



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00665

(22) Data de depozit: 19.09.2012

(41) Data publicării cererii:
28.06.2013 BOPI nr. 6/2013

(71) Solicitant:
• HIPOCRATE 2002 SERV S.R.L.,
STR. PRAHOVA NR.6, PARTER,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• MIHĂESCU GHEORGHE, STR. PRAHOVA
NR. 5, SC. B, ET. 1, AP. 6, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPOZIȚIE CU BIODISPONIBILITATE CRESCUTĂ
A EMBRIO-PEPTIDELOR ADMINISTRATE ORAL ȘI
PROCEDEU DE OBTINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție utilizată ca supliment nutritiv, și la un procedeu de obținere a acesteia. Compoziția conform invenției este alcătuită din extract embrionar heterolog, standardizat în embryo-peptide, maltodextrină, drojdie seleniată, drojdie cromiată, zinc chelat în embryo-peptide, piridoxină, amestec de peptide cationice, formate prin hidroliza enzimatică din vitelus și albuș de ou rămase după prelevarea embrionilor, cu activitate antitripsinică și de stimulare a endocitozei, taurocolat de sodiu, bioxid de siliciu expandat, stearat de magneziu, metilparaben și propilparaben. Procedeu conform invenției cuprinde obți-

nera și dezintegrarea materialului biologic, diluarea cu apă sterilă, omogenizarea și disocierea factorilor de creștere embrionaride pe receptorii lor solubili, concentrarea embryo-peptidelor prin ultrafiltrare tangențială, denaturarea embryo-proteinelor și amestecarea embryo-peptidelor cu proteinele denaturate, obținerea peptidelor cationice și adăugarea lor și a celorlalte componente peste amestecul embryo-peptide-embrioproteine, omogenizarea și uscarea prin pulverizare a amestecului final.

Revendicări: 7



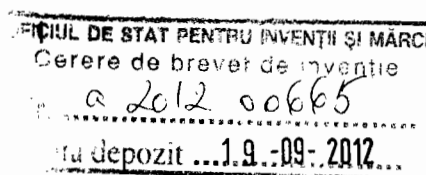
COMPOZITIE CU BIODISPONIBILITATE CRESCUTA A EMBRIO-PEPTIDELOR ADMINISTRATE ORAL SI PROCEDEU DE OBTINERE

Invenția se referă la o compoziție standardizată în embryo-peptide heterologe active pe celulele umane, care, atunci când sunt administrate oral, ca supliment nutritiv, pentru re-echilibrarea metabolică și reglarea tulburărilor metabolice la subiecții umani, prezintă o biodisponibilitate crescută a embryo-peptidelor constituente, și la un procedeu de obținere a acestei compoziții de supliment nutritiv.

Sunt cunoscute mai multe compoziții, sau procedee care conduc la obținerea unor astfel de compoziții, pe baza extractelor de embrioni heterologi, de vertebrate sau din primele stadii din ciclul de dezvoltare a insectelor. Brevetul OSIM 74872 (publicat și ca EP 0043842, WO102106, US4405602, GB2079602) descrie un procedeu pentru obținerea unui produs biologic activ din albine, prin triturarea larvelor de trântori, recoltate în a 10-a zi de când ouăle nefertilizate au fost depuse, împreună cu întreg conținutul nutritiv ale celulelor fagurelui cu puiet de trântor, prin omogenizarea și filtrarea amestecului pentru obținerea unui produs proaspăt, care, atunci când este necesar, poate fi liofilizat pentru a obține un produs standard deshidratat. Toate etapele procedurii de mai sus sunt realizate în condiții aseptice. Compoziția este revendicată ca având proprietăți de: re-echilibrarea metabolismului, prin stimularea anabolismului, reglarea ciclului menstrual, creșterea libidoului și a spermatogenezei la bărbați, și îmbunătățirea proceselor cognitive (C. Mateescu, Apiterapia, Ed. Fiat Lux, București, 2005).

Brevetul OSIM 107551 se referă la un procedeu pentru obținerea unui extract biostimulator pe bază de ouă embrionate, în special ouă de găină embrionate, care este revendicat ca având o acțiune de re-echilibrare metabolică prin stimularea catabolismului. Revendicări similare referitoare la stimularea catabolismului se regăsesc în brevetul OSIM 107550 nu numai pentru extractul de ouă embrionate de găină, dar și pentru cel din ouă embrionate de fluture de mătase.

Cererea de brevet CA 2197050 dezvăluie o compoziție obținută din ouă cu coajă incubate, ouă de păsări, și în particular ouă de găină, care este utilă în prevenirea și tratamentul cancerului. O activitate similară de prevenire și tratament



al cancerelor de către extractele embrionare heterologe este descrisă de brevetul EP0929308 (publicat și ca WO9811905; ITMI 961945; ES 2181004; DE69714856; AU3258097; AT222499). Compozițiile au fost obținute din extracte embrionare prelevate de la specii care includ păstrăv în stadiile de dezvoltare embrionare de la 5 la 20 somite, pește zebra, *Brachydanoï rerio*, în stadiul de dezvoltare embrionară de medioblastula – gastrula și musculița de oțet, *Drosophila melanogaster*, în stadiul de dezvoltare embrionară blastoderma, și au fost revendicate ca fiind eficiente nu numai pentru tratarea tumorilor, dar și a altor patologii controlate de anti-oncogena p53, atunci când sunt administrate pe cale parenterală, orală sau topică.

Brevetul US 5641517 (publicat și ca NZ254859, JPH08502041, IS4057, WO9403192, FI950369, EP0656781, DE69327585, CN1098625, CN1100545, CA2141197, AU4715093, AT188609) descrie o compoziție obținută printr-un procedeu de extracție din ouă de pasăre fertilizate incubate, uscate fără a fi preparate prin metodele uzuale de procesare a alimentelor, în care ouăle fertilizate sunt incubate de la stadiul blastodermal la stadiul protoembrionar. Această compoziție, opțional împreună cu unul sau mai mulți agenți purtători sau excipienți compatibili, este administrată oral, în cantități zilnice corespunzătoare a 1 până la circa 50 de grame de substanță uscată, și este revendicată ca având o acțiune de creștere a libidoului și/sau a nivelului de testosteron seric.

Ouăle fertilizate incubate, și în particular un extract din ouăle fertilizate incubate, au fost revendicate prin cererea de brevet internațională WO2010130980 (publicată și ca US2012107411, GB2471827, EP2429537, CA2761384) ca având beneficii fiziologice suplimentare, în special în reducerea stresului, ca stres perceput negativ, și în reducerea anxietății tuturor subiecților la care a fost administrat, în special în cazul subiecților stresați cronic, și în normalizarea nivelurilor de cortizol în subiecți stresați cronic sau ne-stresați, ca răspuns la stresul acut.

Cererea de brevet SUA US20110200737 revendică o compoziție de supliment nutritiv, obținută pe baza unui extract din ouă de găină, fertilizate și incubate, destinat îmbunătățirii activității creierului. Formularea inventivă revendicată folosește ouăle fertilizate incubate timp de 9-10 zile pentru a obține di- și tri-peptide, constituite din aminoacizi, cu o activitate fiziologică ridicată.



Transportul rapid al acestor di- și tri-peptide prin bariera intestinală este exploatat suplimentar prin adăugarea de proteine marine care conțin cantități ridicate de glicocol, cum ar fi cartilagiul de rechin sau proteine vegetale, pentru a livra doze cu acțiune puternică în neurosistem.

Cea mai convenabilă modalitate de administrare a unor astfel de compoziții, pe bază de extracte de embrioni heterologi de vertebrate sau din primele stadii din ciclul de dezvoltare a insectelor, este calea orală, care este cea mai convenabilă pentru auto-administrare, permite notificarea ca supliment nutritiv și elimină posibilele reacții alergice, care pot apărea în cazul căilor parenterale de administrare. Ingredientele active din aceste compoziții pe bază de extracte embrionare heterologe au fost considerate ca fiind aminoacizi, prehormoni și vitamine. (Brevetul OSIM 74872, brevetul US 5641517) sau di- și tri-peptide (Cererea de brevet SUA US20110200737). Dar astfel de ingrediente nu sunt ingrediente specifice numai extractelor embrionare. În cantitățile de ordinul gramelor din extractele embrionare heterologe, administrate ca supliment nutritiv, aminoacizii, (pre)hormonii și vitaminele nu sunt în doze suficiente pentru a declanșa răspunsurile fiziologice revendicate prin brevetele care protejează diferitele compoziții pe bază de extracte embrionare heterologe și/sau a procedeelelor de obținere corespunzătoare. Embrio-peptide de dimensiuni mai mari, în special cele cu activitate de factori de creștere, care sunt specific prezente embrionii de vertebrate sau din primele stadii din ciclul de dezvoltare a insectelor, au fost considerate ca fiind ingredientele active ale acestor extracte embrionare, în special a extractelor din embrioni de pui de găină / ouă fertilizate de găină incubate care explică convingător efectele fiziologice (Mihăescu G., Olinescu R., Oancea F., 2005, *Rom. J. Intern. Med.* **43**:133–9; Mihăescu G., Olinescu R., Grigorescu A., 2006, , *Rom. J. Intern. Med.* **44**:443-53; Schult J., Hero T., Hellhammer J., 2010, *Clin. Nutr.* **29**:255–260). Astfel de factori de creștere, prezenți în mod specific în extractele embrionare, sunt puternic conservate în timpul evoluției (de ex. factorii de creștere similari insulinei sunt membrii ai superfamiliei insulinei, fiind puternic conservați în decursul evoluției, conform recenziei lui Rotwein P., 1991, *Growth Factors* **5**:3–18).

