



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00208**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/07/2017** BOPI nr. **7/2017**

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

(73) Titular:  
• **BIOTEHNOS S.A., STR.GORUNULUI  
NR.3-5, OTOPENI, IF, RO**

(72) Inventatori:  
• **MÂNZATU LILIANA, STR.SANDU ALDEA  
NR.49, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **CIUHRII VEACESLAV, STR.TOAMNEI  
NR.100, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **OLARIU LAURA, STR. LAINICI NR. 22,  
ET. 2, AP. 5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,  
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**MD 4296 B1; RO 123617 B1**

(54) **COMPLEX ENTOMOLOGIC, PROCEDEU DE PREPARARE  
A ACESTUIA ȘI COMPOZIȚIE MEDICAMENTOASĂ  
CARE ÎL CONȚINE**



# RO 130740 B1

1 Prezenta invenție se referă la un complex entomologic standardizat, îmbogățit în acizi  
2 grași  $\omega$ -3 și  $\omega$ -6, un procedeu de preparare a acestuia și o compoziție medicamentoasă sub  
3 formă de cremă, unguent, capsule, ovule și supozitoare pe baza acestuia, cu efecte antiinflama-  
4 toare, antioxidante, antiproliferative asupra celulelor displazice, și de reducere a permeabilității  
5 vaselor de sânge pentru celulele proinflamatorii.

Conform invenției, se obțin:

7 - un complex entomologic nou, standardizat, îmbogățit cu acizi grași totali de 1...3%,  
8 dintre care acizii  $\alpha$ -linolenic ( $\omega$ -3) și linoleic ( $\omega$ -6) în proporție de minimum 25% din total și  
9 proteine solubile de minimum 20%, cu efect de inhibare a eliberării citokinelor proinflamatorii,  
10 asociată cu factorii de semnalizare intracelulară care modulează proliferarea aberantă a celu-  
11 lilor displazice; complexul entomologic standardizat se obține sub forma unei pulberi omogene  
12 de culoare galben-cafenie, în cantitate de 50...60 g/100 g biomasa entomologică brută;

13 - compoziții medicamentoase sub formă de cremă, unguent, capsule, ovule sau supozi-  
14 toare, cu un conținut de 0,1...10% complex entomologic standardizat, condiționat cu ingrediente  
15 specifice uzuale.

16 Insectele reprezintă un grup foarte mare de organisme caracterizate printr-o producti-  
17 vitate uriașă și populații mari. Se estimează că peste un milion de specii de insecte au fost  
18 descrise, alcătuind aproximativ 70% din totalul organismelor. Bogăția și diversitatea acestora  
19 a determinat utilizarea lor de către oameni atât ca hrană, cât și în medicina tradițională. Astfel,  
20 de peste 2000 de ani, medicina tradițională chineză utilizează atât corpul întreg al insectei, cât  
21 și ouăle, produsele și secrețiile insectelor pentru tratarea a diferite boli. De aceea, obținerea din  
22 insecte a unor extracte cu proprietăți terapeutice este considerată o direcție importantă pentru  
23 descoperirea de noi medicamente [Ying FENG, Min ZHAO, Zhao HE, Zhiyong CHEN and  
24 Long SUN; **Research and utilization of medicinal insects in China; Entomological  
25 Research; September 2009; Vol. 39, Issue 5 (pp. 313-316)**].

