



MD 4845 C1 2024.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4845** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A61K 35/64* (2015.01)
A61K 33/30 (2006.01)
A01K 67/033 (2006.01)
A01K 67/04 (2006.01)
A23K 50/90 (2016.01)
A61P 13/08 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 17/18 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2022 0008 (22) Data depozit: 2022.02.07	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2023.02.28, BOPI nr. 2/2023
(71) Solicitant: CIUHRII Ceslav, MD (72) Inventator: CIUHRII Ceslav, MD (73) Titular: CIUHRII Ceslav, MD	

(54) Procedeu de obținere a complexului activ din larve de *Lymantria dispar*

(57) Rezumat:

Invenția se referă la domeniul farmaceutic, și anume la procedee de obținere a preparatelor cu efect antiinflamator, destinate tratamentului hiperplaziei benigne de prostată asociată sau nu cu prostatită cronică.

Procedeul de obținere a complexului activ din larve de *Lymantria dispar*, conform invenției, include creșterea insectelor *Lymantria dispar* până la vârsta a 4-a în condiții controlate pe un mediu standardizat, ce conține, g/kg: făină de grâu 80-95, făină de porumb 82-87, masă vegetală uscată 110-120, lapte uscat degresat 2,5-3,5, miere de albine

17-19, glicerol 10-12, pinobanksin 0,01-0,02, pinocembrin 0,01-0,02, zinc acetat dihidrat 0,03-0,05, apă purificată restul, congelarea larvelor la temperatura de -18°C, spălarea larvelor, mărunțirea primară, liofilizarea, mărunțirea la temperatura de -55°C, ambalarea și păstrarea complexului activ la temperatura de -18°C.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cantității de biomasă cu o activitate biologică și o cantitate de zinc și de aminoacizi proteinogeni, inclusiv cei esențiali, mai mare.

Revendicări: 1

MD 4845 C1 2024.05.31

(54) Process for producing an active complex of *Lymantria dispar* larvae**(57) Abstract:**

1
The invention relates to the field of pharmaceuticals, namely to processes for producing drugs with anti-inflammatory action, intended for the treatment of benign prostatic hyperplasia, associated or not associated with chronic prostatitis.

The process for producing an active complex of *Lymantria dispar* larvae, according to the invention, comprises growing of *Lymantria dispar* insects up to the 4th age under controlled conditions on a standardized medium containing, g/kg: wheat flour 80-95, corn flour 82-87, dry vegetable mass 110-120, powdered skimmed milk 2.5-3.5, bee honey

2
17-19, glycerin 10-12, pinobanksin 0.01-0.02, pinocembrin 0.01-0.02, zinc acetate dihydrate 0.03-0.05, purified water the rest, freezing of larvae at a temperature of -18°C, washing of larvae, primary grinding, lyophilization, grinding at a temperature of -55°C, packaging and storage of the active complex at a temperature of -18°C.

The technical result of the invention consists in increasing the amount of biomass with higher biological activity and the content of zinc and proteinogenic amino acids, including essential ones.

Claims: 1

(54) Способ получения активного комплекса из личинок *Lymantria dispar***(57) Реферат:**

1
Изобретение относится к области фармацевтики, а именно к способам получения препаратов с противовоспалительным действием, предназначенных для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы, связанной или не связанной с хроническим простатитом.

Способ получения активного комплекса из личинок *Lymantria dispar*, согласно изобретению, включает выращивание насекомых *Lymantria dispar* до 4-го возраста в контролируемых условиях на стандартизированной среде, содержащей, г/кг: пшеничную муку 80-95, кукурузную муку 82-87, сухую растительную массу 110-120, сухое

2
обезжиренное молоко 2,5-3,5, пчелиный мед 17-19, глицерин 10-12, пинобанксин 0,01-0,02, пиноцембрин 0,01-0,02, ацетат цинка двухводный 0,03-0,05, очищенную воду остальное, замораживание личинок при температуре -18°C, промывание личинок, первичное измельчение, лиофилизацию, измельчение при температуре -55°C, упаковку и хранение активного комплекса при температуре -18°C.

Технический результат изобретения состоит в повышении количества биомассы с более высокой биологической активностью и содержания цинка и протеиногенных аминокислот, в том числе незаменимых.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la domeniul farmaceutic, și anume la procedee de obținere a preparatelor cu efect antiinflamator, destinate tratamentului hiperplaziei benigne de prostată asociată sau nu cu prostatită cronică.