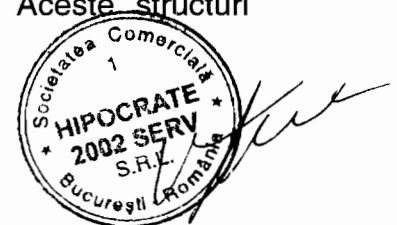
Brevetul SUA 4,908,206 dezvăluie un nou procedeu de obținere a unui extract din organe de embrioni de mamifere, care este liber de constituenți



nepolari și de constituenți cu masă moleculară mare. Extractul este preparat conform unui nou procedeu de extracție, în care prima etapă de extracție a organelor embrionare fin divizate este realizată cu un amestec de apă și solvenți organici miscibili cu apă, sau cu un amestec de solvenți organici miscibili cu apă. În acest amestec utilizat pentru prima etapă de extracție amestecul de solvenți organici miscibili cu apă reprezintă cel puțin 70% față de volumul total al amestecului de extracție și are o valoare de pH neutră, pentru a evita degradarea proteinelor cu masă moleculară mare. Extractul recuperat conform procedurii conține numai acei constituenți polari care au o masă moleculară mai mică de 5 kDa, care au erau prezenți în organele proaspete ale embrionilor de mamifere și nu conține compuși care să fie rezultați prin degradarea structurilor proteice. Compoziția obținută prin procedeul descris de patentul 4,908,206 nu este destinată administrării orale, ci pentru uz topic, ca tratament al acneei vulgare. Limita de 5 kDa este sub valoarea masei moleculare a unora din factorii de creștere peptidici prezenți în extractele embrionare (IGF-1 are o masă moleculară calculată de 7649 Da, în conformitate cu Rinderknecht E., Humbel R.E., 1978, *J. Biol. Chem.* **253**:2769–277), astfel încât acești factori de creștere sunt excluși din preparatele obținute prin procedeul dezvăluit de Brevetul US 4,908,206.

Brevetul OSIM 119509 descrie o compoziție pe bază de extracte embrionare de pasăre, îmbogățită în peptide cu masa moleculară mai mică de 10 kDa printr-un procedeu de gel-cromatografie batch, care conține stimulatori ai absorbției intestinale a peptidelor (taurocolat de sodiu) și inhibitori tripsinici. Această compoziție concepută pentru a asigura o mai bună rezistență a peptidelor embrionare la degradarea de către proteazele din sistemul digestiv / duoden și pentru o mai bună absorbție a embrio-peptidelor prin bariera intestinală.

În pofida prezenței inhibitorilor tripsinici și a stimulatorilor de absorbție a peptidelor compoziția prezentată prin brevetul RO115,509 continuă să prezinte o variabilitate ridicată a răspunsurilor fiziologice ale subiecților umani în cazul administrării orale. Una dintre cauze este datorată faptului că embrio-peptidele biologice active din extractul embrionar inițial, și în mod special cele cu activitate de factori de creștere, sunt legate de liganzi specifici, receptori celulari sau solubili – cum sunt Proteinele de Legare a Factorului de Creștere similar Insulinei, IGFBPs - Insulin like Growth Factor Binding Proteins, pentru IGF-uri. Aceste structuri



macromoleculare complexe, în care factorii de creștere sunt legați de liganzii lor specifici cu o afinitate ridicată, au o masă moleculară mai mare de 10 kDa, nu pot fi îmbogățite în compoziția realizată prin procedeul dezvoltat de brevetul OSIM 115,509 și determină în final o absorbție variabilă prin bariera intestinală, fiind responsabile de variabilitatea ridicată a răspunsurilor fiziologice ale subiecților umani în cazul administrării orale. Procedeul de îmbogățire prin gel-cromatografie batch determină o diluare a extractelor, înlăturarea excesului de apă determinând costuri suplimentare, astfel încât este nevoie de un procedeu care să asigure randamente superioare de îmbogățire în embryo-peptide, cu o diluare redusă a extractului final.

Este necesară deci introducerea în procedeele de obținere a extractelor embrionare standardizate în embryo-peptide a unei etape de disociere a factorilor de creștere din complexe afine cu receptorii lor, în special cu receptorii lor solubili. Factorii de creștere similari insulinei, care au fost demonstrați a fi unul dintre principalele ingrediente active ale preparatelor cu embryo-peptide (Mihăescu G., Olinescu R., Grigorescu A., 2006, *Rom J Intern Med.* **44**:443-53) sunt disociați de receptorii lor solubili IGFB-5, prezenți în cantități semnificative în embrionul de găină, de către ionii de Zn^{2+} (McCusker M.H., Novakofski J., 2004, *J. Endocrin.* **180**: 227–246). Ionii Zn^{2+} trebuie însă introduși în exact cantitatea stoichiometric necesară pentru disocierea IGF-urilor de IGFB-uri, cu evitarea excesului de ioni care pot determina reasocierea altor embryo-peptide cu activitate fiziologică. Folosirea compușilor insolubili de zinc, cum este oxidul sau carbonatul de zinc, ar permite evitarea excesului de ioni Zn^{2+} . Reacția de chelatare IGF - ioni Zn^{2+} deplasează echilibrul produsului de solubilitate al compușilor de zinc insolubili, în special al carbonatului de zinc, dar formarea unor chelați peptidici din compuși insolubili, săruri, oxizi / hidroxizi ai metalelor necesită cantități mari de apă și o perioadă lungă pentru desfășurarea reacției, așa cum este descris procedeul protejat de patentul US 4,830,716. Timpul de reacție îndelungat și necesitatea de a usca prin pulverizare suspensii diluate determină un risc ridicat de contaminare microbiană și, respectiv, costuri mari de fabricație. Este deci necesară dezvoltarea unei etape, în cadrul procedurii de obținere a compozițiilor de embryo-peptide cu biodisponibilitate ridicată în cazul administrării orale, care să se desfășoare în soluții concentrate și care să asigure un timp mai scurt de formare a chelaților cu



peptide / factori de creștere pentru disocierea respectivilor factori de creștere de receptorii lor solubili, prin folosirea compușilor insolubili de zinc, ca sursă pentru exact cantitatea stoichiometric necesară de ioni Zn^{2+} . Este de asemenea necesară realizarea unui procedeu care să permită includerea factorilor de creștere de tip peptidic din extractele embrionare în compoziții care, atunci când sunt administrate oral și ajung în intestin, să stimuleze endocitoza ca modalitate eficientă de penetrare a barierei intestinale. Astfel de compoziții cu o biodisponibilitate crescută datorită stimulării endocitozei ar trebui să reducă variabilitatea răspunsurilor fiziologice, favorizând reproductibil re-echilibrarea metabolică și reglarea tulburărilor metabolice la subiecții umani la care sunt administrate timp de câteva săptămâni.

Invenția are ca scop soluționarea problemelor tehnice descrise mai sus, furnizând o compoziție de embryo-peptide, și un procedeu de obținere a acesteia din extracte de embrioni de vertebrate sau din primele stadii din ciclul de dezvoltare a insectelor, care, la administrarea orală, ca supliment nutritiv, pentru re-echilibrarea metabolică și reglarea tulburărilor metabolice la subiecții umani, să prezinte o biodisponibilitate crescută a embryo-peptidelor constituente. Îmbogățirea în embryo-peptide cu activitate de cito-stimulare și de cito-protecție a celulelor umane este realizată fără diluarea semnificativă a extractului. De asemenea invenția are și scopul de a introduce o etapă de disociere a factorilor de creștere peptidici în cadrul procesului de obținere, pentru a permite concentrarea factorilor de creștere după disocierea de receptorii solubili cu ajutorul ionilor Zn^{2+} furnizați în exact cantitatea stoichiometric necesară, și care să se desfășoare în soluții concentrate și în timp scurt. Sub un alt aspect invenția furnizează un procedeu care duce la obținerea unor compoziții cu biodisponibilitate ridicată, din care embryo-peptidele sunt absorbite prin bariera intestinală re-echilibrând metabolismul prin mecanisme de reglare adaptative declanșate de axul neuro-endocrin hipotalamo-hipozo-adrenal.

Compoziția cu biodisponibilitate crescută a embryo-peptidelor administrate oral conform invenției este următoarea: 20 părți de extract embrionar heterolog standardizat în embryo-peptide, cu un conținut de 50% proteine și 5% peptide atunci când este obținut din embrioni de pui de găină, și 50% proteine și 10% peptide atunci când este obținut din stadiile inițiale ale dezvoltării insectelor, 80



părți de maltodextrină, 2 părți drojdie seleniată cu un conținut de 750 mg Se per kg, 1,5 părți drojdie cromiată cu un conținut de 900 mg Cr per kg, 0,2 părți de zinc chelatat în embryo-peptide, 0,2 părți vitamina B₆ (piridoxină), 0,5 părți amestec de peptide cationice, formate prin hidroliza enzimatică din vitelusul și albușul de ou rămase după prelevarea embrionilor de pui de găină, care au o activitate antitripsinică specifică de 1.000 unități BAEE per mg de peptide și activitate de stimulare a endocitozei prin epitelii intestinal, 0,5 părți taurocolat de sodiu, 0,01 ... 0,015 părți bioxid de siliciu expandat, 0,01 ... 0,015 părți stearat de magneziu, 0,01 ... 0,015 părți metilparaben și 0,005 ... 0,010 părți propilparaben, părțile fiind exprimate în unități de masă.