26 Începând cu anii 1970, s-a pus problema evaluării capacității nutriționale a diferitelor  
27 specii de insecte, în principal ca sursă importantă de proteine [Encyclopedia of Entomology  
28 Springer 200410.1007/0-306-483 80-7\_2920; Nutrient Content of Insects; Mark D. Finke<sup>1</sup>(1)  
29 Scottsdale, Arizona, USA]. Literatura științifică zoologică conține diferite date despre valoarea  
30 nutritivă a insectelor ce evidențiază o compoziție complexă al cărei conținut procentual variază  
31 în principal în funcție de specie. Astfel, proteinele totale care, în mare parte, formează  
32 exoscheletul insectelor se pot găsi între 21% la larvele *Oileus rimator* și 80% la femelele adulte  
33 de *Lymantria dispar*, lipidele - constituenți majore ale acestor organisme - pot fi regăsite în  
34 proporție de la 2,2% la termitelile *Nasutitermes corniger* la 60% la larvele *Galleria mellonella* (L.);  
35 fibrele - care, datorită similarității structurale dintre chitină (polimer de N-acetil glucozamina  
36 legate beta 1-4) și celuloză (polimer obținut prin legarea beta 1-4 a beta D-glucopiranozei) sunt  
37 asimilate chitinei sau proteinelor sclerotizate - se pot găsi între 0,12...3,89%, dar și 7,5...19%  
38 în funcție de specie; mineralele totale pot varia între 2...21 mg % g; dintre acestea, calciul se  
39 poate regăsi între 0,93 mg % g la pupa de *Musca domestica* și 5,1 mg % g la pupa de *Musca  
40 autumnalis*; regăsim, de asemenea, în cantități apreciabile și fosfor, magneziu, sodiu, potasiu,  
41 clor, precum și aminoacizi esențiali: izoleucina, leucina, lizina, metionina, fenilalanina, treonina,  
42 triptofan, valina. În ultima perioadă de timp, au apărut articole în reviste entomologice ce evi-  
43 dențiază preocuparea cercetătorilor de a utiliza insectele ca surse de medicamente noi, obținute  
44 prin bioinginerie pentru realizarea de produse antimicrobiene, anti-cancer, anti-angiogeneza,  
45 factori anti-coagulanți și de vindecare a rănilor [Virginia Melo, Matriza Garcia; „Quality  
46 proteins from edible indigenous insect food of Latin America and Asia" Emir. J. Food  
47 Agric. 2011, 23(3): 283-289; Robert W. Pemberton; "Insects and other arthropods used

**as drugs in Korean traditional medicine" Journal of Ethnopharmacology Volume 65, Issue 3, June 1999, Pages 207-216].** Numeroase insecte și artropode apar în farmacopeea medicinei tradiționale coreene, dar puține sunt cunoscute pentru utilizare în medicina modernă. Dintre acestea, printre cele mai prescrise sunt *Scolopendra spp*, utilizate pentru tratarea artritei. Majoritatea artropodelor sunt colectate sau crescute în peninsula Coreea sau sunt importate, în principal, din China. Tradiția utilizării reprezintă baza prescripțiilor medicale, fiind susținută și de atitudinea pozitivă a oamenilor față de insecte, în comparație cu cea a celorlalte culturi (vestice, europene) [Ratcliffe NA; Mello CB; „*Insect Biochem.Mol Biol* 2011 oct;42( 10): 747-69].

Literatura entomologică cuprinde, în marea majoritate a cazurilor, doar articole și studii experimentale la nivel de laborator, referitoare la biologia, biochimia, metabolismul, fiziologia insectelor și tratamentele tradiționale asiatice în care se folosesc. Până în prezent, se cunosc puține brevete ce valorifică insectele pentru obținerea de preparate cu aplicații în medicina umană.

Astfel, brevetul coreean **KR 20130041863 (A)**/2013-04-25 propune o metodă de obținere a unui derivat de heparină din insecte, ce presupune: imersarea insectelor într-un solvent organic, îndepărtarea lipidelor, filtrarea și uscarea rezidului. Rezidul obținut se supune hidrolizei enzimatică a proteinelor, îndepărtarea acestora, colectarea zaharurilor și obținerea glucozaminoglicanilor.

Brevetul **CH 603162 (A5)**/1978-08-15 propune utilizarea unui extract hormonal uleios din insecte în produse cosmetice creme, unguente, emulsii, obținut din crisalida lepidopterelor. Extractul se referă la un preparat ce conține hormonul juvenil, obținut printr-o metodă ce presupune parcurgerea mai multor etape: uscarea insectelor, pulverizarea acestora, amestecarea cu un material poros, extragerea uleiului sub presiune, amestecarea cu alte grăsimi lichide; extractul este utilizat pentru stimularea creșterii.

