



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00208

(22) Data de depozit: 24/03/2015

(41) Data publicării cererii:
30/12/2015 BOPI nr. 12/2015

(71) Solicitant:
• BIOTEHNOS S.A., STR.GORUNULUI
NR.3-5, OTOPENI, IF, RO

(72) Inventatori:
• MĂNZATU LILIANA, STR.SANDU ALDEA
NR.49, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• CIUHRII VEACESLAV, STR. PRIMĂVERII
NR. 25, BL. A, CHIȘINĂU, MD, MD;
• OLARIU LAURA, STR. LAINICI NR. 22,
ET. 2, AP. 5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI COMPLEX
ENTOMOLOGIC STANDARDIZAT ȘI COMPOZIȚII
MEDICAMENTOASE PE BAZA ACESTUIA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui complex entomologic standardizat, și la o compoziție medicamentoasă pe baza acestuia. Procedeu conform invenției constă în extracția cu apă purificată a unei biomase decongelate și omogenizate de larve de insecte din ordinul *Lepidoptere* și *Coleoptere*, timp de 1...2 h, în raport biomasă apă de 1:20...30, extractul apos se colectează și biomasa rămasă se supune succesiv extracției cu alcool etilic 70%, în raport 1:10...20, urmată de extracție cu un solvent organic în

raport 1:5...10, timp de 2...4 h, după care extractul organic se colectează, iar extractele obținute se reunesc și se concentrează sub formă de extracte moi, care se usucă sub vid, din care rezultă un complex standardizat de pulbere galben- cafenie. Compoziția conform invenției are un conținut de 0,1...10% complex standardizat și ingrediente acceptabile farmaceutic pentru condiționare.

Revendicări: 3



PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI COMPLEX ENTOMOLOGIC STANDARDIZAT SI COMPOZITII MEDICAMENTOASE PE BAZA ACESTUIA

Prezenta inventie se refera la o un procedeu de obtinere a unui complex entomologic standardizat, imbogatit in acizi grasi ω -3 si ω -6 prin extractie cu solventi selectivi de polaritati diferite, si la compozitii medicamentoase sub forma de crema, unguent, capsule, ovule si supozitoare pe baza acestuia cu efecte antiinflamatoare, antioxidante, antiproliferative asupra celulelor displazice si de reducere a permeabilitatii vaselor de sange pentru celulele proinflamatorii.

Conform inventiei se obtin :

- complex entomologic nou, standardizat, imbogatit cu acizi grasi totali de 1-3% dintre care acizii α -linolenic (ω -3) si linoleic (ω -6) in proportie de minim 25% din total si proteine solubile de minim 20%, cu efect de inhibare a eliberarii citokinelor proinflamatorii asociata cu factori de semnalizare intracelulara care moduleaza proliferarea aberanta a celulelor displazice; complexul entomologic standardizat se obtine sub forma unei pulberi omogene de culoare galben-cafenie in cantitate de 50-60 g/100 g biomasa entomologica bruta,;
- compozitii medicamentoase sub forma de crema, unguent, capsule, ovule sau supozitoare, cu un continut de 0,1-10% complex entomologic standardizat conditionat cu ingrediente specifice uzuale.

Insectele reprezinta un grup foarte mare de organisme caracterizat printr-o uriasa productivitate si populatii mari. Se estimeaza ca peste un milion de specii de insecte au fost descrise, alcatuind aproximativ 70% din totalul organismelor. Bogatia si diversitatea acestora a determinat utilizarea lor de catre oameni atat ca hrana cat si in medicina traditionala. Astfel, de peste 2000 de ani, medicina traditionala chineza utilizeaza atat corpul insectei intreg cat si oualele, produsele si secretiile insectelor pentru tratarea a diferite boli. De aceea obtinerea din insecte a unor extracte cu proprietati terapeutice se considera o directie importanta pentru descoperirea de noi medicamente [1].

Incepand cu anii 1970, s- a pus problema evaluarii capacitatii nutritionale a diferitelor specii de insecte, in principal ca sursa importanta de proteine [2]. Literatura stiintifica zoologica contine diferite date despre valoarea nutritiva a insectelor ce evidentiaza o compozitie complexa al carei continut procentual variaza in principal in functie de specie. Astfel, proteinele totale care in mare parte formeaza exoscheletul insectelor se pot gasi intre 21% la larvele *Oileus rimator* si 80% la femelele adulte de *Lymantria dispar*; lipidele - constituinte majore ale acestor organisme - pot fi regasite in proportie de la 2,2% la termitelile *Nasutitermes corniger* la 60% la larvele