Procedeul de obținerea a compozițiilor cu biodisponibilitate crescută a embryo-peptidelor administrate oral conform invenției este alcătuit din următoarele etape: obținerea materialului biologic cu o contaminare biologică foarte redusă, prin recoltarea aseptică a embrionilor de pui de găină împreună cu membrana corioalantoidă din ouăle fertilizate și incubate timp de 10 zile, dezinfecția ouălor non-diapauză de fluture de mătase, sau recoltarea aseptică de larve de trântor / larve mascul de *Apis mellifera*, la 10 zile de la depunerea ouălor haploide, mai exact din larve cu vârsta de 7 zile; dezintegrarea materialului biologic prin intermediul unei mori coloidale și determinarea cantității de substanță uscată în extract; diluarea a 10 părți din embrionii dezintegrați, exprimați ca substanță uscată, cu 90 părți apă sterilă distilată; omogenizarea într-un omogenizator cu piston la înaltă presiune, două cicluri la 50 MPa; amestecarea a 100 părți din suspensia rezultată cu 1,25 părți de carbonat de zinc și ultrasonizarea pentru 25 min la 500W, pentru a asigura disocierea factorilor de creștere de pe receptorii lor; înlăturarea excesului de carbonat de zinc și resturilor celulare prin centrifugare; ultrafiltrarea tangențială printr-o membrană de 10 kDa a supernatantului; denaturarea proteinelor cu masa moleculară >10 kDa prin încălzire pentru 25 min la 85°C; amestecarea dializatului care conține embryo-peptide <10 kDa, cu proteinele denaturate >10kDa, în raport de 1 parte peptide la 9 părți proteine în cazul embrionilor de pui de găină, și 1 parte peptide la 4 părți proteine în cazul materialului biologic provenit din primele stadii de dezvoltare a insectelor; hidroliza enzimatică cu endo-protează și amidopeptidază a resturilor de vitelus și albuș rămase după recoltarea embrionilor de pui de găină, în raport de 2 părți endo-

protează la 100 părți resturi de vitelus și albuș, urmată de cu ultrafiltrarea tangențială a peptidelor cu masă moleculară mai mică de 10 kDa și absorbția din dializat a peptidelor cationice formate pe o rășină schimbătoare de cationi, și de eluarea peptidelor cationice de pe rășina schimbătoare de ioni și determinarea concentrației peptidice cu reactiv Folin-Ciocalteu; adăugarea peste acea cantitate de eluat conținând 0,5 părți de peptide cationice, care au o activitate antitripsinică specifică de $980 \pm 53,3$ BAEE per mg de peptide și activitate de stimulare a endocitozei prin epiteliul intestinal, a 80 părți de maltodextrină, 2 părți drojdie seleniată cu un conținut de 750 mg Se per kg, 1,5 părți drojdie cromiată cu un conținut de 900 mg Cr per kg, 0,2 părți vitamina B₆ (piridoxină), 0,5 părți amestec de peptide cationice, formate prin hidroliza enzimatică din vitelusul și albușul de ou rămase după prelevarea embrionilor de pui de găină, 0,5 părți taurocolat de sodiu, 0,01 ... 0,015 părți bioxid de siliciu expandat, 0,01 ... 0,015 părți stearat de magneziu, 0,01 ... 0,015 părți metilparaben și 0,005 ... 0,010 părți propilparaben și amestecarea cu 20 părți de amestec embrio-peptide embrionare – proteine; omogenizarea amestecului prin trecere printr-un omogenizator cu piston la înaltă presiune, 2 cicluri la 35 MPa; uscarea prin atomizare a amestecului format, la o rată de max. 10 kg/h, folosind un atomizor centrifugal operat la 20,000 rpm, la o temperatură a aerului la intrare de 140...150°C și la o temperatură de ieșire de 80...85°C.

Compoziția cu biodisponibilitate crescută a embrio-peptidelor administrate oral conform invenției, administrată ca supliment nutritiv în doză de 2 capsule la o oră după masa de dimineață și 2 capsule la o oră după masa de prânz, pe o perioadă de minimum 60 zile, re-echilibrează metabolismul, crește nivelul de hormoni androgeni la bărbații tineri, normalizează nivelul de cortizol, scade trigliceridele totale, colesterolul total și fracția sa LDL și crește fracția HDL a colesterolului la subiecții umani de vârsta a treia.

Prin aplicarea invenției se obțin avantajele următoare:

- se asigură o biodisponibilitate crescută a peptidelor ingrediente active prin stimularea endocitozei datorită prezenței peptidelor cationice penetrante celulare și a taurocolatului, și a absorbției prin endocitoză a embrio-peptidelor în interiorul unor structuri formate împreună cu proteinele >10 kDa degradate, care au proprietăți emulsionante;

- se concentrează embryo-peptidele fără diluarea suplimentară a extractului
- se furnizează exact cantitatea stoichiometric necesară de ioni Zn^{2+} în etapa de disociere a factorilor de creștere, premergătoare etapei de separare a peptidelor prin ultrafiltrare;

- se reduce cantitatea de produse secundare și costurile de achiziționare a unor aditiv de condiționare ca agenții de emulsionare și peptide penetrante celulare prin utilizarea subproduselor pentru a produce agenți de emulsifiere prin degradarea proteinelor >10 kDa din retentat și, respectiv, prin hidroliză enzimatică și separarea concomitentă pe cationiți a peptidelor penetrante celular formate din restul de vitelus și albuș;

- se asigură o productivitate mărită;

- se reduc pierderile de substanțe active prin termodegradare și termooxidare;

- se obține un produs cu proprietăți bune de curgere;

- se favorizează formarea unui produs cu stabilitate fizico-chimică și microbiologică mărită, a cărui valabilitate este mai mare de 2 ani.

- se asigură posibilitatea adaptării la diferitele surse de embrioni heterologi.

Prezenta invenție se ilustrează prin următorul exemplu:

Exemplul 1. Se recoltează aseptice embrionii din ouă embrionate de găină, care apoi se dezintegrează coloidal la moară coloidală (Colloid Mill Karl Schell KS 030-F10-150), până la formarea unui omogenat cu particule uniforme. În omogenat se determină substanța uscată refractometric, după care se amestecă 10 părți omogenat embrionar cu 90 ... 95 părți apă distilată sterilă, se omogenizează într-un omogenizator cu piston (GEA Niro Soavi Arriete NS2006), două cicluri la 50 MPa. Suspensia rezultată este amestecată cu 1,25 părți de carbonat de zinc și se ultrasonicează pentru 25 min la 500W (cu un aparat Hielscher UIP 100hd), pentru a se asigura disocierea hormonilor de creștere de pe receptorii lor cu care formează complexe care ar rămâne în retentat în cazul ultrafiltrării. Excesul de carbonat de zinc și alte reziduuri insolubile, cum ar fi de exemplu debriurile celulare, sunt înlăturate prin centrifugare continuă (Alfa Laval LAPX 404, 20 litri per min, 5000 rpm, aprox. 5500 g). Supernatantul este apoi ultrafiltrat tangențial printr-o membrană de 10 kDa, folosind un echipament Millipore Pelicon 2 Maxi Cassete Biomax 10, 2,5 m². În retentat pH-ul este ajustat

la pH 7,0 folosind hidroxid de sodiu 1 M, iar proteinele cu masa moleculară >10 kDa sunt încălzite într-un reactor cu manta, timp de 25 min la 85°C, pentru a denatura legăturile nonpolare și punțile disulfhidrice și pentru a crește astfel capacitatea de emulsionare a acestor embryo-proteine. Proteinele denaturate sunt amestecate cu ultrafiltratul conținând peptide în raport de 1 parte peptide la 9 părți proteine, conținutul de proteine și peptide fiind determinat prin metoda Lowry, folosind reactivul Folin-Ciocalteu (Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951, *J. Biol. Chem.* **193**: 265–75.). Se omogenizează un ciclu în omogenizatorul cu piston la 30 MPa.