**RO 118114 B1** se referă la un procedeu de obținere a unei substanțe farmaceutic active și a unei compoziții farmaceutice pentru tratarea infecțiilor hepatice obținute din insecta *Galleria mellonella*; substanța activă este reprezentată de un complex de aminoacizi esențiali.

**RO 122332 B1** se referă la o compoziție farmaceutică sub formă de supozitoare sau ovule pentru tratarea hemoroizilor, adenomului de prostată sau a fibromului uterin în care se realizează o asociere a extractului uscat 1% de *Lymantria dispar* cu 82% unt de cacao, 10% apă distilată, 2,68% hexil, și alți aditivi. Substanța activă este reprezentată de o pulbere atomizată sau liofilizată, fără să se precizeze compoziția chimică, fiind obținută din *Lymantria dispar* colectată din mediul natural.

**RO 123617 B1** revendică un procedeu de preparare a unei substanțe biologic active din țesuturile de Lepidoptere, în special *Lymantria dispar* și *Galleria mellonella*, și o compoziție farmaceutică sub formă de ovule sau supozitoare pentru tratarea hemoroizilor, adenomului de prostată, infecții virale, bacteriene, micotice, formațiuni tumorale. Substanța activă este reprezentată de proteinele inhibitoare de sinteză specifice, ce conțin 15 aminoacizi esențiali, și se prezintă ca o pulbere atomizată 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** și **MD 2789 (13) F1-2004.07.28** propun 3 preparate entomologice cu efecte hepatoprotectoare și imunomodulatoare, antiinflamatoare și antioxidante, și imunomodulatoare și antioxidante, obținute din Lepidoptere din diferite stadii de dezvoltare: ouă cu pupe, larve, pupe, având o compoziție asemănătoare, dar diferite procentual. Procedeu de obținere este comun, presupunând aceleași etape: mărunțirea omogenă a materialului entomologic, filtrarea, eliminarea apei prin liofilizare.

# RO 130740 B1

1     Preparatele entomologice obținute conțin proteine, lipide, colesterol, trigliceride, amilaza, lipaza,  
antioxidanți, aminoacizi. În niciunul dintre brevete nu se evidențiază cărui component i se  
3     datorează efectul presupus.

5     Brevetul **MD 4296 (13) B1** se referă la un preparat din larve de *Tenebrio molitor* cu acți-  
une antioxidantă și la un produs farmaceutic pe baza acestuia. Preparatul obținut prin extracția  
7     apoasă, urmată de extracția cu etanol 70% și reunirea acestora, conține 45...80% extract hidro-  
alcoolic liofilizat din *Tenebrio molitor* și restul până la 100% vaselină. Preparatul farmaceutic,  
9     sub formă de supozitoare rectale, conține 0,25 g extract în ulei de vaselină și 1,75 g gliceride  
sintetice/supozitor.

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

13     - domeniile terapeutice către care se adresează aceste preparate sunt: cosmetica -  
pentru stimularea creșterii părului; în terapeutila infecțiilor hepatice, virale, bacteriene, micotice  
sau pentru efectele hepatoprotectoare, imunomodulatoare, antiinflamatoare, anticoagulante, în  
15     tratarea formațiunilor tumorale, hemoroizilor, adenomului de prostată și a fibromului uterin;

17     - în brevetele prezentate în stadiul tehnicii nu sunt prezentate date referitoare la  
standardizarea în substanțele active și nici testele ce dovedesc eficacitatea terapeutică;

19     - procedeele de obținere a extractelor entomologice sunt diferite față de cel din invenția  
propusă: **KR 20130041863 (A)** 2013-04-25 extracția cu un solvent organic și îndepărtarea  
21     lipidelor; **MD 4296 (13) B1** extracția apoasă urmată de extracția cu etanol 70% și reunirea celor  
două tipuri de extracte; **CH 603162 (A5)** 1978-08-15 extract hormonal uleios cu utilizări  
cosmetice.

