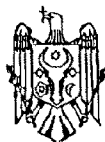




MD 4713 C1 2021.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4713** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A61K 35/64* (2015.01)
A01K 67/033 (2015.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2018 0055 (22) Data depozit: 2018.07.19 (41) Data publicării cererii: 2020.02.29, BOPI nr. 2/2020	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.09.30, BOPI nr. 9/2020
(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:

1
Invenția se referă la domeniul farmaceutic și anume la preparatele cu efect antiinflamator, destinate tratamentului hiperplaziei benigne de prostată asociată sau nu cu prostatita cronică.

Esența invenției constă în aceea că se propune un procedeu de obținere a complexului activ din larve de *Lymantria dispar*, care include creșterea insectelor de *Lymantria dispar* până la vârsta 3...4-a în condiții artificiale pe mediu standardizat cu următoarea componență (la 1 kg de mediu):

făină de grâu 80...95 g
făină de porumb 82...87 g
masă vegetală uscată 110...120 g

2
lapte uscat degresat 2,5...3,5 g
miere de albine 17...19 g
glicerol 10...12 g
pinobanksin 0,01...0,02 g
pinocembrină 0,01...0,02 g
apă purificată 696,5...663,5 ml,
apoi larvele se congelează la temperatura de -18°C, după care larvele se spală, se mărunțesc primar pentru obținerea complexului activ, care se liofilizează, complexul activ obținut se mărunțește la temperatura de -55°C, se omogenizează complexul activ, se ambalează și se păstrează la temperatura de -18°C.

Revendicări: 1

MD 4713 C1 2021.04.30

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

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

Summary of the invention consists in that a process for producing an active complex of *Lymantria dispar* larvae is proposed, which includes growing of *Lymantria dispar* insects up to 3...4 years old in artificial conditions on a standardized medium, of the following composition (per 1 kg of medium):

wheat flour	80...95 g
corn flour	82...87 g
dry vegetable mass	110...120 g
powdered skimmed	2.5...3.5 g

2
milk
bee honey 17...19 g
glycerin 10...12 g
pinobanksin 0.01...0.02 g
pinocembrin 0.01...0.02 g
purified water 696.5...663.5 mL,
then the larvae are frozen at a temperature of -18°C, after which the larvae are washed, primarily ground to obtain an active complex that is lyophilized, the resulting active complex is ground at a temperature of -55°C, the active complex is homogenized, packaged and stored at a temperature of -18°C.

Claims: 1

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

1
Изобретение относится к области фармацевтики, а именно к препаратам с противовоспалительным действием, предназначенным для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы, ассоциированной или не ассоциированной с хроническим простатитом.

Сущность изобретения состоит в том, что предлагается способ получения активного комплекса из личинок *Lymantria dispar*, который включает выращивание насекомых *Lymantria dispar* до 3...4-го возраста в искусственных условиях на стандартизированной среде, следующего состава (на 1 кг среды):

мука пшеничная	80...95 г
мука кукурузная	82...87 г

2
сухая растительная масса 110...120 г
сухое обезжиренное молоко 2,5...3,5 г
пчелиный мед 17...19 г
глицерин 10...12 г
пинобанксин 0,01 ... 0,02 г
пиноцембрин 0,01 ... 0,02 г
очищенная вода 696,5 ... 663,5 мл,
затем личинок замораживают при температуре -18°C, после чего личинок промывают, первично измельчают для получения активного комплекса, который лиофилизируют, полученный активный комплекс измельчают при температуре -55°C, активный комплекс гомогенизируют, упаковывают и хранят при температуре -18°C.

П. формулы: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Invenția se referă la domeniul farmaceutic și anume la preparatele cu efect antiinflamator, destinate tratamentului hiperplaziei benigne de prostată asociată sau nu cu prostatita cronică.