Este cunoscut un procedeu de obținere a unui complex activ din biomasa larvelor insectei *Tenebrio molitor* în ulei de vaselină. Complexul activ entomologic obținut conform acestui procedeu conține 45-80% de extract entomologic și 55-20% de ulei de vaselină. Acest complex activ se caracterizează prin activitate antioxidantă specifică înaltă și este eficient în afecțiunile de prostată. Activitatea complexului activ în procesul de inhibiție cu 50% a peroxidării lipoproteinelor (CI_{50%}) se manifestă la o concentrație de 16 mg/ml, iar în procesul de inhibiție cu 50% a radicalului oxidului nitric - la o concentrație de 20 mg/ml. Procedeu de obținere a complexului activ include mai multe etape, prima dintre care este obținerea larvelor de *Tenebrio molitor*. În acest scop insectele sunt crescute în crescătorie pe mediu artificial standardizat cu respectarea etapelor specifice. Cea de a doua etapă constă în colectarea și prelucrarea larvelor. Larvele obținute sunt spălate de 4 ori cu 4 volume de apă distilată la fiecare spălare. Dezinfectarea larvelor se face cu ajutorul razelor UV. După aceasta larvele sunt congelate la temperatura de -18°C. Următoarea etapă constă în decongelarea treptată a larvelor în condițiile unei temperaturi de 20-22°C. După aceasta se produce omogenizarea și mărunțirea biomasei în omogenizator cu cuțite de inox la viteza de 5000 rotații pe minut până la obținerea particulelor cu dimensiuni de 9-12 μm. Următoarea etapă constă în extragerea fracționată (fracția hidrosolubilă și fracția liposolubilă) a componentelor bioactive din biomasa de larve. La prima etapă se realizează extragerea componentelor hidrosolubile din biomasa entomologică, după care extractul obținut se separă de restul de biomasă prin filtrare în vid. Extractul hidric se concentrează prin evaporare în vid. Extragerea fracției liposolubile se face cu alcool etilic de 70%. După aceasta extractul obținut se separă prin filtrare, după care extractul se concentrează prin evaporare în vid la 40°C. Ambele extracte se combină, iar extractul total se liofilizează. Extractul total se formulează ca complex entomologic activ în ulei de vaselină cu următoarea componență: extract entomologic total liofilizat 45-80%, ulei de vaselină 55-20%. Complexul entomologic activ este formulat într-un produs farmaceutic în formă de supozitoare, care conțin 250 mg de complex entomologic activ și 1750 mg de gliceride semisintetice [1].

Neajunsul acestui procedeu de obținere a complexului activ entomologic constă în existența în componența etapelor de realizare a procedurii a evaporării în vid a extractului hidric și etanolic cu încălzirea extractelor, ceea ce poate duce la deteriorarea componentelor termolabile ale acestora.

Mai este cunoscut un procedeu de obținere a preparatului entomologic antiinflamator și antioxidant, destinat tratamentului hiperplaziei benigne de prostată, din larvele de insecte din ordinul *Lepidoptera*, genul *Lymantria* prin mărunțirea lor în soluție fiziologică până la formarea unei mase omogene, filtrarea acesteia și eliminarea apei prin liofilizare. Acest preparat conține următoarele componente: proteine 265,0-292,0 mg/g; lipide 140,0 mg/g, colesterol 0,1 mg/g; trigliceride 90,0 mg/g, amilază 5,1 UI/g, lipază 100,0 mUI/g, antioxidanți 16,86 mg/g, aminoacizi esențiali și semiesențiali 379,7 mg/g. Preparatul are efect în inhibarea peroxidării lipidelor [2].

Brevetul nu include descrierea procedurii de creștere a insectelor în scopul obținerii biomasei de larve, substanța activă este extrasă cu soluție fiziologică, ceea ce nu permite extragerea tuturor componentelor bioactive.

Un alt procedeu de obținere a unui preparat entomologic din biomasa larvelor de prima vârstă de *Lymantria dispar* constă în extracție hidroetanolică a componentelor bioactive ale biomasei. Larvele sunt crescute în condiții de crescătorie pe un mediu compus din făină de grâu, mălai, masă vegetală uscată, lapte praf, drojzii uscate, glicerol și miere. Biomasa colectată de larve de *Lymantria dispar* de prima vârstă se spală de 4 ori, de fiecare dată cu un volum de apă care depășește de 4 ori volumul de larve. Larvele se congelează-decongelează. Utilizând un mojar cu cuțite de inox biomasa se amestecă cu viteza de 5000 de rotații pe minut și se fărâmițează până la obținerea particulelor cu dimensiuni de 9-12 μm. Masa obținută este în continuare supusă extragerii timp de 60 min a principiilor bioactive cu soluție hidroetanolică de 20%. Extragerea se face la temperatură constantă (18-20°C) și agitație permanentă pe un agitator orbital cu viteza de rotație de 280 rotații/min (alternativ 240-320 rotații/min). Biomasa se separă prin filtrare în vid, după care urmează liofilizarea extractului [3]. În continuare se obține produsul farmaceutic sub formă de supozitoare rectale, care conține 60% de extract liofilizat.