23     Invenția propusă spre brevetare reprezintă o îmbunătățire a brevetului **MD 4296 (13) B1**  
- „Complex bioactiv din larvele de *Tenebrio Molitor* în ulei de vaselină, procedeu de obținere a  
25     acestuia și produs farmaceutic pe baza lui”. Conform brevetului **MD 4296 (13) B1**, complexul  
activ din biomasa entomologică brută se obține în 2 trepte de extracție: prima apoasă, urmată  
27     de extracția cu etanol 70%, reunirea acestor extracte și liofilizarea lor.

29     Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție este obținerea din biomasa  
entomologică brută a larvelor din insecte aparținând claselor Lepidoptere (*Lymantria dispar*,  
*Bombyx mori*, etc.) și Coleoptere (*Tenebrio Molitor*, *Tenebrio opacus*, etc.) a unei compoziții  
31     farmaceutice cu efect terapeutic antioxidant, antiproliferativ asupra celulelor displazice, și de  
reducere a permeabilității vaselor de sânge pentru celulele proinflamatorii, dovedite prin teste  
33     specifice.

35     Soluția propusă constă într-un complex entomologic standardizat și un procedeu de  
preparare a acestuia în care, prin utilizarea unor solvenți de polarități diferite, se realizează  
37     extracția componentelor lipidice bioactive, alături de cele hidroalcoolice și hidrosolubile,  
valorificându-se toate substanțele biologice active din biomasa entomologică.

39     Astfel, într-un prim aspect, invenția se referă la un complex entomologic standardizat,  
care se prezintă sub forma unei pulberi omogene de culoare galben-cafenie cu un conținut total  
de acizi grași de 1...3% dintre care acizii  $\alpha$ -linolenic ( $\omega$ -3) și linoleic ( $\omega$ -6), în proporție de  
41     minimum 25% din total, și proteine solubile de minimum 20%, procentele fiind exprimate în  
greutate.

43     De asemenea, invenția se referă la un procedeu de preparare a unui complex entomo-  
logic standardizat, definit mai sus, în care biomasa de larve de insecte din ordinul Lepidoptere  
45     (*Lymantria dispar*, *Bombyx mori*, etc.) și Coleoptere (*Tenebrio Molitor*, *Tenebrio opacus*, etc.),  
decongelată și omogenizată, se supune operației de extracție cu apă purificată, în raport  
47     1:20...1:30 în greutate, timp de 1...2 h, extractul apos se colectează prin decantare și filtrare,

# RO 130740 B1

iar biomasa rămasă se supune în continuare extracției cu alcool etilic 70% în raport 1:10...1:20, timp de 1...2 h, extractul hidroalcoolic se colectează prin decantare și filtrare, iar biomasa rămasă se supune extracției cu un solvent organic de tipul acetonă, hexan, ciclohexan, alcool etilic 96% în raport 1:5...1:10 în greutate, timp de 2...4 h, după care extractul organic se colectează, pulberea rămasă se consideră reziduu, iar extractele selective obținute în cele trei etape ale procesului și prelucrate separat prin concentrare sub vid se reunesc în instalația de concentrare, sub formă de extracte moi, urmată de etapa de uscare protejată sub vid, obținându-se complexul entomologic standardizat sub formă de pulbere galben-cafenie.

De asemenea invenția se referă la o compoziție medicamentoasă cu efect de inhibare a eliberării citokinelor proinflamatorii, asociată cu factori de semnalizare intracelulară care modulează proliferarea aberantă a celulelor displazice, care are un conținut de 0,1...10% complex entomologic standardizat, definit în revendicarea 1, condiționată sub formă de cremă, unguent, capsule, ovule sau supozitoare cu ingrediente specifice uzuale.