10 Este cunoscut un procedeu de obținere a unui complex activ în ulei de vaselină, de origine entomologică - biomasa larvelor de *Tenebrio molitor*, care conține 45...80% extract total entomologic și 55...20% ulei de vaselină, eficient în afecțiunile de prostată, caracterizat prin activitate antioxidantă specifică înaltă: la raportul de inhibiție a peroxidării lipoproteinelor ($CI_{50\%}$ - 16 mg/ml) și inhibiție a radicalului oxidului nitric ($CI_{50\%}$ - 20 mg/ml). Obținerea complexului activ prezintă un proces tehnologic complex, care include: creșterea insectelor de *Tenebrio molitor* în crescătorie pe mediu artificial standardizat; spălarea larvelor cu 4 volume de apă distilată, repetând procedura de 4 ori; dezinfectarea larvelor cu raze UV; congelarea larvelor la temperatura de -18°C; decongelarea larvelor prin creșterea treptată a temperaturii până la nivelul temperaturii camerei; omogenizarea biomasei în omogenizator cu cuțite de inox la viteza de 5000 rot./min până la obținerea particulelor cu dimensiuni de 9...12 μm; extragerea cu apă distilată a componentelor hidrosolubile din biomasa entomologică; separarea extractului de biomasă prin filtrare în vid; concentrarea extractului prin evaporare în vid până la volumul rezultat de 250 ml; extragerea cu alcool etilic de 70% a componentelor solubile în alcool; separarea extractului prin filtrare în vid, concentrarea extractului prin evaporare în vid la temperatura de 40°C până la volumul restant de 100 ml; combinarea ambelor extracte; liofilizarea extractului total; condiționarea extractului total în formă de complex entomologic activ în ulei de vaselină cu următoarea componență: extract entomologic total liofilizat - 45...80%; ulei de vaselină - 55...20%.

25 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 excipienți [1].

30 Dezavantajul acestui complex și a tehnologiei de obținere a lui constă în faptul, că pe durata fluxului tehnologic sunt mai multe puncte critice, care pot compromite calitatea complexului.

35 Acestea sunt: concentrarea prin evaporare în vid a extractului hidric și concentrarea prin evaporare în vid a extractului etanolic. În ambele cazuri are loc o încălzire esențială, ceea ce duce la deteriorarea componentelor termolabile ale extractelor entomologice.

40 Mai este cunoscut un preparat entomologic antiinflamator și antioxidant, destinat tratamentului hiperplaziei benigne de prostată și procedeul de obținere a lui. Conform celor indicate în descriere, preparatul entomologic antiinflamator și antioxidant, obținut 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, care 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. Acțiunea antioxidantă a preparatului este determinată de compușii antioxidanți hidrosolubili ce se manifestă prin inhibarea peroxidării lipidelor [2].

45 Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul, că nu este indicat procedura de cultivare a insectelor în scopul obținerii biomasei de larve, substanța activă este extrasă cu apă, din care cauză preparatul conține doar componente antioxidante hidrosolubile.

50 Mai este cunoscut un procedeu de obținere a unui preparat entomologic obținut din biomasa larvelor de prima vârstă de *Lymantria dispar* prin extracție hidro-etanolică. Larvele de *Lymantria dispar* sunt crescute în condiții de laborator pe un mediu compus din făină de grau, mălai, masă vegetală uscată, lapte praf, drojdii uscate, glicerol și miere. Biomasa colectată de larve de *Lymantria dispar* de prima vârstă se spală cu 4 volume de apă distilată, repetând procedura de 4 ori. După aceasta biomasa se dispersează timp de 15 min într-o soluție de NaCl de 0,9%. Larvele se congelează. Biomasa congelată se supune decongelării prin aducerea treptată la temperatura camerei. Utilizând un mojar cu cuțite de inox, biomasa se amestecă la viteza de 5000 rot./min și se fărâmițează până la particule cu dimensiuni de 9...12 μm. Masa obținută este în continuare supusă extragerii substanțelor

bioactive cu soluție hidro-etanolică de 20%. Extragerea durează 60 min în condiții de temperatură constantă (18...20°C) la agitație permanentă pe un agitator orbital cu viteza de 280 rot./min (alternativ 240...320 rot./min), se separă de biomasă prin filtrare în vid, după care urmează liofilizarea extractului [3].

- 5 În continuare se obține produsul farmaceutic sub formă de supozitoare rectale, care conțin 60% extract liofilizat.

Dezavantajul procedurii constă în faptul, că acesta permite obținerea unui preparat, care constă doar din componente ale biomasei, care pot fi extrase cu soluție hidro-etanolică de 20%, ceea ce omite majoritatea componentelor liposolubile.

- 10 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 duce la scumpirea tehnologiei finale; se efectuează o singură extracție hidro-etanolică cu o durată de 60 min, din care cauză rămân nevalorificate unele dintre componentele active ale biomasei.

- 15 Cea mai apropiată soluție constituie 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) 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.