Resturile de vitelus și albuș rămase după recoltarea embrionilor de pui de găină, se introduc într-un vas de reacție și se tratează cu Alcalase AF 2.4 L (Novozyme, endoprotează din *Bacillus licheniformis*, cu subtilizină / serin-endopeptidază ca principal component enzimatic, cu o activitate specifică de 2.4 unități Anson (AU) per gram; o AU este cantitatea de enzimă care, în condiții standard digeră hemoglobina cu o rată inițială care produce într-un minut o cantitate de produși de reacție solubili în acid tricloroacetic acid care formează aceeași culoare cu reactiv Folin-Ciocalteu ca și un milliechivalent de tirozină), în raport de 2 părți endo-protează la 100 părți resturi de vitelus și albuș. Se încălzește la 50°C, se menține timp de 30 min și apoi se pompează pe un echipament de ultrafiltrare tangențială Millipore Pelicon 2 Maxi Cassete Biomax 10, 2,5 m², prevăzut cu membrană de 10 kDa timp de 15 min. Retentantul se întoarce în vasul de reacție, iar dializatul se captează într-un vas unde se tratează sub agitare cu rășină Bio Rex 70, schimbător de cationi, 200-400 mesh, spălată în prealabil cu 1 N HCl și apoi cu apă distilată, în proporție de 5 părți rășină la 100 părți dializat. Se repetă ciclul de hidroliză enzimatică / ultrafiltrare de 10 ori, adăugându-se rășină schimbătoare de ioni în vasul de captare a dializatului pentru a se menține proporția de 5 părți rășină la 100 părți dializat. După terminarea ciclurilor de hidroliză enzimatică dializatul se mai menține cu rășina timp de 4 ore. Se filtrează rășina, se spală abundant cu apă distilată și se împachetează într-o coloană din care se eluează peptidele cu un gradient 0,2 ...2 M NaCl, cu o viteză de eluare de 3,5 ml per min. Din eluat se îndepărtează excesul de sare prin dializă peste noapte. În dializat se determină conținutul de peptide cu reactiv Folin-Ciocalteu. La un volum de dializat conținând de 0,5 părți de peptide cationice, care



au o activitate antitripsinică specifică de $980 \pm 53,3$ BAEE per mg de peptide și activitate de stimulare a endocitozei prin epiteliul intestinal, se adaugă 80 părți de maltodextrină, 2 părți drojdie seleniată cu un conținut de 750 mg Se per kg, 1,5 părți drojdie cromiată cu un conținut de 900 mg Cr per kg, 0,2 părți vitamina B₆ (piridoxină), 0,5 părți amestec de peptide cationice, formate prin hidroliza enzimatică din vitelusul și albușul de ou rămase după prelevarea embrionilor de pui de găină, 0,5 părți taurocolat de sodiu, 0,01 ... 0,015 părți bioxid de siliciu expandat, 0,01 ... 0,015 părți stearat de magneziu, 0,01 ... 0,015 părți metilparaben și 0,005 ... 0,010 părți propilparaben și amestecarea cu 20 părți de amestec embrio-peptide embrionare – proteine. Se omogenizează amestecul de mai sus la înaltă prin trecere printr-un omogenizator cu piston la înaltă presiune, 2 cicluri la 35 MPa și apoi se usucă suspensia prin atomizare, la o rată de max. 10 kg apă evaporată pe oră, folosind un atomizor centrifugal operat la 20,000 rpm, la o temperatură a aerului la intrare de 140...150°C și la o temperatură de ieșire de 80...85°C.

Embrio-peptidele separate prin ultrafiltrare tangențială, cu masa moleculară mai mică de 10 kDa au fost testate din punct de vedere al efectului față de celulele umane. Substratul celular utilizat a fost linia celulară diploidă umană ICP-23 (INCDMI „Cantacuzino”, Gaicu, D. Petrașincu, S. Nachtigal, I. Stoian, 1997, *Developm. Biol. Standardiz.*, **37**:19-21). Substratul celular utilizat este un substrat celular uman normal, stabil genetic de-a lungul timpului de viață in vitro. Celulele au fost întreținute în laborator prin multiplicări seriale cu rata de dispersie 1:2, în mediu de creștere Eagle BME suplimentat cu 10% ser de vițel.

Testările s-au efectuat prin creșterea celulelor în tuburi Barski de 2 ml. Mediul de cultură folosit pentru testarea acțiunii embrio-peptidelor extrase din embrioni de pui de găină a fost mediu Eagle BME suplimentat cu o cantitate redusă la jumătate de ser fetal bovin (5%), care a fost suplimentat cu 1% embrio-peptide din pui de găină, concentrate în dializatul ultrafiltratului. Rezultatele au fost comparate cu un standard, reprezentat de mediu Eagle BME suplimentat cu 10% ser fetal bovin, și cu un martor, în care fibroblastele au fost cultivate pe mediu Eagle BME suplimentat cu o cantitate redusă la jumătate de ser fetal bovin (5%).

Aprecierea proliferării celulare in vitro s-a efectuat prin măsurarea și notarea densității celulare la intervale de 24 ore, de-a lungul unui ciclu de

multiplicare (96 ore), la 37°C, în atmosferă umidificată și cu exces de bioxid de carbon (5% CO₂, 95% aer). Dinamica creșterii celulare *in vitro* s-a alcătuit prin raportarea densității celulare (nr. celule/ cm²) la intervalul corespunzător în ore. Numărarea celulelor s-a realizat după pregătirea probelor prin desprinderea cu tripsină a celulelor, reluarea lor în volum cunoscut de mediu și adaus de colorant (albastru de tripan 0,4%). Tehnica utilizată a permis și aprecierea mortalității celulare (%; test de excluziune a colorantului). Toți reactivii folosiți au provenit de la Sigma - Aldrich (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, SUA). Rezultatele sunt prezentate în tab.1.

Tab.1. Efectul embryo-peptidelor din extract embrionar de pui de găină, concentrate în difuzatul ultrafiltratului, asupra creșterii și mortalității celulare a fibroblastelor ICP-23 (pasaj 23 *in vitro*).

Variantă experimentală	Număr celule ($\times 10^4$ cel/cm ²)		Mortalitate cel. (%)	
	72 h	96 h	72 h	96 h
Martor (Mediu Eagle BME cu 10% ser fetal bovin)	12.43a	13.25c	4.20e	5.11g
Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin + 1% embryo-peptide	12.18a	13.05c	1.81f	2.68h
Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin	10.32b	9.73d	3.92e	4.64gh

*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P<0.05%

Embryo-peptidele din embrion de pui de găină concentrate în difuzatul ultrafiltratului au dovedit o acțiune citostimulatorie și citoprotectivă pe fibroblastele umane tinere (linia ICP-23, pasajul 23 *in vitro*). După 96 de ore numărul de celule este mai mare cu peste o treime (Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin - 9,73.10⁴ celule/cm², Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin + 1% embryo-peptide – 13,05.10⁴ celule/cm²). În același timp mortalitatea la 96 ore a celulelor tratate cu embryo-peptide (2,68%) este cu aproape 50% mai mică decât standardul cu 10% ser fetal bovin (5,11%).

Amestecul de peptidele cationice obținute din resturile de vitelus și albuș rămase după recoltarea embrionilor de pui de găină au fost testate pentru activitatea de inhibare a tripsinei și de stimulare a endocitozei.

Activitatea de inhibarea tripsinei s-a determinat prin folosirea BAEE ca substrat, prin monitorizarea continuă a absorbției în UV la 253 nm. Într-o cuvă de cuarț cu drumul optic de 1 cm s-au introdus 3,2 ml de amestec 63 mm fosfat de



sodiu, 0,23 mM ester etilic de N- α -benzoil-L-argininei (BAEE - *N- α -benzoil-L-arginine ethyl ester*), 0,002 mM acid clorhidric, 0,005 mg tripsină și 0,005 mg de amestec de peptide cationice. S-a omogenizat amestecul prin răsturnarea cuvetei de cuarț și s-a determinat creșterea absorbantei în UV la 253 nm pe un spectrofotometru UV-VIS Pharo 300 Spectroquant Merck Millipore. S-a lucrat față de un martor de reactivi, M_R , fără adăugare de tripsină și amestec de peptide cationice, și un standard M_T la care s-a adăugat numai tripsină. Toți reactivii folosiți au provenit de la Sigma - Aldrich (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, SUA). Determinările s-au efectuat în triplicat, iar activitatea de inhibare a tripsinei s-a calculat conform formulei:

$$\text{Activitatea inhibare tripsină} = (DO_{253nm}/\text{min } M_T - DO_{253nm}/\text{min } M_R) - \\ (DO_{253nm}P - DO_{253nm}M_R) * 200$$

în care :

$DO_{253nm}/\text{min } M_T$ este variația absorbantei în UV la 253 nm a standardului M_T în care s-a adăugat numai tripsină ;

$DO_{253nm}/\text{min } M_R$ este variația absorbantei în UV la 253 nm a martorului de reactivi M_R în care s-a adăugat numai tripsină ;

$DO_{253nm}/\text{min } P$ este variația absorbantei în UV la 253 nm probei cu tripsină și inhibitor tripsinic din amestecul de peptide cationice;

200 este factorul de corecție pentru exprimarea activității pentru un mg de tripsină / amestec de peptide cationice care conține inhibitor tripsinic.

O unitate de activitate tripsinică / antitripsinică BAEE se definește ca fiind activitatea enzimatică de hidroliză a peptidelor specifice tripsinei, care determină într-un minut o variație de extincție la 253 nm de 0,001, atunci când substratul folosit este esterul etilic al N- α -benzoil-L-argininei (BAEE). Amestecul de peptidele cationice obținute din resturile de vitelus și albuș rămase după recoltarea embrionilor de pui de găină a prezentat o activitate de $980 \pm 53,3$ BAEE per mg.