Procedeul de obținere a complexului entomologic îmbogățit constă în extracția selectivă în trei trepte a biomasei entomologice obținute din larvele insectelor decongelate și omogenizate: prima etapă de extracție se realizează cu apă purificată, urmată de extracția cu alcool etilic 70% și extracția a treia cu alcool etilic 96% sau cu alt solvent organic de tipul acetonă, hexan, ciclohexan pentru extracția fracției lipidice. Cele trei extracte obținute se concentrează separat cu recuperarea solvenților și se reunesc în final înainte de a se supune operației de uscare protejată, sub vid, liofilizare sau atomizare. Complexul entomologic îmbogățit se prezintă sub forma unei pulberi ușor higroscopice, galben-cafenii, și este standardizat în acizi grași totali de minimum 3%, din care  $\omega$ -3 și  $\omega$ -6 de minimum 25% și proteine totale de minimum 20%.

Conform invenției, procedeul de obținere a complexului entomologic îmbogățit constă în: biomasa decongelată și omogenizată de larve de insecte aparținând claselor Lepidoptere (*Lymantria dispar*, *Bombyx mori*, etc.) și Coleoptere (*Tenebrio Molitor*, *Tenebrio opacus*, etc.), se supune operației de extracție cu apă purificată, în raport 1:20...1:30, timp de 1...2 h, extractul apos se colectează prin decantare și filtrare, iar biomasa rămasă se supune în continuare extracției cu alcool etilic 70% în raport 1:10...1:20, timp de 1...2 h, extractul hidroalcoolic se colectează prin decantare și filtrare, iar biomasa rămasă se supune extracției cu alcool etilic 96% în raport 1:5...1:10, timp de 2...4 h, după care extractul organic se colectează, iar pulberea rămasă se consideră reziduu. Extractele selective obținute în cele trei etape ale procesului se prelucrează separat prin concentrare sub vid, și se reunesc în instalația de concentrare, sub formă de extracte moi, urmată de etapa de uscare protejată sub vid. Complexul entomologic îmbogățit se prezintă sub formă de pulbere galben-cafenie standardizată, în conținutul de acizi grași totali de minimum 3%, din care  $\omega$ -3 și  $\omega$ -6 de minimum 25% din total și proteine solubile de minimum 20%. Compozițiile medicamentoase sub formă de cremă, capsule, ovule sau supozitoare conform invenției sunt constituite din asocierea în proporție de 0,1...10% a complexului entomologic îmbogățit standardizat, cu ingrediente specifice.

Comparativ cu produsele obținute conform stadiului tehnicii, noul produs prezintă un potențial terapeutic ridicat, datorat asocierii componentelor existente în cele 3 tipuri de extracte: apos, hidroalcoolic și lipofil, valorificându-se toate substanțele solubile, biologice active, din biomasa entomologică. Complexul entomologic îmbogățit, obținut conform invenției prin extracția cu solvenți selectivi, este standardizat în componente biologice active a căror activitate a fost evidențiată prin teste specifice.

Procedeul de obținere a complexului entomologic îmbogățit cu fracția lipidică este reproductibil și se poate aplica și la nivelul industriei farmaceutice.

# RO 130740 B1

1 Datorită standardizării complexului în componente biologice active, și compozițiile  
medicamentoase sunt reproductibile în ceea ce privește compoziția chimică.

## 3 Activitatea biologică *in vitro*

5 În ceea ce privește demonstrarea activității biologice a complexului entomologic  
standardizat, aceasta vizează aportul fracției lipidice la îmbunătățirea acțiunii terapeutice.

7 Testele de evidențiere a acțiunii biologice pentru complexul lipidic entomologic au  
constat în analiza profilului citotoxic și de acțiune specifică *in vitro*, prin studii ale metabolismului  
celular, statusului proliferativ, și ale acțiunii antiproliferative, de inducere a apoptozei celulare,  
9 și mecanisme moleculare, antiinflamatoare și antioxidante.

11 Determinarea efectelor componentelor bioactive a fost efectuată pe linii standardizate  
de celule umane de tip hiperplazie de prostată, respectiv, adenocarcinom de prostată și celule  
endoteliale vasculare. Aceste materiale biologice reprezintă modele adecvate pentru investi-  
13 garea desfășurării proceselor fiziologice și surprinderea declanșării/inhibării unor parametri  
celulari și moleculari, ca urmare a acțiunii complexelor entomologice în afecțiunile țintă.