Galleria mellonella (L.); fibrele - care datorita similaritatii structurale dintre chitina (polimer de N-acetil glucozamina legate beta1-4) si celuloza (polimer obtinut prin legarea beta 1-4 a beta D-glucopiranozei) sunt asimilate chitinei sau proteinelor sclerotizate - se pot gasi intre 0,12 - 3,89%, dar si 7,5 - 19% in functie de specie; mineralele totale pot varia intre 2 - 21 mg % g; dintre acestea, calciul se poate regasi intre 0,93 mg % g la pupa de *Musca domestica* si 5,1 mg % g la pupa de *Musca autumnalis*; regasim de asemenea in cantitati apreciable si fosforul, magneziu, sodiu, potasiu, clor, precum si aminoacizi esentiali: izoleucina, leucina, lizina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofan, valina. In ultima perioada de timp au aparut articole in reviste entomologice ce evidentiaza preocuparea cercetatorilor de a utiliza insectele ca surse de medicamente noi, obtinute prin bioinginerie pentru realizarea de produse antimicrobiene, anti-cancer, anti-angiogeneza, factori anti-coagulanti si de vindecare a ranilor [3] [4]. Numeroase insecte si artropode apar in farmacopeea medicinei traditionale coreene, dar putine sunt cunoscute pentru utilizare in medicina moderna. Dintre acestea printre cele mai prescrise sunt *Scolopendra* spp utilizate pentru tratarea artritei. Majoritatea artropodelor sunt colectate sau crescute in peninsula Coreea sau sunt importate in principal din China. Traditia utilizarii reprezinta baza prescriptiilor medicale, fiind sustinuta si de atitudinea pozitiva a oamenilor fata de insecte in comparatie cu celelalte culturi (vestice, europene) [5].

Literatura entomologica cuprinde in marea majoritate a cazurilor doar articole si studii experimentale la nivel de laborator, referitoare la biologia, biochimia, metabolismul, fiziologia insectelor si tratamentele traditionale asiatice in care se folosesc. Pana in prezent se cunosc putine brevete ce valorifica insectele pentru obtinerea de preparate cu aplicatii in medicina umana.

Astfel, brevetul corean KR 20130041863 (A)-2013-04-25 propune o metoda de obtinere unui derivat de heparina din insecte, ce presupune: imersarea insectelor intr-un solvent organic, indepartarea lipidelor, filtrarea si uscarea reziduului. Rezidul obtinut se supune hidrolizei enzimaticice a proteinelor, indepartarea acestora, colectarea zaharurilor si obtinerea glucozaminoglicanilor.

Brevetul CH603162 (A5) / 1978-08-15- propune utilizarea unui extract hormonal uleios din insecte in produse cosmetice creme, unguente, emulsii, obtinut din crisalida lepidopterelor. Extractul se refera la un preparat ce contine hormonul juvenil, obtinut printr-o metoda ce presupune parcurgerea mai multor etape: uscarea insectelor, pulverizarea acestora, amestecarea cu un material poros, extragerea uleiului sub presiune, amestecarea cu alte grasimi lichide ; extractul este utilizat pentru stimularea cresterii.

RO 118114 B1 se refera la un procedeu de obtinere a unei substante farmaceutic active si a unei compozitii farmaceutice pentru tratarea infectiilor hepatice obtinute din insecta *Galleria mellonella*; substanta activa este reprezentata de un complex de aminoacizi esentiali.

RO 122332 B1 se refera la o compozitie farmaceutica sub forma de supozitoare sau ovule pentru tratarea hemoroizilor, adenomului de prostata sau a fibromului uterin in care se realizeaza o asociere a extractului uscat 1% de *Lymantria dispar* cu 82% unt de cacao, 10% apa distilata, 2,68% hexil, si alti aditivi. Substanta activa este reprezentata de o pulbere atomizata sau liofilizata, fara sa se precizeze compozitia chimica, fiind obtinuta din *Lymantria dispar* colectata din mediul natural.

RO 123617 B1 revendica un procedeu de preparare a unei substante biologic active din tesaturile de Lepidoptere, in special *Lymantria dispar* si *Galleria mellonella*, si o compozitie farmaceutica sub forma de ovule sau supozitoare pentru tratarea hemoroizilor, adenomului de prostata, infectii virale, bacteriene, micotice , formatiuni tumorale. Substanta activa este reprezentata de proteinele inhibitoare de sinteza specifice, ce contin 15 aminoacizi esentiali, si se prezinta ca o pulbere atomizata de culoare gri deschis cu o umiditate de 4-5%.