Pentru stabilirea influenței peptidelor cationice obținute din resturile de vitelus și albuș rămase după prelevarea embrionilor s-a folosit tehnica monostratului de celule Caco-2, un model larg utilizat pentru bariera intestinală (Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M.L., Stammati A., Zucco F., 2005, *Cell Biol. Toxicol.*, 21:1-26). Celulele Caco-2 (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, SUA) au fost menținute în mediu Eagle modificat după

Dulbecco, pH 7,4, suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 2 mM l-glutamină, 1% soluție de aminoacizi esențiali și soluție de 0,1% penicilină-streptomicină, în la 37°C, în atmosferă umidificată și cu exces de bioxid de carbon (5% CO₂, 95% aer). Celulele au fost crescute în condiții standard până la confluență de 60..70%. Celulele din pasajele 30..40 au fost folosite în cadrul tuturor experimentelor. Celulele Caco-2 au fost inoculate în plăci cu 12 godeuri Transwell® (Costar®, Corning, Corning, NY, SUA), cu membrane filtrante de policarbonat pentru culturi celulare (dimensiunea porilor 3.0 μm), la o densitate de inoculare de 2×10^4 cel/cm². Mediul de cultură a fost adăugat atât în compartimentul donor, cât și în cele receptor. Mediul a fost schimbat în fiecare zi. Celulele au fost lăsate pentru a se diferenția pentru 20 zile după inoculare, cu monitorizarea rezistenței electrice trans-epiteliale (TEER – *TransEpithelial Electric Resistance*), prin folosirea unui voltohmmetru digital EVOM (World Precision Instrument, Sarasota, FL, SUA). Pe monostratul de celule Caco-2 s-a determinat influența amestecului de peptidelor cationice obținute din resturile de vitelus și albuș asupra transportului dextranului marcat cu fluoresceină FD-4 (masă moleculară medie 5 kDa). Înaintea experimentelor de transport celulele au fost spălate de două ori cu tampon fosfat salin steril și pre-echilibrate pentru o oră cu soluție salină tamponată Hank (HBSS, *Hank's Buffered Salt Solution*). După spălarea mediului de creștere celulele au fost tratate cu soluția de peptide cationice, 1 mg/ml concentrație finală în HBSS, în compartimentul apical timp de 2 ore. În godeurile martor s-a aplicat numai HBSS. După 2 ore de la tratament celulele au fost spălate cu tampon fosfat salin steril și s-a adăugat în zona apicală a monostratului o soluție FD-4, în concentrație finală de 1 mg/ml. Din partea bazolaterală s-au prelevat probe de câte 1 ml la 60, 120, 180 și 240 min, completându-se cu soluție HBSS sterilă. Concentrația de FD-4 din probele prelevate din mediul bazolateral s-a determinat prin folosirea unui spectrofluorimetru Jasco FP6500 (Jasco, Easton, MD, SUA), la o lungime de undă de excitare de 400 nm și la o lungime de undă a radiației emise de 550 nm. Rezultatele au fost exprimate ca transport cumulativ în funcție de timp. Toate experimentele au fost realizate în triplicat la 37°C. Toți reactivii folosiți au provenit de la Sigma - Aldrich (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, SUA).

Coeficientul aparent de permeabilitate a fost calculat conform următoarei formule:



$$P_a = (\delta C / \delta t) \times (1/A \times C_o)$$

în care:

P_a este coeficientul aparent de permeabilitate (cm/s)

$\delta C / \delta t$ este viteza de apariție a FD-4 în compartimentul bazolateral ($\mu\text{g/s}$)

A este suprafața monostratului de celule CaCo-2

C_o este concentrația inițială a FD-4 în compartimentul apical.

Viteza de apariție a FD-4 a fost calculată ca pantă a drepte de permeație în funcție de timp. Raportul de stimulare a absorbției (R) a fost determinat din valorile P_a conform formulei:

$$R = P_a(\text{probă}) / P_a(\text{martor netratat})$$

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2. Aceste rezultate demonstrează că peptidele cationice obținute prin hidroliza enzimatică a vitelului și albușului de ou stimulează transportul FD-4 (cu masa moleculară medie de 3-5 kDa), Raportul de stimulare a absorbției $R = 14,33$, probabil prin stimularea endocitozei nespecifice după interacția cu mucusul polianionic din matricea extracelulară.

Tab. 2. Efectul peptidelor cationice obținute prin hidroliză enzimatică din vitelul și albușul de ou rămase după prelevarea embrionilor de găină asupra transportului FD-4 prin monostratul de celule Caco-2.

VARIANTĂ EXPERIMENTALĂ	Transport FD-4 cumulat la 4 ore (μg)	Coeficientul aparent de permeabilitate P_a (10^{-6} cm/s)	Raportul de stimulare a absorbției R
Martor (HBSS)	2,23±0,8	0,12	1,00
Peptide cationice	27,86±2,2	1,72	14,33

Drojdia seleniată utilizată în exemplul de mai sus se obține după următorul procedeu. Se realizează următorul mediu de cultură pentru drojdie (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*): 30 ... 32 părți glucoză, 0,7 ... 0,8 părți clorură de magneziu ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,4 ... 0,5 părți fosfat disodic (Na_2HPO_4), 0,6 ... 0,75 părți fosfat monopotasic (KH_2PO_4), 5 ... 6 părți plasmolizat seleniat de drojdie, 1,5 ... 2 părți derivat de acid tiazolidin-4-carboxilic. Plasmolizatul seleniat de drojdie se realizează după cum urmează: 500 părți drojdie pentru panificație (STAS 985-79, 26% substanță uscată) se emulsionează cu 2 400 ... 2 500 părți apă, se menține 30 min la 70 - 75 °C, se sterilizează 20 min la 105 °C, se răcește la 30 ... 35°C, se tratează cu 0,08 ... 0,1 părți metabisulfid de sodiu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$).

după 30 min se adaugă 0,16 ... 0,18 părți selenit de sodiu ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Se omogenizează la presiune medie (150 ... 200 bari) și se deshidratează prin atomizare la temperatură joasă (140 ... 150°C intrare agent uscare, 70 ... 75°C ieșire agent uscare). Derivatul de acid tiazolidin-4-carboxilic se obține după cum urmează: 1,5 părți riboză, 1,5 părți clorhidrat de cisteină și 1,1 părți carbonat de calciu (CaCO_3) se dizolvă în 30 părți apă la 40 ... 50°C, apoi se lasă 24 ore la 37°C; se filtrează excesul de carbonat de calciu, se concentrează sub vacuum până la 5 .. 6 părți și se precipită cu etanol. Precipitatul se reia cu un amestec acetonă : etanol 40 : 60 și se cristalizează prin fierbere pe baie de apă.

Mediul de cultură se sterilizează prin filtrare și se trece apoi într-un bioreactor sterilizat termic și răcit la 30 ... 35°C. După atingerea temperaturii de regim de 32 ... 35°C mediul se inoculează cu 10 ... 15 părți suspensie de cultură pură de drojdie, conținând 14 ... 15 g drojdie/l, obținută prin cultivare în baloane, conform procedeele uzuale pe mediu identic cu cel descris mai sus. Se cultivă 10 ... 12 ore în aerobioză, la o temperatură 32 ... 35°C, la un pH de 6,4 ... 6,8 u pH și la o rată de aerare de 1,2 ... 1,4 litri aer pe litru de mediu și pe minut. După trecerea timpului de cultivare aerobă se barbotează timp de 10 ... 15 min cu azot pur, cu o rată de 1,4 ... 1,6 litri azot pe litru de mediu și pe min și apoi se cultivă drojdiile în anaerobioză timp de 10 ... 12 ore la o temperatură de 25 ... 28°C și la un pH de 5,6 ... 6,0 u pH. La terminarea perioadei de cultivare în anaerobioză se începe aerarea cu o rată de 0,1 litri aer pe litru de mediu și pe min care crește timp de oră până la atingerea ratei inițiale de 1,2 ... 1,4 litri aer pe litru de mediu și pe minut. Se continuă cultivarea în aerobioză la o temperatură 32 ... 35°C și la un pH de 6,4 ... 6,8 u pH timp de 10 ... 12 ore. La atingerea nivelului de 16... 18 g drojdie pe litru de mediu se separă biomasa de drojdie prin centrifugare continuă la 8 000 ... 10 000 g, iar laptele de drojdie rezultat se supune plasmolizei prin șoc termic, timp de 30 ... 35 min la 70 ... 75°C. Plasmolizatul se sterilizează timp de 20 min la 105°C, se răcește la 60 ... 65°C, se omogenizează la medie presiune (100 ... 200 bari) și se deshidratează prin atomizare la temperatură scăzută (140 ... 150°C intrarea agent uscare, 70 ... 75 °C ieșire agent uscare).

Drojdia cromiată utilizată în exemplul de mai sus se realizează după următorul procedeu. 500 părți drojdie pentru panificație (STAS 985-79, 26%



substanță uscată) se emulsionează cu 2 400 ... 2 500 părți apă, se menține 30 min la 70 - 75 °C, se sterilizează 20 min la 105 °C, se răcește la 30 ... 35°C, iar după 30 min se adaugă 0,12 ... 0,14 părți clorură de crom. Se omogenizează la presiune medie (150 ... 200 bari) și se centrifughează 20 min la 6000 g. Sedimentul se îndepărtează iar supernatantul se deshidratează prin atomizare la temperatură joasă (max. 150°C intrare agent uscare, max. 80°C ieșire agent uscare).