- 20 Conform sursei indicate, procedeul include următoarele etape de lucru: colectarea pupelor, larvelor de ultima vârstă ale omizii păroase a stejarului (*Lymantria dispar*) începând cu luna iunie și a ouălor în lunile august și 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 esorarea materialului biologic; opțional - congelarea materialului până la utilizarea ulterioară; 25 măcinarea materialului până la obținerea particulelor cu dimensiuni de 9...12 μm; filtrarea prin filtrul Bucker cu placă având 200 orificii pe cm²; atomizarea în vid a extractului obținut la temperatura de 130...140°C la intrare și 85...90°C la ieșire cu liofilizarea lui timp de 24...30 ore – substanța activă pentru producerea formei farmaceutice; executarea compoziției farmaceutice ce include 1% de 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 dimetican 10/1 și 0,02% dial; condiționarea acestei formule prin topirea și omogenizarea amestecului obținut la temperatura de 60°C și turnarea în forme de supozitoare sau ovule și ambalarea lor pentru stocarea ulterioară [4].

- 35 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 40 activitatea oualor 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 ultima vârstă este cu cel puțin 30% mai joasă comparativ cu activitatea larvelor de vârsta I. Astfel, un alt dezavantaj al celei mai apropiate soluții este utilizarea larvelor de ultima vârstă, caracterizată prin cea 45 mai joasă activitate antioxidantă.

- În același timp, sursa selectată în calitate de cea mai apropiată soluție 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 50 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.

- Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de obținere a unui complex activ nou de origine entomologică, care asigură calitatea și 55 eficiența produsului, realizând succesiv toate etapele tehnologice: creșterea insectelor, obținerea complexului activ, în baza utilizării unei cantități rezonabile ale complexului activ, cu acțiune antiinflamatoare, eficientă în afecțiunile de prostată.

Esența invenției constă în aceea că se propune un procedeu de obținere a complexului activ din larve de *Lymantria dispar*, care include creșterea insectelor de

Lymantria dispar până la vârsta 3...4-a în condiții artificiale pe mediu standardizat cu următoarea componență (la 1 kg de mediu):

	făină de grâu	80...95 g
	făină de porumb	82...87 g
5	masă vegetală uscată	110...120 g
	lapte uscat degresat	2,5...3,5 g
	miere de albine	17...19 g
	glicerol	10...12 g
	pinobanksin	0,01...0,02 g
10	pinocembrină	0,01...0,02 g
	apă purificată	696,5...663,5 ml,

apoi larvele se congelează la temperatura de -18°C, după care larvele se spală, se mărunțesc primar pentru obținerea complexului activ, care se liofilizează, complexul activ obținut se mărunțește la temperatura de -55°C, se omogenizează complexul activ, se ambalează și se păstrează la temperatura de -18°C.

Rezultatul tehnic al invenției în comparație cu cea mai apropiată soluție constă în faptul că procedeul de obținere a complexului activ permite valorificarea componenței biochimice totale a larvelor de *Lymantria dispar* de vârsta 3...4-a, iar efectuarea procesului de mărunțire a biomasei de larve după liofilizare se realizează în condiții de temperaturi extrem de joase (-55°C), care asigură păstrarea componenței biochimice integrale a materiei prime cu obținerea unui produs cu un grad foarte înalt de omogenitate.

Rezultatul tehnic al invenției se datorează valorificării integrale a complexului de substanțe bioactive din componența biomasei larvelor de vârsta 3...4-a și evitării procedurilor, care pot provoca degradarea componentelor termolabile ale complexului activ.

Exemplu de realizare a invenției

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...20 m². 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.

2. Creșterea insectelor. Insectele mature în număr de 300...500 de indivizi sunt plasate în cutia Rubbermaid și sunt hrănite exclusiv cu tărațe de grâu de calitate superioară. 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
	masă vegetală uscată	117,99 g
40	lapte uscat degresat	2,95 g
	miere de albine	17,70 g
	glicerol	11,80 g
	pinobanksin	0,015 g
	pinocembrină	0,015 g
45	apă purificată	627,57 ml.

Larvele sunt crescute timp de 21 zile din momentul ecloziunii, cu transferuri succesive pe mediu nutritiv proaspăt.

3. Obținerea complexului entomologic activ din larve de vârsta 3...4-a 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.

Înainte de utilizare larvele sunt spălate de 2 ori cu câte patru volume de soluție fiziologică de 0,9% și apoi de două ori cu a câte 4 volume de apă purificată. Această procedură permite înlăturarea perişorilor de pe învelișurile exterioare ale larvelor.

În continuare biomasa este supusă mărunțirii într-un toculator cu cutite de inox, astfel, ca particulele obținute să nu depășească dimensiunea de 2 mm. Complexul activ obținut este supus în continuare procesului de liofilizare.

Ultima etapă constă în mărunțirea complexului activ lioflizat în moara criogenă la o temperatură extrem de joasă, ceea ce asigură obținerea particulelor disperse cu dimensiunea de până la 200 μm .

