e può essere eseguito in circa 48 ore. Sebbene, la dimostrazione dell'attività antimicobatterica per *Mycobacterium tuberculosis* richieda tempi maggiori (approssimativamente 2 settimane), questo è dovuto alla lenta crescita del microorganismo, tuttavia la procedura non richiede costi aggiuntivi e strumentazioni particolari. La facile

reperibilità del materiale di partenza utilizzato fa sì che questa formulazione non abbia costi elevati. Noi asseriamo che questa composizione potrebbe essere un'alternativa valida a formulazioni di farmaci oggi già presenti sul mercato ma che hanno perso la loro efficacia.

Bibliografia

1. Renuka K, Sood S, Das BK, Kapil A. High-level ciprofloxacin resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhi in India. *J Med Microbiol* 2005;54: 999-1000.
2. Shirakawa T, Acharya B, Kinoshita S, Kumagai S, Gotoh A, Kawabata M. Decreased susceptibility to fluoroquinolones and *gyrA* gene mutation in the *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A isolated in Kathmandu, Nepal, in 2003. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;54: 299-303.
3. Tamang MD, Oh JY, Seol SY, Kang HY, Lee JC, Lee YC, Cho DT, Kim J. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi associated with a class 1 integron carrying the *dfrA7* gene cassette in Nepal. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 30(4):330-5.
4. Giand R, B. Paglietti, M. Murgia, R. Dawar, S. Uzzau, P. Cappuccinelli, M. Deb, P. Aggarwal and S. Rubino. Molecular characterization of ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A causing enteric fever in India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006; 58(6):1139-44.
5. Duke JA. Handbook of Energy Crops. Perdue University, centre for Crops and Plants products. Unpublished. 1983.
6. Rowe B, Ward LR, Threlfall EJ. Multidrug-resistant *Salmonella typhi*: a worldwide epidemic. *Clin Infect Dis* 1997;24(suppl 1) S106-9.
7. Mirza SH. Genetic analysis of multi-drug resistant *Salmonella typhi* from Pakistan and comparison with similar strains from other parts of Southeast Asia. University of Liverpool, MD thesis, 1997.
8. Hasan Z, Rahman KM, Alam MN, Afroza A, Asna ZH, Ghosh FK, Alam N. Role of a large plasmid in mediation of multiple drug resistance in *Salmonella typhi* and paratyphi A in Bangladesh. *Bangladesh Med Res Counc Bull*. 1995; 21(1):50-4.
9. Osman NA, Gaafar SM, Salah el-Din M, Wassel GM, Ammar NM. Hazardous effect of topical cosmetic application of *Deirum* (*Juglans regia* L. plant) on oral tissue. *Egypt Dent J*. 1987; 33(1): 31-35.

RIVENDICAZIONI

1. Utilizzo dell'estratto di *Juglans Regia (Dandasa)* per la cura di patologie sia umane e/o veterinarie causate da batteri Gram positivi, caratterizzato da composto/i estratti dalla corteccia della suddetta pianta per mezzo di soluzioni acquose e /o attraverso l'utilizzo di solventi organici
2. Utilizzo dell'estratto di *Juglans Regia (Dandasa)* in qualità di anti parassitario nei confronti di isolati clinici di *Trichomonas vaginalis*, caratterizzato da composto/i estratti dalla corteccia della suddetta pianta per mezzo di soluzioni acquose e /o attraverso l'utilizzo di solventi organici
3. Utilizzo dell'estratto di *Juglans Regia (Dandasa)* in qualità di anti parassitario nei confronti di infezioni protozoariche dovute ad esempio da *Giardia lamblia*, *Acanthamoeba*, *Pneumocystis carinii* etc., caratterizzato da composto/i estratti dalla corteccia della suddetta pianta per mezzo di soluzioni acquose e /o attraverso l'utilizzo di solventi organici
4. Utilizzo dell'estratto di *Juglans Regia (Dandasa)* in qualità di microrganismi Gram positivi es. *Staphylococcus aureus*, responsabile di infezioni della pelle, setticemie ed altre gravissime patologie, caratterizzato da composto/i estratti dalla corteccia della suddetta pianta per mezzo di soluzioni acquose e /o attraverso l'utilizzo di solventi organici
5. Utilizzo dell'estratto di *Juglans Regia (Dandasa)* in qualità di antitubercolare per *Mycobacterium tuberculosis* e MOTT, caratterizzato da composto/i estratti dalla corteccia della suddetta pianta per mezzo di soluzioni acquose e /o attraverso l'utilizzo di solventi organici
6. Utilizzo dell'estratto di *Juglans Regia (Dandasa)* in qualità di antitubercolare per ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* mono, multi (MDR), ed estremamente resistenti

SaRD srl

Sardinia Research
and Development

Amministratore Unico:
Salvatore Rubino



(XDR) ai farmaci, caratterizzato da composto/i estratti dalla corteccia della suddetta pianta per mezzo di soluzioni acquose e /o attraverso l'utilizzo di solventi organici

7. Utilizzo dell'estratto di *Juglans Regia (Dandasa)* in qualità di antibatterico per patologie mediche quali antibatterico per patogeni della classe delle Enterobacteriaceae, *Clamidia trachomatis*, *Legionella pneumophila* etc., caratterizzato da composto/i estratti dalla corteccia della suddetta pianta per mezzo di soluzioni acquose e /o attraverso l'utilizzo di solventi organici

8. Utilizzo dell'estratto di *Juglans Regia (Dandasa)* in qualità di antitumorale, caratterizzato da composto/i estratti dalla corteccia della suddetta pianta per mezzo di soluzioni acquose e /o attraverso l'utilizzo di solventi organici

9. Utilizzo dell'estratto di *Juglans Regia (Dandasa)* in qualità di antibatterico per batteri patogeni Gram negativi incluso *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Salmonella enterica* serovar Paratyphi ed *Escherichia coli*

10. Composto/i estratti dalla corteccia di *Juglans Regia (Dandasa)* per mezzo di soluzioni acquose e /o attraverso l'utilizzo di solventi organici, caratterizzato come da tutto ciò che è rivendicato

SaRD srl
*Sardinia Research
and Development*
Amministratore Unico
Salvatore Rubino