Orice alte forme de drojdie seleniată sau cromiată pot fi utilizate.

Pulberea care conține embryo-peptide cu biodisponibilitate ridicată în cazul administrării orale, rezultată conform exemplului de mai sus, conține principii active din embrioni de pui de găină cu o structură oligo-peptidică, a căror acțiune fiziologică este amplificată de micro- și oligoelemente (Se, Cr, Zn) legate în compuși cu biodisponibilitate ridicată.

Produsul obținut prin aplicare exemplului de mai sus are următoarele caracteristici:

- aspect: pulbere fină, corespunzător prevederilor *International Pharmacopoeia*;
- culoare: alb-gălbui până la verde pal;
- miros: caracteristic;
- gust: specific, cu o ușoară senzație dulceagă;
- umiditate (pierdere prin uscare la 105°C, timp de 4 ore): max. 6%;
- conținut în proteină (ca azot total x 6,25): 10%
- peptide (acido-solubile, cu reactiv Folin-Ciocalteu): 10 mg/g;
- conținut în seleniu total: min. 15 mg/kg;
- conținut în crom total: min. 12,5 mg/kg;
- conținut în zinc total: min. 0,2%
- conținut piridoxină: min. 0,2%

Pulberea de concentrat proteic îmbogățită în peptide obținută prin aplicarea exemplului de mai sus se prelucrează în forme de suplimente nutritive cu doze unitare gastro-rezistente (de ex. capsule operculate) pentru administrare orală.

Exemplu de realizare a invenției se poate realiza și pe alți embrioni de pasăre (curcă, rață, prepeliță etc.) recoltați cu o zi înainte de jumătatea ciclului lor de dezvoltare embrionară completă până la eclozare.



Exemplul 2. Ouăle non-diapauză de fluture de mătase, *Bombyx mori*, embrionate timp de 7 zile au fost dezinfectate prin spălări repetate de 3 ori cu o soluție cu 200 ppm de clor activ (preparată prin diluarea a 0,8 ml soluție de hipoclorit de sodiu în 0,5 litri de apă) pentru 1 min, urmată de clătire cu apa deionizată sterilă pentru 3 min. Raportul de spălare a fost de 1 parte ouă embrionate de fluture de mătase la 10 părți soluție de clor activ. Ouăle dezinfectate de fluture de mătase au fost supuse procedurii de obținere a compoziție standardizată în embryo-peptide heterologe descris în exemplul 1, cu singura diferență că etapa de amestecare a embryo-peptidelor embrionare cu masa < 10 kDa cu embryo-proteinele degradate cu masa > 10 kDa, se realizează în raport de 1 parte embryo-peptide la 4 părți embryo-proteine.

Adăugarea unei cantități mai mari de embryo-peptide provenite din ouă embrionate de fluture de mătase este determinată de acțiunea lor cito-stimulatorie și cito-protectivă mai redusă, așa cum rezultă și din testul efectul pe fibroblaste umane linia ICP-23 prezentat în continuare.

Testările s-au efectuat așa cum au fost prezentate și în exemplu 1, prin creșterea celulelor în tuburi Barski de 2 ml. Mediul de cultură folosit pentru testarea acțiunii embryo-peptidelor extrase din ouă embrionate de fluture de mătase a fost mediu Eagle BME suplimentat cu o cantitate redusă la jumătate de ser fetal bovin (5%), care a fost suplimentat cu 1% embryo-peptide din ouă embrionate de fluture de mătase, concentrate în dializatul ultrafiltratului.

Tab. 3. Efectul embryo-peptidelor din ouă embrionate de fluture de mătase concentrate în difuzatul ultrafiltratului, asupra creșterii și mortalității celulare a fibroblastelor ICP-23 (pasaj 23 *in vitro*).

Varietă experimentală	Număr celule ($\times 10^4$ cel/cm ²)		Mortalitate cel. (%)	
	72 h	96 h	72 h	96 h
Martor (Mediu Eagle BME cu 10% ser fetal bovin)	12,28a	13,40c	4,30e	5,24g
Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin + 1% embryo-peptide	11,58ab	12,55cd	3,35f	3,82h
Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin	10,12b	10,89d	3,94e	4,52gh

*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru $P < 0.05\%$

Rezultatele au fost comparate cu un standard, reprezentat de mediu Eagle BME suplimentat cu 10% ser fetal bovin, și cu un martor, în care fibroblastele au

fost cultivate pe mediu Eagle BME suplimentat cu o cantitate redusă la jumătate de ser fetal bovin (5%). Rezultatele sunt prezentate în tab.3.

Embrio-peptidele din ouă embrionate de fluture de mătase, concentrate în difuzatul ultrafiltratului, au dovedit o acțiune citostimulatorie și citoprotectivă pe fibroblastele umane tinere (linia ICP-23, pasajul 23 *in vitro*) mai puțin pronunțată decât cea a embrio-peptidele din embrioni de găină. După 96 de ore numărul de celule este mai mare cu aprox. 15% (Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin - $10,89 \cdot 10^4$ celule/cm², Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin + 1% embrio-peptide - $12,55 \cdot 10^4$ celule/cm²). În același timp mortalitatea la 96 ore a celulelor tratate cu embrio-peptide (3,89%) este 72,9% din mortalitatea prezentă la standardul cu 10% ser fetal bovin (5,24%).

Această activitate biologică mai redusă față de fibroblastele umane a embrio-peptidelor din ouă embrionate de fluture de mătase comparativ cu cea a embrio-peptidelor din extract embrionar de pui de găină este explicabilă având în vedere distanța evolutivă mai mare. Pentru a compensa această diferență de activitate biologică în cadrul procesului de obținere a compozițiilor pe baza extractelor embrionare din ouă embrionate de fluturi de mătase s-a procedat la o concentrare dublă a embrio-peptidelor cu masa moleculară >10 kDa, concentrate în dializatul ultrafiltratului.

Produsul obținut prin aplicare exemplului de mai sus are următoarele caracteristici:

- aspect: pulbere fină, corespunzător prevederilor International Pharmacopoeia;
- culoare: alb-gălbui până la verde pal;
- miros: caracteristic;
- gust: specific, cu o ușoară senzație dulceagă;
- umiditate (pierdere prin uscare la 105°C, timp de 4 ore): max. 6%;
- conținut în proteină (ca azot total x 6,25): 10%
- peptide (acido-solubile, cu reactiv Folin-Ciocalteu): 20 mg/g;
- conținut în seleniu total: min. 15 mg/kg;
- conținut în crom total: min. 12,5 mg/kg;
- conținut în zinc total: min. 0,3%
- conținut piridoxină: min. 0,2%

Exemplul 3. Larvele de trântor sunt recoltate aseptice din celulele fagurilor, la 10 zile de la depunerea ouălor haploide când vârsta larvelor este 7 zile. Larvele recoltate aseptice sunt supuse procedurii conform foste supuse procedurii de obținere a compoziție standardizată în embrio-peptide heterologe descris în exemplul 1, cu singura diferență că etapa de amestecare a embrio-peptidelor embrionare cu masa < 10 kDa cu embrio-proteinele degradate cu masa > 10 kDa, se realizează în raport de 1 parte embrio-peptide la 4 părți embrio-proteine.

Adăugarea unei cantități mai mari de embrio-peptide provenite din ouă embrionate de fluture de mătase este determinată de acțiunea lor cito-stimulatorie și cito-protectivă mai redusă, așa cum rezultă și din testul efectului pe fibroblaste umane linia ICP-23 care va fi prezentat în continuare.

Testările s-au efectuat așa cum au fost prezentate și în exemplu 1, prin creșterea celulelor în tuburi Barski de 2 ml. Mediul de cultură folosit pentru testarea acțiunii embrio-peptidelor extrase din larve de trântori a fost mediu Eagle BME suplimentat cu o cantitate redusă la jumătate de ser fetal bovin (5%), care a fost suplimentat cu 1% embrio-peptide din ouă larve de trântori, concentrate în dializatul ultrafiltratului. Rezultatele au fost comparate cu un standard, reprezentat de mediu Eagle BME suplimentat cu 10% ser fetal bovin, și cu un martor, în care fibroblastele au fost cultivate pe mediu Eagle BME suplimentat cu o cantitate redusă la jumătate de ser fetal bovin (5%). Rezultatele sunt prezentate în tab. 4.

Tab. 4. Efectul embrio-peptidelor din larve de trântor, concentrate în difuzatul ultrafiltratului, asupra creșterii și mortalității celulare a fibroblastelor ICP-23 (pasaj 23 *in vitro*).

Varianta experimentală	Număr celule ($\times 10^4$ cel/cm ²)		Mortalitate cel. (%)	
	72 h	96 h	72 h	96 h
Martor (Mediu Eagle BME cu 10% ser fetal bovin)	12,44a	13,58c	4,35e	5,19g
Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin + 1% embrio-peptide	11,32ab	12,24cd	3,39f	4,10h
Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin	10,12b	10,58d	3,86ef	4,69gh

*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru $P < 0.05\%$

Embrio-peptidele din larve de trântori, concentrate în difuzatul ultrafiltratului, au dovedit și ele o acțiune citostimulatorie și citoprotectivă pe fibroblastele umane

tinere (linia ICP-23, pasajul 23 *in vitro*). Ca și în cazul celorlalte peptide embrionare provenite din primele stadii de dezvoltare ale insectelor activitatea biologică pe celulele umane este mai puțin pronunțată comparativ cu cea a embrio-peptidele din embrioni de găină. După 96 de ore numărul de celule este mai mare cu aprox. 15% (Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin - $10,89 \cdot 10^4$ celule/cm², Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin + 1% embrio-peptide - $12,55 \cdot 10^4$ celule/cm²). În același timp mortalitatea la 96 ore a celulelor tratate cu embrio-peptide (3,89%) este 72,9% din mortalitatea prezentă la standardul cu 10% ser fetal bovin (5,24%).