Dezavantajul procedurii constă în faptul că acesta permite obținerea unui preparat, care constă doar din componentele biomasei, care pot fi extrase cu soluția hidroetanolică de 20%, ceea ce omite o bună parte a componentelor liposolubile. Un alt dezavantaj al acestui procedeu constă în aceea că în calitate de materie primă pentru extragere se utilizează biomasa larvelor de prima vârstă, care se caracterizează prin masă și dimensiuni mici, ceea ce implică scumpirea tehnologiei finale; se efectuează o singură extracție

hidroetanolică cu o durată de 60 min, din care cauză rămân nevalorificate unele dintre componentele active ale biomasei.

De asemenea, mai este cunoscut un procedeu de obținere a unui preparat entomologic din pupe, larve de ultima vârstă (a 5-a sau a 6-a în dependență de gen) și ouă de *Lymantria dispar*, care este inclus într-o compoziție farmaceutică sub formă de supozitoare sau ovule, pentru tratarea hemoroizilor, adenomului de prostată, fibromului uterin [4]. Conform sursei indicate, procedeu include următoarele etape de lucru: colectarea pupelor și larvelor de ultima vârstă ale omizii păroase a stejarului *Lymantria dispar*, începând cu luna iunie, și a ouălor în lunile august-septembrie de pe tulpinile stejarilor și plopilor afectați sau creșterea larvelor și pupelor în condiții speciale de laborator; spălarea materialului biologic și resuspendarea lui în soluție fiziologică; filtrarea și stoarcerea materialului biologic; opțional - congelarea materialului până la utilizarea ulterioară; măcinarea materialului până la obținerea particulelor cu dimensiuni de 9-12 μm; filtrarea prin filtrul Buckner cu placă având 200 de orificii pe cm²; atomizarea în vid a extractului obținut la temperatura de 130-140°C la intrare și 85-90°C la ieșire sau liofilizarea lui timp de 24-30 ore – substanța activă pentru producerea formei farmaceutice; executarea compoziției farmaceutice ce constă din 1% substanță biologică activă sub formă de extract de *Lymantria dispar*, 82% unt de cacao, 10% apă distilată, 2,68% helix, 2% laurat, 1,3% 2-bromo-2-nitropropan, 1% poligliceril-4 izostearat cetil PEG/PPG dimeticon 10/1 și 0,02% dial; condiționarea acestei formule prin topirea și omogenizarea amestecului obținut, cu temperatura de 60°C și turnarea în forme de supozitoare sau ovule și ambalarea lor pentru stocarea ulterioară.

Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că în calitate de materie primă biologică se utilizează trei dintre fazele de dezvoltare a insectei - ouă, larve de ultima vârstă și pupe. Componenta biochimică a larvelor, pupelor și ouălor diferă semnificativ. Activitatea biologică a acestor tipuri de biomasă de asemenea diferă esențial. De exemplu, activitatea antiradicalică a extractului din larve este de 5-7 ori mai mare comparativ cu activitatea ouălor și a pupelor.

De asemenea, a fost demonstrat, că cu înaintarea în vârstă activitatea biologică a larvelor scade, de exemplu activitatea antiradicalică a larvelor de ultimă vârstă este cu cel puțin 30% mai joasă comparativ cu activitatea larvelor de vârsta I. Astfel, un alt dezavantaj este utilizarea larvelor de ultima vârstă, caracterizate prin cea mai joasă activitate antioxidantă.

În același timp sursa selectată nu indică niște proporții pentru obținerea amestecului de larve și pupe. Pornind de la activitatea lor diferită, în cazul aplicării diferitor proporții de larve și pupe, se vor obține produse cu activitate biologică diferită. De asemenea, sursa selectată nu include descrierea procesului de creștere a larvelor și pupelor în condiții de laborator, ceea ce poate fi un factor de variație a cantității și proprietăților biologice ale materialului biologic obținut. Cele expuse fac imposibil controlul asupra componenței substanței active.