15 După determinări de citotoxicitate specifică, comportamentul celular a fost evaluat  
printr-o serie de teste și analize care susțin efectele produsului revendicat conform invenției:

17 1. Studii de activitate metabolică - au evidențiat că fracția lipidică manifestă efectul  
citotoxic începând cu concentrația 100 µg/ml.

19 2. Monitorizarea secvențialității ciclului celular prin marcarea ADN în vederea analizei  
prin citometrie în flux a ciclului celular (kitul "Cycle Test™ Plus") și a stadiilor timpurii și târzii ale  
21 apoptozei, prin marcarea cu iodură de propidiu și anexină (kit Annexin V-Fitc Apoptosis  
Detection, BD Pharmingen).

23 a) Ciclul Celular - Acțiunea antitumorală a unui compus se manifestă și prin inhibarea  
secvențialității ciclului celular, reducând fazele de diviziune (faza G0/G1, în care are loc  
25 duplicarea conținutului celular, cu excepția cromozomilor; faza S, sinteza ADN și replicarea  
materialului genetic, și faza G2/M). Probele biologice au constat în fracție lipidică în intervalul  
27 de concentrații 1...10 µg/ml, analizate față de martorul de cultură și martorul pozitiv de inhibiție  
a proliferării și diviziunii celulare, metotrexat (6 µM).

29 Frația lipidică reduce în maniera doză-efect procentul celular în punctele cheie ale  
procesului de diviziune (Faza S - preponderent și G2/M), astfel încât indicele de proliferare  
31 scade față de martorul de cultură cu 25%, 18% și, respectiv, 14%. Prin această acțiune este  
încetinit procesul de diviziune celulară a liniei DU 145 de adenocarcinom de prostată.

33 *Tabelul 1*

35 *Secvențialitatea ciclului celular, indusă de extractul entomologic pe linia DU145*

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

CES = Complex entomologie standardizat

# RO 130740 B1

b) Apoptoza - Inducerea apoptozei în disfuncțiile hiperproliferative este unul dintre principalele mecanisme de intervenție terapeutică. Modelul experimental de testare a acțiunii fracției lipidice evidențiază procesul apoptotic de la inițiere (externalizarea fosfatidil-serinei membranare) și până în etapele târzii, caracterizate de dezintegrarea membranei celulare.

Tabelul 2

Apoptoza linie DU 145, indusă de extract entomologic

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

Acțiunea extractului lipidic, deși inferioară matorului pozitiv, se manifestă în maniera doză-efect, inducând trecerea celulelor în apoptoza timpurie și târzie depășind dublul celulelor induse în apoptoză de către matorul de cultură, conform indicelui de variație din tabelul 2.

3) Evaluarea activității antiinflamatorii prin determinarea nivelului de eliberare de citokine (IL6 și IL8) în mediul extracelular, utilizând DU-145 (kitul CB A - Human Soluble Protein Flex Set, prin tehnica de multiplexare).

Citokinele IL6 și IL8 sunt factori de semnalizare a statusului proinflamator. IL6 este o pleiotropică implicată în progresia neoplazică a diferitelor categorii de tumori, ca mediator al morbidității în cancerul de prostată. IL6 este secretată de celulele de prostată normale și tumorale. În timpul progresiei tumorale, IL6 suferă o tranziție funcțională de la rolul de indicator al dezvoltării inflamației la cel de stimulator pentru proliferarea tumorală, astfel încât inhibiția acestei citokine este o cale terapeutică de încetinire sau stopare a invaziei metastatice. IL8 este responsabilă de creșterea 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 h, cu un agent pro-inflamator sistemic, TNFα de concentrație 15 ng/ml. Efectul va fi estimat procentual, ca variație față de matorul de cultură. Dexametazona 200 ng/ml este matorul pozitiv cu acțiune antiinflamatorie.