Embrio-peptidele din larve de trântor, concentrate în difuzatul ultrafiltratului, au dovedit o acțiune citostimulatorie și citoprotectivă pe fibroblastele umane tinere (linia ICP-23, pasajul 23 *in vitro*) mai puțin pronunțată decât cea a embrio-peptidele din embrioni de găină. După 96 de ore numărul de celule este mai mare cu aprox. 15% (Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin - $10,58 \cdot 10^4$ celule/cm², Mediu Eagle BME cu 5% ser fetal bovin + 1% embrio-peptide - $12,24 \cdot 10^4$ celule/cm²). În același timp mortalitatea la 96 ore a celulelor tratate cu embrio-peptide (4,10%) este 21% mai mică decât mortalitatea prezentă la standardul cu 10% ser fetal bovin (5,19%).

Pentru a compensa această diferență de activitate biologică în cadrul procesului de obținere a compozițiilor pe baza extractelor embrionare din larve de trântori s-a procedat la o concentrare dublă a embrio-peptidelor cu masa moleculară >10 kDa, concentrate în dializatul ultrafiltratului.

Produsul obținut prin aplicare exemplului de mai sus are următoarele caracteristici:

- aspect: pulbere fină, corespunzător prevederilor International Pharmacopoeia;
- culoare: alb-gălbui până la verde pal;
- miros: caracteristic;
- gust: specific, cu o ușoară senzație dulceagă;
- umiditate (pierdere prin uscare la 105°C, timp de 4 ore): max. 6%;
- conținut în proteină (ca azot total x 6,25): 10%
- peptide (acido-solubile, cu reactiv Folin-Ciocalteu): 20 mg/g;
- conținut în seleniu total: min. 15 mg/kg;
- conținut în crom total: min. 12,5 mg/kg;



- conținut în zinc total: min. 0,3%

- conținut piridoxină: min. 0,2%

Compozițiile rezultate prin aplicarea exemplurilor de mai sus au fost testate pe loturi de câte 40 șobolani Wistar tineri (20 de masculi cântărind 97 ± 4 g și 20 femele de 95 ± 5 g). Șobolani au fost hrăniți cu dieta standard. Compozițiile de mai sus au fost administrate oral, ca 50 mg/kg corp/zi, pentru 60 zile. La sfârșitul perioadei experimentale s-a colectat urina și sângele și s-au determinat 17-cetosteroidii urinari, colesterolul total și lipidele totale. S-a lucrat cu un standard obținut prin uscarea prin pulverizarea a unui amestec obținut prin omogenizarea a 20 părți ouă fertilizate și embrionate 10 zile, conținând embrionii de pui de găină, resturile de vitelus și de albuș, cu 80 părți de maltodextrină, 2 părți drojdie seleniată cu un conținut de 750 mg Se per kg, 1,5 părți drojdie cromiată cu un conținut de 900 mg Cr per kg, 0,2 părți vitamina B₆ (piridoxină), 0,01 ... 0,015 părți bioxid de siliciu expandat, 0,01 ... 0,015 părți stearat de magneziu, 0,01 ... 0,015 părți metilparaben și 0,005 ... 0,010 părți propilparaben. De asemenea a fost inclus un lot martor la care s-a administrat numai maltodextrină. Rezultatele sunt prezentate în tab.5.

Tab. 5. Acțiunea compozițiilor conform exemplurilor 1-3 asupra unor parametrii biochimici ai animalelor de experiență.

Varianta experimentală	17-cetosteroidi (mg/g creatinină)	Colesterol total (mg/dl)	Lipide totale (mg/dl)
Martor, femele	$0,16 \pm 0,05$	$88,2 \pm 6,4$	$189,3 \pm 16,2$
Martor, masculi	$0,11 \pm 0,03$	$116,7 \pm 5,3$	$226,4 \pm 12,8$
Standard, femele	$0,28 \pm 0,05^*$	$86,4 \pm 7,2$	$194,3 \pm 15,6$
Standard, masculi	$0,19 \pm 0,04^*$	$111,6 \pm 7,4$	$216,4 \pm 16,4$
Produs ex.1 femele	$0,58 \pm 0,07^{***}$	$76,2 \pm 4,6^*$	$169,3 \pm 16,2^*$
Produs ex.1 masculi	$0,32 \pm 0,08^{**}$	$105,7 \pm 4,2^*$	$194,3 \pm 10,2$
Produs ex.2 femele	$0,36 \pm 0,05^{**}$	$92,6 \pm 8,3$	$189,3 \pm 16,2$
Produs ex.2 masculi	$0,27 \pm 0,06^{**}$	$114,6 \pm 9,4$	$226,4 \pm 12,8$
Produs ex.3 femele	$0,42 \pm 0,07^{**}$	$87,5 \pm 12,4$	$189,3 \pm 16,2$
Produs ex.3 masculi	$0,28 \pm 0,05^{**}$	$118,9 \pm 8,3$	$226,4 \pm 12,8$

*Semnificativ, $p < 0,05$; **Foarte semnificativ, $p < 0,01$; ***Înalt semnificativ, $P < 0,001$

Aceste rezultate demonstrează în mod evident că produsele pe bază de extracte embrionare stimulează steroidogeneza, toate produsele, inclusiv cel standard determinând o producere crescută de 17-cetosteroidi urinari. Principalii

precursori ai 17-cetosteroidilor urinari sunt dehidroepiandrosteronul (DHEA) și dehidroepiandrosteronul sulfat (DHEA-S) și alți hormoni corticosuprarenali, deci administrarea orală a extractelor embrionare stimulează axa hipotalamo – hipofiză - suprarenală, cel mai probabil prin acțiunea paracrină / autocrină a embriopeptidelor cu acțiune de factori de creștere.

De asemenea rezultatele demonstrează convingător creșterea biodisponibilității embriopeptidelor administrate oral din compozițiile realizate conform invenției.

Întrucât compoziția realizată conform exemplului 1, pe bază de embriopeptide extrase din embrion de pui de găină, a prezentat efectele cele mai semnificative, această compoziție a fost testată și pe subiecți umani.

Primul experiment s-a realizat pe 30 tineri sportivi (jucători de rugbi), care au participat la studiu ca voluntari. Aceștia au fost împărțiți în loturi de câte 10 subiecți. Primul lot a primit capsule umplute cu maltodextrină (placebo). La cel de-al doilea lot au fost administrate 4 capsule pe zi, fiecare a câte 500 mg, administrate 2 capsule la o oră după masa de dimineață și 2 capsule la o oră după masa de prânz. Cel de-al treilea grup a primit 8 capsule pe zi, 4 capsule la o oră după masa de dimineață și 4 capsule la o oră după masa de prânz. Tratamentul a fost realizat timp de 60 zile. Pentru fiecare subiect s-a determinat nivelul unor hormonilor steroidici (DHEA, DHEA-sulfat, androstenedion, testosteron). Rezultatele sunt prezentate în tab. 6.

Tab. 6. Efectul administrării orale timp de 60 de zile a compoziției realizate conform ex.1, din embrioni de pui de găină, asupra nivelului unor hormoni din serul unor tineri sportivi.

Hormon	Variantă experimentală		
	Placebo	4 capsule/zi	8 capsule/zi
DHEA	120,6 ± 15,6	98,7 ± 11,2	115,2 ± 13,8
DHEA-sulfat	84,3 ± 12,4	111,5 ± 10,5	107,5 ± 10,4
Androstenedion	87,5 ± 14,1	138,8 ± 20,8	126,5 ± 16,4
Testosteron	101,4 ± 15,1	127,3 ± 16,6	137,4 ± 19,6

În urma administrării orale a compoziției de embriopeptide cu biodisponibilitate crescută, realizată conform exemplu 1, nu s-au constatat modificări semnificative ale nivelului de DHEA și DHEA-sulfat, dar au fost constatate modificări semnificative ale nivelului de hormoni steroizi androgeni,

androstenedion și testosteron. Administrarea unei doze duble de compoziție realizate conform exemplului 1 nu a determinat efecte suplimentare, astfel încât doza folosită în următorul experiment, realizat pe subiecți de vârstă a treia, a fost de 4 capsule pe zi.

Subiecții de vârstă a treia (32 femei și 28 bărbați) au avut vârste cuprinse între 55 și 75 ani, cu o stare de sănătate bună. S-au determinat parametrii biochimici inițiali (colesterol total; LDL-colesterol; HDL-colesterol; 17-cetosteroidi; cortizol) pentru fiecare sex. Subiecții au fost apoi împărțiți aleatoriu în două loturi, unul la care s-a administrat placebo (capsule umplute cu maltodextrină) și altul la care s-a administrat compoziția realizată conform exemplu 1, 4 capsule pe zi, fiecare a câte 500 mg, administrate 2 capsule la o oră după masa de dimineață și 2 capsule la o oră după masa de prânz. După 60 zile de administrare orală s-au determinat din nou parametrii biochimici. Rezultatele sunt prezentate în tab. 7.