Brevetele MD 2787 (13) F1-2004.07.28, MD 2788 (13) F1-2004.07.28 si MD 2789 (13) F1-2004.07.28 propun 3 preparate entomologice cu efecte hepatoprotectoare si imunomodulatoare, antiinflamatoare si antioxidante si imunomodulatoare si antioxidante , obtinute din Lepidoptere din diferite stadii de dezvoltare: oua cu pupe, larve, pupe, avand o compozitie asemanatoare, dar diferite procentual. Procedeu de obtinere este comun, presupunand aceleasi etape: maruntirea omogena a materialului entomologic, filtrarea, eliminarea apei prin liofilizare. Preparatele entomologice obtinute contin proteine, lipide, colesterol, trigliceride, amilaza, lipaza, antioxidanti, aminoacizi. In nici unul dintre brevete nu se evidentiaza carui component i se datoreaza efectul presupus.

Brevetul MD 4296 (13) B1- se refera la un preparat din larve de *Tenebrio molitor* cu actiune antioxidanta si la un produs farmaceutic pe baza acestuia. Preparatul obtinut prin extractia apoasa urmata de extractia cu etanol 70% si reunirea acestora, contine 45-80% extract hidroalcoolic liofilizat din *Tenebrio molitor* si restul vaselina pana la 100%. Preparatul farmaceutic, sub forma de supozitoare rectale contine 0,25 g extract in ulei de vaselina si 1,75 g gliceride sintetice/supozitor.

Din datele prezentate cu privire la stadiul tehnicii în domeniul obținerii unor substanțe sau produse bioactive entomologice rezultă următoarele:

 3

- domeniile terapeutice catre care se adreseaza aceste preparate sunt: cosmetica - pentru stimularea cresterii parului; in terapeutica infectiilor hepatice, virale, bacteriene, micotice sau pentru efectele hepatoprotectoare, imunomodulatoare, antiinflamatoare, anticoagulanta, in tratarea formatiunilor tumorale, hemoroizilor, adenomului de prostata si a fibromului uterin;
- in brevetele prezentate in stadiul tehnicii nu sunt prezentate date referitoare la standardizarea in substantele active si nici testele ce dovedesc eficacitatea terapeutica;
- procedeele de obtinere a extractelor entomologice sunt diferite fata de cel din inventia propusa: KR 20130041863 (A)-2013-04-25 extractia cu un solvent organic si indepartarea lipidelor; MD 4296 (13) B1 extractia apoasa urmata de extractia cu etanol 70% si reunirea celor doua tipuri de extracte; CH603162 (A5) 1978-08-15- extract hormonal uleios cu utilizari cosmetice.

Inventia propusa spre brevetare reprezinta o imbunatatire a brevetului MD 4296 (13) B1 - „Complex bioactiv din larvele de *Tenebrio Molitor* in ulei de vaselina, procedeu de obtinere a acestuia si produs farmaceutic pe baza lui” . Conform brevetului MD 4296 (13) B1 complexul activ din biomasa entomologica bruta se obtine in 2 trepte de extractie: prima apoasa, urmata de extractia cu etanol 70%, reunirea acestor extracte si liofilizarea lor.

Problema tehnica pe care o rezolva prezenta inventie este obtinerea din biomasa entomologica bruta a larvelor din insecte apartinand claselor Lepidoptere (*Lymantria dispar*, *Bombyx mori*, etc) si Coleoptere (*Tenebrio Molitor*, *Tenebrio opacus*, etc) a unei compozitii farmaceutice noi.

O alta problema tehnica pe care o rezolva inventia este imbunatatirea calitatii complexului entomologic prin aceea ca, prin utilizarea solventilor de polaritati diferite se realizeaza si extractia componentelor lipidice bioactive, alaturi de cele hidroalcoolice si hidrosolubile valorificandu-se toate substantelor biologice active din biomasa entomologica.

Ca o consecinta a imbunatatirii calitatii complexului cu fractia lipidica, o alta problema tehnica pe care o rezolva aplicarea inventiei este largirea gamei efectelor terapeutice antioxidante cu efecte antiproliferative asupra celulelor displazice si de reducere a permeabilitatii vaselor de sange pentru celulele proinflamatorii, dovedite prin teste specifice.

Procedeu de obtinere a complexului entomologic imbogatit consta in extractia selectiva in trei trepte a biomasei entomologice - obtinute din larvele insectelor decongelate si omogenizate -: prima etapa de extractie se realizeaza cu apa purificata, urmata de extractia cu alcool etilic 70% si extractia a treia cu alcool etilic 96% sau cu alt solvent organic de tipul

acetona, hexan, ciclohexan pentru extractia fractiei lipidice. Cele trei extracte obtinute se concentreaza separat cu recuperarea solventilor si se reunesc in final inainte de a se supune operatiei de uscare protejata, sub vid, liofilizare sau atomizare. Complexul entomologic imbogatit se prezinta sub forma unei pulberi usor higroscopice, galben-cafenii si este standardizat in acizi grasi totali de minim 3% din care ω -3 si ω -6 de minim 25% si proteine totale de min. 20%.