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

10 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 pe mediul revendicat (p.2 din exemplu), au fost colectate larve de vârstă 5...6-a (ultima), în cea de-a 35 zi după ecloziunea larvelor din ouă.

Cantitatea de biomasă și activitatea antiinflamatoare a complexului activ conform procedurii revendicate și conform celei mai apropiate soluții

Tabel

Parametrul monitorizat	Conform celei mai apropiate soluții	Conform procedurii propuse în invenție
Cantitatea de biomasă de larve, mg, la 1 g de mediu utilizat	51,07 $\pm$ 0,74	53,96 $\pm$ 1,87*
Scăderea cantității de IL ₈ eliberată (% de reducere de la valoarea martor)	27,75 $\pm$ 3,15	42,02 $\pm$ 2,63**

15 *P=0,047 (<0,05)

**P=0,004 (<0,005)

Din tabel se vede, că procedeul propus este mai eficient din punct de vedere a acumulării de biomasă la un gram de hrană utilizată. Astfel, la 1 g de hrană în procedeul revendicat s-au obținut 53,96 $\pm$ 1,87 mg larve, iar în soluția cea mai apropiată - 51,07 $\pm$ 0,74.

20 Cantitatea de IL₈ eliberată a fost redusă de către complexul activ obținut conform procedurii revendicate cu 42,02 $\pm$ 2,63%, iar în cazul complexului activ obținut conform celei mai apropiate soluții - cu doar 27,75 $\pm$ 3,15% față de nivelul martor.

(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 forme medicamentoase pentru tratarea hiperplaziei benigne de prostată. Teza de doctor în biologie. Chișinău, 2010, 129 p.
4. RO 122332 B1 2009.04.30

(57) Revendicări:

Procedeu de obținere a complexului activ din larve de *Lymantria dispar*, care include creșterea insectelor de *Lymantria dispar* până la vârsta 3...4-a în condiții artificiale pe mediu standardizat cu următoarea componență (la 1 kg de mediu):

făină de grâu	80...95 g
făină de porumb	82...87 g
masă vegetală uscată	110...120 g
lapte uscat degresat	2,5...3,5 g
miere de albine	17...19 g
glicerol	10...12 g
pinobanksin	0,01...0,02 g
pinocembrină	0,01...0,02 g
apă purificată	696,5...663,5 ml,

apoi se congelează larvele la temperatura de -18°C, după care larvele se spală, se mărunțesc primar pentru obținerea complexului activ, care se liofilizează, complexul activ obținut se mărunțește la temperatura de -55°C, se omogenizează complexul activ, se ambalează și se păstrează la temperatura de -18°C.

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii		
(21) Nr. depozit: a 2018 0055 (22) Data depozit: 2018.07.19 (71) Solicitant: CIUHRII Ceslav, MD (54) Titlul: Procedeu de obținere al complexului activ din larve de <i>Lymantria dispar</i>		
II. Clasificarea obiectului invenției:		
(51) Int.Cl: A61K 35/64 (2015.01); A01K 67/033 (2015.01)		
III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)		
MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): Int.Cl: A61K 35/64 (2015.01); A01K 67/033 (2015.01) <i>Lymantria dispar</i> , prostatită, adenoma prostată "Worldwide" (Espacenet): Int.Cl: A61K 35/64 (2015.01); A01K 67/033 (2015.01) <i>Lymantria dispar</i> , prostatitis, prostate adenoma EA, CIS (Eapatis): Int.Cl: A61K 35/64 (2015.01); A01K 67/033 (2015.01) <i>Lymantria dispar</i> , простатит, аденома простаты SU (certificate de autor): Int.Cl: A61K 35/64 (2015.01); A01K 67/033 (2015.01) <i>Lymantria dispar</i> , простатит, аденома простаты Patsearch –Int.Cl: A61K 35/64 (2015.01); A01K 67/033 (2015.01) <i>Lymantria dispar</i> , prostatitis, prostate adenoma		
IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate		
V. Documente considerate a fi relevante		
Categorie*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 4296 B1 2014.08.31	1, 3-7
Y	MD 2788 F1 2005.06.30	1, 3-7
Y	Ciuhrii V. Biotehnologia obținerii formei medicamentoase pentru tratarea hiperplaziei benigne de prostată. Teza de doctor in biologie. Chișinău, 2010, 129 p.	1, 3-7
Y	RO 122332 B1 2009.04.30	1, 3-7
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția	
X – document de relevanță deosebită: invenția	E – document anterior dar publicat la data depozit	

revendicăta nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicăta nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării 2020.06.30	
Examinator GROSU Petru	