Tab. 7. Influența administrării orale timp de 60 de zile a compoziției realizate conform ex.1, din embrioni de pui de găină, asupra unor parametrii biochimici ai subiecților de vârstă a treia.

Varianta experimentală		Colesterol total (mg/dl)	LDL-colesterol (mg/dl)	HDL-colesterol (mg/dl)	17-cetosteroidi (mg/24h)	Cortizol (nmol/l)
Bărbați	Inițial	248,4 ± 6,3	156,5 ± 5,3	45,2 ± 8,4	27,9 ± 4,8	486,5 ± 24,2
	4 caps./zi compoziție ex.1	216,6 ± 9,4**	117,6 ± 8,5**	54,2 ± 7,8*	33,5 ± 4,2*	373,6 ± 28,7*
	Placebo	243,5 ± 7,4	154,3 ± 8,1	48,6 ± 9,2	29,2 ± 7,4	478,4 ± 24,8
Femei	Inițial	274,6 ± 4,3	174,8 ± 4,3	48,6 ± 10,2	23,7 ± 5,6	475,8 ± 26,2
	4 caps./zi compoziție ex.1	234,5 ± 9,2*	140,6 ± 7,2**	59,8 ± 8,4*	27,2 ± 5,4	418,5 ± 25,6*
	Placebo	262,6 ± 8,9	184,8 ± 5,8	47,2 ± 9,7	24,8 ± 4,2	457,8 ± 32,6

*Semnificativ, p<0,05; **Foarte semnificativ, p<0,01;

Compoziția cu biodisponibilitate crescută a embrio-peptidelor administrate oral conform invenției, administrată ca supliment nutritiv în doză de 2 capsule la o oră după masa de dimineață și 2 capsule la o oră după masa de prânz, pe o perioadă de minimum 60 zile, re-echilibrează metabolismul, normalizează nivelul de cortizol, scade trigliceridele totale, colesterolul total și fracția sa LDL și crește fracția HDL a colesterolului la subiecții umani de vârstă a treia.



REVENDICĂRI

1. Compoziția cu biodisponibilitate crescută a embrio-peptidelor administrate oral caracterizată prin aceea că este alcătuită din 20 părți de extract embrionar heterolog standardizat în embrio-peptide, 80 părți de maltodextrină, 2 părți drojdie seleniată cu un conținut de 750 mg Se per kg, 1,5 părți drojdie cromiată cu un conținut de 900 mg Cr per kg, 0,2 părți de zinc chelatat în embrio-peptide, 0,2 părți vitamina B₆ (piridoxină), 0,5 părți amestec de peptide cationice, formate prin hidroliza enzimatică din vitelusul și albușul de ou rămase după prelevarea embrionilor de pui de găină, care au o activitate antitripsinică specifică de 980±53,3 unități BAEE per mg de peptide și activitate de stimulare a endocitozei prin epiteliul intestinal, 0,5 părți taurocolat de sodiu, 0,01 ... 0,015 părți bioxid de siliciu expandat, 0,01 ... 0,015 părți stearat de magneziu, 0,01 ... 0,015 părți metilparaben și 0,005 ... 0,010 părți propilparaben, părțile fiind exprimate în unități de masă.

2. Extract embrionar heterolog standardizat conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că are cu un conținut de 50% proteine și 5% peptide, atunci când este obținut din embrioni de pui de găină, și 50% proteine și 10% peptide, atunci când este obținut din stadiile inițiale ale dezvoltării insectelor.

3. Procedul de obținerea a compozițiilor cu biodisponibilitate crescută a embrio-peptidelor administrate oral caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: obținerea materialului biologic cu o contaminare biologică foarte redusă, prin recoltarea aseptică a embrionilor de pui de găină împreună cu membrana corioalantoidă din ouăle fertilizate și incubate timp de 10 zile, dezinfecția ouălor non-diapauză de fluture de mătase, sau recoltarea aseptică de larve de trântor / larve mascul de *Apis mellifera*, la 10 zile de la depunerea ouălor haploide, mai exact din larve cu vârsta de 7 zile; dezintegrarea materialului biologic prin intermediul unei mori coloidale și determinarea cantității de substanță uscată în extract; diluarea a 10 părți din embrionii dezintegrați, exprimați ca substanță uscată, cu 90 părți apă sterilă distilată; omogenizarea într-un omogenizator cu piston la înaltă presiune, două cicluri la 50 MPa; disocierea factorilor de creștere din extractul embrionar de receptorii lor solubili; concentrarea embrio-peptidelor prin ultrafiltrarea tangențială printr-o membrană de 10 kDa;



denaturarea proteinelor din retentant cu masa moleculară >10 kDa prin încălzire pentru 25 min la 85°C; amestecarea dializatului care conține embryo-peptide <10 kDa, cu retentantul cu proteinele denaturate >10kDa; obținerea peptidelor cationice din resturile de vitelus și albuș rămase după recoltarea embrionilor de pui de găină; adăugarea peste acea cantitate de soluție conținând 0,5 părți de peptide cationice, care au o activitate antitripsinică specifică de 1.000 unități BAEE per mg de peptide și activitate de stimulare a endocitozei prin epiteliul intestinal, a 80 părți de maltodextrină, 2 părți drojdie seleniată cu un conținut de 750 mg Se per kg, 1,5 părți drojdie cromiată cu un conținut de 900 mg Cr per kg, 0,2 părți vitamina B₆ (piridoxină), 0,5 părți amestec de peptide cationice, formate prin hidroliza enzimatică din vitelusul și albușul de ou rămase după prelevarea embrionilor de pui de găină, 0,5 părți taurocolat de sodiu, 0,01 ... 0,015 părți bioxid de siliciu expandat, 0,01 ... 0,015 părți stearat de magneziu, 0,01 ... 0,015 părți metilparaben și 0,005 ... 0,010 părți propilparaben și amestecarea cu 20 părți de amestec embryo-peptide embrionare – proteine; omogenizarea amestecului prin trecere printr-un omogenizator cu piston la înaltă presiune, 2 cicluri la 35 MPa; uscarea prin atomizare a amestecului format, la o rată de max. 10 kg/h, folosind un atomizor centrifugal operat la 20,000 rpm, la o temperatură a aerului la intrare de 140...150°C și la o temperatură de ieșire de 80...85°C.

4. Amestecarea dializatului care conține embryo-peptide <10 kDa, cu retentantul cu proteinele denaturate >10kDa conform revendicării 3 caracterizată prin aceea că este realizată în raport de 1 parte peptide la 9 părți proteine în cazul embrionilor de pui de găină, și 1 parte peptide la 4 părți proteine în cazul materialului biologic provenit din primele stadii de dezvoltare a insectelor, embryo-peptidele din embrioni de pui de găină, adăugate în concentrație de 1% în Eagle BME cu 5% ser fetal bovin având o activitate citostimulatorie de minim 30% și o activitate citoprotectivă, reliefată de scăderea mortalității, de minim 50%, iar embriopeptidele din primele stadii de dezvoltare a insectelor adăugate în concentrație de 1% în Eagle BME cu 5% ser fetal bovin având o activitate citostimulatorie de minim 15% și o activitate citoprotectivă, reliefată de scăderea mortalității, de minim 50%.

5. Etapă de disociere a factorilor de creștere din extractul embrionar de receptorii lor solubili conform revendicării 3 caracterizată prin aceea că este



realizată prin amestecarea a 100 părți din suspensia rezultată cu 1,25 părți de carbonat de zinc și ultrasonicarea pentru 25 min la 500W, pentru a asigura disocierea factorilor de creștere de pe receptorii lor; înlăturarea excesului de carbonat de zinc și resturilor celulare prin centrifugare

6. Obținerea peptidelor cationice din resturile de vitelus și albuș rămase după recoltarea embrionilor de pui de găină caracterizată prin aceea că este realizată prin hidroliza enzimatică cu endo-protează și amidopeptidază a resturilor de vitelus și albuș rămase după recoltarea embrionilor de pui de găină, în raport de 2 părți endo-protează la 100 părți resturi de vitelus și albuș, urmată de cu ultrafiltrarea tangențială a peptidelor cu masă moleculară mai mică de 10 kDa și absorbția din dializat a peptidelor cationice formate pe o rășină schimbătoare de cationi, și de eluarea peptidelor cationice de pe rășina schimbătoare de ioni și determinarea concentrației peptidice cu reactiv Folin-Ciocalteu.

7. Compoziția cu biodisponibilitate crescută a embryo-peptidelor administrate oral caracterizată prin aceea că, atunci când este administrată ca supliment nutritiv în doză de 2 capsule la o oră după masa de dimineață și 2 capsule la o oră după masa de prânz, pe o perioadă de minimum 60 zile, re-echilibrează metabolismul, crește nivelul de hormoni androgeni la bărbații tineri, normalizează nivelul de cortizol, scade trigliceridele totale, colesterolul total și fracția sa LDL și crește fracția HDL a colesterolului la subiecții umani de vârstă a treia.