Conform inventiei procedeul de obtinere a complexului entomologic imbogatit consta in: biomasa decongelata si omogenizata de larve de insecte apartinand claselor Lepidoptere (*Lymantria dispar*, *Bombyx mori*, etc) si Coleoptere (*Tenebrio Molitor*, *Tenebrio opacus*, etc), se supune operatiei de extractie cu apa purificata, in raport 1:20...1:30 timp de 1...2 ore, extractul apos se colecteaza prin decantare si filtrare si biomasa ramasa se supune in continuare extractiei cu alcool etilic 70% in raport 1:10...1:20, timp de 1...2 ore, extractul hidroalcoolic se colecteaza prin decantare si filtrare si biomasa ramasa se supune extractiei cu alcool etilic 96% in raport 1:5...1:10, timp de 2...4 ore dupa care extractul organic se colecteaza iar pulberea ramasa se considera reziduu. Extractele selective obtinute in cele trei etape ale procesului se prelucreaza separat prin concentrare sub vid, si se reunesc in instalatia de concentrare, sub forma de extracte moi, urmata de etapa de uscare protejata sub vid. Complexul entomologic imbogatit se prezinta sub forma de pulbere galben-cafenie standardizata in continutul de acizi grasi totali de minim 3% din care ω -3 si ω -6 de minim 25% din total si proteine solubile de minim 20%. Compozitiile medicamentoase sub forma de crema, capsule, ovule sau supozitoare conform inventiei sunt constituite din asocierea in proportie 0,1...10% a complexului entomologic imbogatit standardizat, cu ingrediente specifici.

Comparativ cu produsele obtinute conform stadiului tehnicii noul produs prezinta un potential terapeutic ridicat datorat asocierii componentelor existente in cele 3 tipuri de extracte - apos, hidroalcoolic si lipofil, valorificandu-se toate substantele solubile, biologic active, din biomasa entomologica. Complexul entomologic imbogatit, obtinut conform inventiei prin extractia cu solventi selectivi este standardizat in componente biologic active a caror activitate a fost evidentiata prin teste specifice.

Procedeul de obtinere al complexului entomologic imbogatit cu fractia lipidica este reproductibil si se poate aplica si la nivelul industriei farmaceutice.

Datorita standardizarii complexului in componente biologic active si compozitiile medicamentoase sunt reproductibile in ceea ce priveste compozitia chimica.



ACTIVITATEA BIOLOGICA *IN VITRO*

In ceea ce priveste demonstrarea activitatii biologice a complexului entomologic standardizat, aceasta vizeaza aportul fractiei lipidice la imbunatatirea actiunii terapeutice.

Testele de evidentiere a actiunii biologice pentru complexul lipidic entomologic au constat in analiza profilului citotoxic si de actiune specifica in vitro prin studii ale metabolismului celular, statusului proliferativ si al actiunii antiproliferative, de inducere a apoptozei celulare si mecanisme moleculare, antiinflamatoare si antioxidante.

Determinarea efectelor componentelor bioactive a fost efectuata pe linii standardizate de celule umane de tip hiperplazie de prostata, respectiv adenocarcinom de prostata si celule endoteliale vasculare. Aceste materiale biologice reprezinta modele adecvate pentru investigarea desfasurarii proceselor fiziologice si surprinderea declansarii / inhibarii unor parametri celulari si moleculari, ca urmare a actiunii complexelor entomologice in afectiunile tinta.

Dupa determinari de citotoxicitate specifica, comportamentul celular a fost evaluat printr-o serie de teste si analize care sustin efectele produsului revendicat conform inventiei:

- 1) Studii de activitate metabolica – au evidenciat ca fractia lipidica manifesta efectul citotoxic incepand cu concentratia 100 µg/ml.
- 2) Monitorizarea secventialitatii ciclului celular prin marcarea ADN în vederea analizei prin citometrie în flux a ciclului celular (kitul “Cycle Test™ Plus”) si a stadiilor timpurii si tarzii ale apoptozei prin marcarea cu iodura de propidium si anexina (kit Annexin V-Fitc Apoptosis Detection, BD Pharmingen)

a) *Ciclu Celular* - Actiunea antitumorală a unui compus se manifesta si prin inhibarea secventialitatii ciclului celular, reducand fazele de diviziune (faza G0/G1 in care are loc duplicarea continutului celular cu exceptia cromozomilor; faza S, sinteza ADN si replicarea materialului genetic si faza G2/M). Probele biologice au constat in fractie lipidica in intervalul de concentratii: 1µg/ml-10 µg/ml, analizate fata de martorul de cultura si martorul pozitiv de inhibitie a proliferarii si diviziunii celulare, metotrexat (6µM).