Cea mai apropiată soluție de obiectul revendicat constituie un procedeu de obținere a complexului activ din larvele de *Lymantria dispar* de vârsta 3-4, care include creșterea insectelor *Lymantria dispar* în crescătorie pe un mediu standardizat, congelarea larvelor la -18°C, spălarea larvelor, mărunțirea primară a larvelor cu obținerea complexului activ, liofilizarea complexului activ, mărunțirea la temperatură extrem de joasă (-55°C), omogenizarea complexului activ, ambalarea și păstrarea complexului activ în condiții de congelare (-18°C). Aplicarea acestui procedeu asigură obținerea unui preparat cu acțiune antiinflamatoare, care asigură scăderea eliberării interleucinei 8 cu 42% de la valoarea acestui indicu în lipsa preparatului [5].

Dezavantajul acestui procedeu constă în activitatea antiinflamatoare și antioxidantă scăzută a preparatului obținut.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea acțiunii antiinflamatoare și antioxidante a complexului activ de origine entomologică, eficient în afecțiunile de prostată.

Problema se rezolvă prin procedeu de obținere a complexului activ din larve de *Lymantria dispar* care include creșterea insectelor *Lymantria dispar* până la vârsta a 4-a în condiții controlate pe mediu standardizat cu următoarea componență, g/kg:

50	făină de grâu	80-95
	făină de porumb	82-87
	masă vegetală uscată	110-120
	lapte uscat degresat	2,5-3,5
	miere de albine	17-19
55	glicerol	10-12
	pinobanksin	0,01-0,02
	pinocembrin	0,01-0,02
	acetat de zinc dihidrat	0,03-0,05
	apă purificată	restul,

congelarea larvelor la temperatura de -18°C , spălarea larvelor; mărunțirea primară, liofilizarea, mărunțirea la temperatură extrem de joasă (-55°C), ambalarea și păstrarea complexului activ în condiții de congelator (-18°C).

5 Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cantității de biomasă cu o activitate biologică și o cantitate de zinc și de aminoacizi proteinoși, inclusiv cei esențiali, mai mare.

Rezultatul tehnic al invenției se datorează efectelor benefice ale dietei cu conținut de zinc, care este un stimulator recunoscut a multor procese metabolice în celulele vii.

Exemplu de realizare a invenției

10 Creșterea insectelor din specia *Lymantria dispar* include următoarele etape:

1. Pregătirea condițiilor pentru realizarea ciclului vital în crescătorie. Crescătorie de insecte prezintă camere cu suprafața de $15\text{-}20\text{ m}^2$. Pereții sunt vopsiți cu o rășină specială care oferă posibilitatea dezinfectării cu soluții dezinfectante. Pe perimetrul camerei sunt amplasate rafturi cu cutii Rubbermaid obscure. Temperatura în crescătorie se menține la 27°C , iar umiditatea - 75% . Se asigură condiții de fotoperiodism.

15 2. Creșterea insectelor. Insectele mature în număr de 300-500 de indivizi sunt plasate în cutia Rubbermaid. Odată cu începutul ecloziunii, larvele de prima vârstă sunt colectate și plasate în cutii Rubbermaid cu mediu nutritiv, care are următoarea componență:

	făină de grâu	91,45 g
	făină de porumb	85,55 g
20	masă vegetală uscată	117,99 g
	lapte uscat degresat	2,95 g
	miere de albine	17,70 g
	glicerol	11,80 g
	pinobanksin	0,015 g
25	pinocembrin	0,015 g
	acetat de zinc ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,030 g
	apă purificată	627,54 ml.

Larvele sunt crescute până când majoritatea larvelor ating vârsta a 4-a (ziua a 21-23-a din momentul ecloziunii), cu transferuri succesive pe mediu nutritiv proaspăt.

30 3. Obținerea complexului entomologic activ din larve de vârsta a 4 de *Lymantria dispar*. Larvele sunt colectate cu ajutorul pensei și sunt transferate în recipiente speciale pentru congelare. Larvele sunt congelate la temperatura de -18°C . În această formă materia primă poate fi păstrată timp de 24 luni și utilizată în dependență de necesitate.

35 Înainte de utilizare larvele sunt spălate de 2 ori cu câte patru volume de soluție fiziologică și încă de două ori cu câte 4 volume de apă purificată. Această procedură permite înlăturarea perişorilor de pe învelișurile exterioare ale larvelor.