Fractia lipidica reduce in maniera doza – efect procentul celular in punctele cheie ale procesului de diviziune (Faza S - preponderent si G2/M), astfel incat indicele de proliferare scade fata de martorul de cultura cu 25%, 18% si respectiv 14%. Prin aceasta actiune este incetinit procesul de diviziune celulara a liniei DU145 de adenocarcinom de prostata.



'6

Tabel 1. Secventialitatea ciclului celular indusa de extractul entomologic pe linia DU145

	G0/G1	%S	%G2/M	indicele de proliferare fata de martor (%)
Martor de cultura	71,8	18,8	9,25	100
Methotrexat 6µM	72,03	26,7	0,24	96,42
Fractie lipidica 10µg/ml	76,54	14,1	7,29	75
Fractie lipidica 5µg/ml	77,11	15,6	7,45	82
Fractie lipidica 1µg/ml	75,34	16,1	8,68	86
CES 10µg/ml	76,26	15,4	8,51	82,14
CES 5µg/ml	78,75	14,7	6,67	75

CES = Complex entomologic standardizat

b) *Apoptoza* - Inducerea apoptozei in disfunctiile hiperproliferative este unul dintre principalele mecanisme de interventie terapeutica. Modelul experimental de testare a actiunii fractiei lipidice evidentiaza procesul apoptotic de la initiere (externalizarea fosfatidil-serinei membranare) si pana in etapele tarzii caracterizate de dezintegrarea membranei celulare:

Tabel 2 : Apoptoza linie DU145 indusa de extract entomologic

	Celule vii (%)	Celule apoptoza timpurie (%)	Celule apoptoza tarzie (%)	Celule necroza (%)	Indice de variatie a celulelor apoptotice fata de martor
Martor de cultura	95,35	1,32	3,06	0,27	100
Martor pozitiv	81,34	9,91	6,71	2,03	379
Fractie lipidica 10µg/ml	86,83	3,74	8,58	0,84	281
Fractie lipidica 5µg/ml	90,09	3,78	5,58	0,54	213
CES 30ug/ml	92,03	2,19	5,36	0,4	172,37
CES 10 ug/ml	91,37	3,21	4,87	0,54	184,47
CES 5ug/ml	92,33	2	4,95	0,72	158,67

Actiunea extractului lipidic, desi inferioara martorului pozitiv, se manifesta in maniera doza –efect, inducand trecerea celulelor in apoptoza timpurie si tarzie depasind dublul celulelor induse in apoptoza de catre martorul de cultura, conform indicelui de variatie din tabelul 2.

3) Evaluarea activitatii antiinflamatorii prin determinarea nivelului de eliberare de citokine (IL6 si IL8) in mediul extracelular utilizand DU-145.(kitul CBA – Human Soluble Protein Flex Set prin tehnica de multiplexare)

Citokinele IL6 si IL8 sunt factori de semnalizare a statusului proinflamator. IL6 este o pleiotropica implicata in progresia neoplazica a diferitelor categorii de tumori, ca mediator al morbiditatii in cancerul de prostata. IL6 este secretata de celulele de prostata normale si tumorale. In timpul progresiei tumorale, IL-6 sufera o tranzitie functionala de la rolul de indicator al dezvoltarii inflamatiei la cel de stimulator pentru proliferarea tumorala, astfel incat

inhibitia acestei citokine este o cale terapeutica de incetinire sau stopare a invaziei metastatice. IL8 este responsabila de cresterea tumorală androgen-independentă, asociată în cancerul de prostată cu chemorezistență, creșterea tumorii și progresia angiogenică.

S-a realizat un model experimental care mimează procesul inflamator „in vitro” prin stimularea celulelor tumorale timp de 24 ore cu un agent pro-inflamator sistemic, TNF α de concentrație 15ng/ml. Efectul va fi estimat procentual, ca variație față de martorul de cultură. Dexametazonă 200ng/ml este martorul pozitiv cu acțiune antiinflamatorie

Tabel 3. Nivelul de eliberare a citokinelor proinflamatorii sub influența extractului entomologic

	IL8 (pg/ml)		Indice de variație față de martor (%)	IL6 (pg/ml)		Indice de variație față de martor (%)
	nestimulate	stimulate TNF α 15ng/ml		nestimulate	stimulate TNF α 15ng/ml	
Martor de cultură	39151,09	213199,28	100	2309,72	3964,19	100
Colchicina 1 μ M	13798,97	14740,99	6,91	908,94	1237,16	31,20
Colchicina 0,5 μ M	9816	11240,15	5,27	1060,23	1217,16	30,70
Dexametazonă 200ng/ml	793,3	3488,38	1,63	252,82	740,04	18,66
Fracție lipidică 10 μ g/ml	7117,51	7867,66	3,69	799,38	440,16	11,10
Fracție lipidică 5 μ g/ml	8395,15	25984,89	12,18	1546,74	2484,53	62,67
Fracție lipidică 1 μ g/ml	8521,49	31860,89	14,94	2532,81	3854,77	97,23
CES 30 μ g/ml	8058,47	17619,25	8,26	1940,62	2613,83	65,93
CES 10 μ g/ml	9153,25	41818,09	19,61	2597,57	5977,67	150
EP			79,78			

EP extract hidric și hidroetanolic obținut conform invenției MD 4296 (13) B1*

Se remarcă acțiunea antiinflamatorie în maniera doza efect a fracției lipidice, care la concentrația de 10 μ g/ml inhibă semnificativ eliberarea de citokine extracelulare în mediul de cultură și anume, cu 88 % pentru nivelul IL6 și 94% pentru IL8. Valorile obținute pentru aceste citokine, în corelare cu martori de sinteză cunoscuți pentru activitățile biologice antitumorale, susțin efectul *in vitro* al produsului entomologic asupra moleculelor ce induc progresia celulară și mecanisme auxiliare în tumorile de prostată.

4) Evaluarea VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) - factor pro-angiogenic de inducere și dezvoltare a proceselor metastatice

Neovascularizarea tumorii este considerată a fi mediata de factori solubili eliberați de celulele tumorale ce pot deveni markeri utili de monitorizare a activității celulelor tumorale. Conceptul de tratare a tumorilor prin inhibiția angiogenezei a luat o mare amploare după descoperirea

moleculilor pro-angiogenice de tipul VEGF si prin urmare, utilizarea lor ca potentiale tinte terapeutice. Exista o semnalizare pro-angiogenica a celulelor tumorale bazata pe eliberarea extracelulara a factorului VEGF, si un raspuns la acest stimul al celulelor endoteliale vasculare normale care incep sa prolifereze si sa formeze o microvasculatura ce va servi la hranirea tumorii intr-un nou situs metastatic. Modelul experimental de testare a inhibitei VEGF de catre fractia lipidica in celulele de adenocarcinom de prostata DU145 a avut la baza mimarea procesului inflamator „in vitro”, asociat cu invazia tumorală prin stimulare cu TNF α 15ng/ml timp de 24h.

Tabel 4: Eliberarea VEGF sub actiunea produsului entomologic

	VEGF (pg/ml)		Indice de variatie fata de martor %
	nestimulate	stimulate TNF alfa 15ng/ml	
Martor de cultura	555,61	686,25	100
Colchicina 1 μ M	245,25	102,19	14,9
Colchicina 0,5 μ M	179,3	78,55	11,44
Dexamethazona 200 ng/ml	369,12	285,1	41,54
Fractie lipidica 10 μ g/ml	493,25	152,59	22,23
Fractie lipidica 5 μ g/ml	728,04	481,58	70,17
Fractie lipidica 1 μ g/ml	793,63	552,67	80,53
CES 30 μ g/ml	754,1	336,96	49,10
CES 10 μ g/ml	874,26	567,22	82,65
CES 5 μ g/ml	793,63	606,93	88,44

Studiile efectuate rezumate in Tabel 4 evidentiaza efectul remarcabil al fractiei lipidice direct proportional cu concentratia testata, prin scaderea pregnantă cu 77 %, 30%, respectiv 20%, a concentratiei de VEGF fata de martorul de cultura. Acestea dovedesc actiunea specifica antiangiogenica *in vitro* a produsului prin care se inhiba propagarea procesului tumoral pana la nivel de mecanisme de metastazare a adenocarcinomului de prostata.

5) Model de expresie genica pentru molecule implicate in mecanismele de initiere si propagare a afectiunilor prostatei

Actiunea fractiei lipidice (10 μ g/ml) a fost evaluata si prin metoda RT-PCR din punct de vedere al profilului anti-proliferativ cuantificat prin nivelul expresiei genelor codificatoare a 92 de molecule responsabile de mecanismele implicate in perturbarile patologice ale prostatei. Din multitudinea de gene analizate cu impact asupra cailor de propagare a semnalelor proliferative ce au loc in etapele de initiere/ propagare a afectiunilor prostatei, fractia lipidica manifesta efect semnificativ de supresare a expresiei unor oncogene care participa la declansarea proceselor tumorale: FZD-1 - frizzled family receptor 1 cu rol in cresterea celulelor prostatice cu proliferare anormala; MDM2 – cu rol in carcinogeneza prostatei, prin inhibarea activarii transcriptionale a