În continuare biomasă este supusă mărunțirii într-un tocător cu cuțite de inox, astfel ca particulele obținute să nu depășească dimensiunea de 2 mm. Complexul activ obținut, numit Adenoprosin Plus, este supus în continuare procesului de liofilizare.

40 Ultima etapă constă în mărunțirea complexului activ liofilizat în moară criogenă la o temperatură extrem de joasă, ceea ce asigură obținerea particulelor disperse cu dimensiunea de până la $200\text{ }\mu\text{m}$.

Complexul activ obținut în modul descris mai sus este ambalat ermetic în pungi de aluminiu și păstrat până la utilizare (pana la 24 luni) în condiții de congelator ($t - 18 \pm 3^{\circ}\text{C}$).

45 Rezultatele obținute în cadrul procedurii revendicate au fost comparate cu rezultatele obținute conform celei mai apropiate soluții. În ultimul caz (soluția apropiată) larvele au fost crescute în condiții de laborator, au fost colectate larve de vârsta a 4-a.

Tabel

Cantitatea de biomasă, conținutul de zinc, conținutul de aminoacizi și activitatea antiinflamatoare a complexului activ conform procedurii revendicate și conform celei mai apropiate soluții*

Parametrul monitorizat	Conform celei mai apropiate soluții	Conform procedurii propus
Cantitatea de biomasă de larve, mg, la 1g de mediu utilizat	53,96 \pm 1,87	68,40 \pm 2,07
Cantitatea de zinc în biomasă, μg la 1 g de biomasă	35,22 \pm 0,54	122,85 \pm 2,12
Cantitatea aminoacizilor proteinoși, mg/g biomasă	332,36 \pm 13,11	507,08 \pm 9,43

Cantitatea aminoacizilor esențiali, mg/g biomasă	149,45±6,18	238,26±21,08
Scăderea cantității de IL ₈ eliberată (% de reducere de la valoarea martor)	42,02±2,63	53,62±0,94
Activitatea antioxidantă Echivalent mg TROLOX /g biomasă	35,64±1,06	41,83±1,38

*Diferențele dintre valorile parametrilor conform celei mai apropiate soluții și conform procedurii propus sunt statistic semnificative, $p < 0,005$.

- 5 Din tabel se vede că procedeul propus este mai eficient din punct de vedere al acumulării de biomasă la un gram de hrană utilizată. Astfel, conform procedurii propus cantitatea de biomasă obținută la o unitate de mediu utilizată este cu 26,8% mai mare ca în cazul celei mai apropiate soluții. De asemenea, calitatea biomasei obținute conform procedurii propus este superioară celei obținute conform celei mai apropiate soluții: conținutul de zinc crește de 3,5 ori, cantitatea aminoacizilor proteinoși crește cu 52,6%, inclusiv a celor esențiali cu 59,4%. Activitatea biologică a biomasei obținute conform procedurii propus este mai mare. Astfel, reducerea cantității de IL₈ eliberată a fost redusă față de martor cu 27,6% mai eficient de complexul activ obținut conform procedurii revendicat comparativ cu cel obținut conform celei mai apropiate soluții. Activitatea antioxidantă a complexului activ obținut conform procedurii propus este cu 17,4% mai mare comparativ cu activitatea complexului obținut conform celei mai apropiate soluții.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. MD 4296 B1 2014.08.31
2. MD 2788 F1 2005.06.30
3. Ciuhrii V. Biotehnologia obținerii formei medicamentoase pentru tratarea hiperplaziei benigne de prostată. Teză de doctor în biologie. Chișinău, 2010, 129 p.
4. RO 122332 B1 2009.04.30
5. MD 4713 B1 2020.09.30

(57) Revendicări:

Procedeu de obținere a complexului activ din larve de *Lymantria dispar*, care include creșterea insectelor *Lymantria dispar* până la vârsta a 4-a în condiții controlate pe un mediu standardizat, ce conține, g/kg:

făină de grâu	80-95
făină de porumb	82-87
masă vegetală uscată	110-120
lapte uscat degresat	2,5-3,5
miere de albine	17-19
glicerol	10-12
pinobanksin	0,01-0,02
pinocembrin	0,01-0,02
acetat de zinc dihidrat	0,03-0,05
apă purificată	restul,

congelarea larvelor la temperatura de -18°C, spălarea larvelor, mărunțirea primară, liofilizarea, mărunțirea la temperatura de -55°C, ambalarea și păstrarea complexului activ la temperatura de -18°C.