genelor corelate cu blocarea ciclului celular si declansarea apoptozei. fiind frecvent detectata si asociata cu proliferarea celulara si cresterea in volum a prostatei; VEGFA – factorul de crestere a endoteliului vascular A este implicat in promovarea proliferarii celulelor endoteliale, in permeabilitatea vasculara si angiogeneza care reprezinta etape critice in cresterea si dezvoltarea aberanta a volumului prostatei displazice. VEGFA este secretat de celulele adenocarcinomatoase de prostata ceea ce reflecta un nivel crescut la nivel sangvin de VEGF – fiind considerat un potential marker pentru anomalii proliferative de prostata; LEF1 – factorul de legare a enhancer-ului limfoid 1 determina expresia receptorilor androgeni si implicit cresterea si invazia celulelor de prostata aberant proliferative. Se remarca efectul fractiei lipidice de supresare a expresiei genelor cu potential oncogen, in special a VEGFA, ceea ce sugereaza actiunea de blocare a transmiterii unor semnale proliferative in celulele de prostata displazice ca urmare a implicatiilor fiziopatologice ale oncogenelor supresate.

Pe de alta parte, complexul entomologic standardizat are efect de suprareglare a unor gene cu rol de supresor tumoral evidentiind un sinergism de actiune cu functiile genelor supresor tumorale de tipul: CDKN1B - cyclin-dependent kinase inhibitor 1B care functioneaza ca un punct de control pentru ciclul celular G1-S; APC- adenomatous polyposis coli, are un rol critic in caile de semnalizare proliferative; TP53 codifica o molecula cheie cu rol de supresor tumoral care are potential de reactie la diferite forme de stres celular prin activarea genelor implicate in blocarea cresterii celulare aberante si inducerea apoptozei.

Actiunea fractiei lipidice de suprareglare asupra principalei proteine cu rol de supresor tumoral TP53 demonstreaza profilul inhibitor asupra proliferarii aberante a celulelor de prostata.

Concluzii privind activitatea biologica in vitro a complexului entomologic standardizat:

Fractia lipidica are o activitate biologica *in vitro* care se inscrie in algoritmul proceselor proliferative, antioxidante si antiinflamatorii care sustine utilizarea materiei entomologice in terapeutica farmaceutica si dermatocosmetica.

In contextul proliferarii celulare cu transformari hiperplazice si aberante, complexul entomologic sstandardizat are efect antitumoral prin actiune antiproliferativa, incetinind procesul de multiplicare a materialului genetic si astfel procesul de diviziune, fiind si un inductor de apoptoza. Produsul are interventie pronuntata in procese inflamatorii asociate cu factori de semnalizare extracelulara, initiere si dezvoltare tumorala si dovedeste *efect antiinflamator semnificativ* prin inhibitia interleukinelor pana la nivelul inflamatiei cronicizate asociata cu un prognostic negativ in tumorile de prostata. Actiunea produsului se remarca si prin efectul

antiangiogenic, prin *inhibarea factorului VEGF* asociata cu progresia tumorii de la nivel local, la cel metastatic.

Toate aceste actiuni demonstrate la nivel celular sunt sustinute de raspunsul molecular al fractiei lipidice, la nivel de gena, constand in modularea expresiei acestora catre un status metabolic ameliorat cu reducerea efectelor displazice dezvoltarii aberant proliferative a celulelor de prostata.

Exemplul nr 1 . Obținerea complexului entomologic standardizat in acizi grasi ω -3 si ω -6.

1 kg biomasa decongelata si omogenizata, de larve *Lymantria dispar* se supune operatiei de extractie intr-un omogenizator anti-ex, in raport 1:25 timp de 1 ora, cu agitare usoara 50 rpm; extractul apos se colecteaza prin decantare si filtrare pe filtru de hartie industriala si biomasa ramasa se supune in continuare extractiei cu alcool etilic 70% in raport 1:15 timp de 2 ore, cu agitare usoara 50 rpm; extractul hidroalcoolic se colecteaza prin decantare si filtrare si biomasa ramasa se supune extractiei cu hexan in raport 1:7 cu agitare la 50 rpm timp de 4 ore dupa care extractul organic se colecteaza iar biomasa ramasa pe filtru in cantitate de 320 g se considera reziduu. Extractele selective obtinute in cele trei etape ale procesului se prelucreaza separat prin concentrare sub vid , se reunesc sub forma de extract moale si se supune operatiei de uscare protejata sub vid la 80 mbari si 40°C. Complexul entomologic standardizat obtinut in cantitate de 650 g are aspectul unei de pulberi galben-cafenii standardizata in continutul de acizi grasi totali de minim 3% din care ω -3 si ω -6 de 29% din total si proteine solubile de 24%.

Exemplul nr 2. Obținerea produsului medicamentos sub forma de ovule.

Produs medicamentos, conținand ca substanțe biologice active complexul entomologic standardizat in acizi grasi ω -3 si ω -6 in concentratie 1.00 %, condiționat sub formă ovule.

Formula de conditionare:	g/100 g
- Propilenglicol.....	5
- Polietilenglicol 400	3,2
- Complex entomologic standardizat.....	0,1
- Suppocire AM.....	87,5
- Polisorbat 80.....	3,9
- Metilparaben.....	0,2
- Propilparaben.....	0,1

Intr-un vas de omogenizare se dizolva baza de ovule, la viteza de rotatie de 1000 rpm, timp de 10 minute, la temperatura 50 °C; se adauga conservantii si se continua agitarea la o viteza de rotatie de 100 rpm, timp de 60 minute. Se raceste amestecul la 25 °C si se adauga complexul entomologic standardizat sub agitare, la viteza de rotatie de 100 rpm, timp de 60 minute. La sfarsitul procesului masa de ovule se ambaleaza in ambalaj primar pentru ovule.

Exemplul nr 3. Obținerea produsului medicamentos sub forma de supozitoare.

Produs medicamentos, conținând ca substanțe biologice active complexul entomologic standardizat, îmbogățit în acizi grași ω -3 și ω -6, în concentrație 1.00 %, condiționat sub formă supozitoare.

Formula de conditionare:	g/100 g
- Masa Witepsol S 55.....	95
- Glicerol.....	3
- Aerosil.....	2
- Complex entomologic standardizat	0,1

Intr-un vas de omogenizare se dizolva baza de supozitoare la viteza de rotație de aprox. 1300 rpm, timp de 10 minute, la temperatura 50 °C; se adauga glicerolul și se continua agitarea la o viteza de rotație de aprox. 500 rpm, timp de 5 minute. In masa fluidificata se adauga complexul entomologic standardizat sub agitarea, la viteza de rotație de 200 rpm, timp de 20 minute. La final, se adauga aerosilul și se continua agitarea la o viteza de rotație de aprox. 500 rpm, timp de 15 minute. Masa fluidificata și omogenizata se toarna in forme. Dupa racire, masa omogena obtinuta se ambaleaza in ambalaj primar pentru supozitoare.

Exemplul nr 4. Obținerea produsului medicamentos sub forma de unguent:

Produs medicamentos, conținând ca substanțe biologice active complexul entomologic standardizat, îmbogățit în acizi grași ω -3 și ω -6, în concentrație 1.00 %, condiționat sub formă unguent.

Formula de conditionare:	g/100 g
- Ceara alba	5
- Vaselina alba	59
- Parafina lichida	25
- Sesquioleat de sorbitan	10
- Complex entomologic	1

Baza de unguent se prepara prin topirea componentelor pe baia de apa la o temperatura de 60grade C. Se adauga complexul entomologic standardizat in masa fluidificata, se amesteca și se omogeneizeaza pana la racire.

REVENDICARI

1. Procedeu de obtinere a unui complex entomologic standardizat **caracterizat prin aceea ca** biomasa de larve de insecte din ordinul Lepidoptere (*Lymantria dispar*, *Bombyx mori*, etc) si Coleoptere (*Tenebrio Molitor*, *Tenebrio opacus*, etc) decongelata si omogenizata se supune operatiei de extractie cu apa purificata, in raport 1:20...1:30 timp de 1...2 ore, extractul apos se colecteaza prin decantare si filtrare si biomasa ramasa se supune in continuare extractiei cu alcool etilic 70% in raport 1:10...1:20, timp de 1...2 ore, extractul hidroalcoolic se colecteaza prin decantare si filtrare si biomasa ramasa se supune extractiei cu un solvent organic de tipul acetona, hexan, ciclohexan, alcool etilic 96% in raport 1:5...1:10, timp de 2...4 ore dupa care extractul organic se colecteaza, pulberea ramasa se considera reziduu, iar extractele selective obtinute in cele trei etape ale procesului si prelucrate separat prin concentrare sub vid se reunesc in instalatia de concentrare, sub forma de extracte moi, urmata de etapa de uscare protejata sub vid, obtinandu-se complexul entomologic standardizat sub forma de pulbere galben-cafenie.
2. Complex entomologic standardizat, obtinut conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca** se prezinta sub forma unei pulberi omogene de culoare galben-cafenie cu un continut total de acizi grasi de 1-3% dintre care acizii α -linolenic (ω -3) si linoleic (ω -6) in proportie de minim 25% din total si proteine solubile de minim 20%, cu efect de inhibare a eliberarii citokinelor proinflamatorii asociata cu factori de semnalizare intracelulara care moduleaza proliferarea aberanta a celulelor displazice.
3. Compozitii medicamentoase **caracterizate prin aceea ca** au un continut de 0,1...10% complex entomologic standardizat definit in revendicarea 1, conditionate sub forma de crema, unguent, capsule, ovule sau supozitoare cu ingrediente specifice uzuale.