Tabelul 3

Nivelul de eliberare a citokinelor proinflamatorii sub influența extractului entomologic

	IL8 (pg/ml)			IL6 (pg/ml)		
	Nestimulate	Stimulate TNFα 15 ng/ml	Indice de variație față de mator (%)	Nestimulate	Stimulate TNFα 15 ng/ml	Indice de variație față de mator (%)
Mator de cultura	39151,09	213199,28	100	2309,72	3964,19	100
Colchicina 1μM	13798,97	14740,99	6,91	908,94	1237,16	31,20
Colchicina 0,5 μM	9816	11240,15	5,27	1060,23	1217,16	30,70

# RO 130740 B1

Tabelul 3 (continuare)

	IL8 (pg/ml)		Indice de variație față de martor (%)	IL6 (pg/ml)		Indice de variație față de martor (%)
	Nestimate	Stimate TNF $\alpha$ 15 ng/ml		Nestimate	Stimate TNF $\alpha$ 15 ng/ml	
Fracție lipidică 10 $\mu$ g/ml	7117,51	7867,66	3,69	799,38	440,16	11,10
Fracție lipidică 5 $\mu$ g/ml	8395,15	25984,89	12,18	1546,74	2484,53	62,67
Fracție lipidică 1 $\mu$ g/ml	8521,49	31860,89	14,94	2532,81	3854,77	97,23
CES 30 $\mu$ g/ml	8058,47	17619,25	8,26	1940,62	2613,83	65,93
CES 10 $\mu$ 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  $\mu$ 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 corelație 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.

Neovascularizația tumorii este considerată a fi mediată 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 moleculelor pro-angiogenice de tipul VEGF și, prin urmare, utilizarea lor ca potențiale ținte terapeutice. Există o semnalizare pro-angiogenică a celulelor tumorale, bazată pe eliberarea extracelulară a factorului VEGF, și un răspuns la acest stimul al celulelor endoteliale vasculare normale care încep să prolifereze și să formeze o microvasculatură ce va servi la hrănirea tumorii într-un nou situs metastatic. Modelul experimental de testare a inhibiției VEGF de către fracția lipidică în celulele de adenocarcinom de prostată DU 145 a avut la bază mimarea procesului inflamator „*in vitro*”, asociat cu invazia tumorală prin stimulare cu TNF $\alpha$  15 ng/ml timp de 24 h.

Tabelul 4

*Eliberarea VEGF sub acțiunea produsului entomologic*

	VEGF (pg/ml)		Indice de variație față de martor %
	nestimate	stimate TNF alfa 15 ng/ml	
Martor de cultură	555,61	686,25	100
Colchicina 1 $\mu$ M	245,25	102,19	14,9
Colchicina 0,5 $\mu$ M	179,3	78,55	11,44
Dexametazona 200 ng/ml	369,12	285,1	41,54
Fracție lipidică 10 $\mu$ g/ml	493,25	152,59	22,23
Fracție lipidică 5 $\mu$ g/ml	728,04	481,58	70,17
Fracție lipidică 1 $\mu$ g/ml	793,63	552,67	80,53
CES 30 $\mu$ g/ml	754,1	336,96	49,10
CES 10 $\mu$ g/ml	874,26	567,22	82,65
CES 5 $\mu$ g/ml	793,63	606,93	88,44



# RO 130740 B1

Studiile efectuate, rezumate în tabelul 4 evidențiază efectul remarcabil al fracției lipidice, direct proporțional cu concentrația testată, prin scăderea pregnantă cu 77%, 30%, respectiv, 20%, a concentrației de VEGF față de martorul de cultură. Acestea dovedesc acțiunea specifică antiangiogenică *in vitro* a produsului, prin care se inhibă propagarea procesului tumoral până la nivel de mecanisme de metastazare a adenocarcinomului de prostată.

5) Model de expresie genică pentru molecule implicate în mecanismele de inițiere și propagare a afecțiunilor prostatei.

Acțiunea fracției lipidice (10 μg/ml) a fost evaluată și 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 în perturbările patologice ale prostatei. Din multitudinea de gene analizate, cu impact asupra căilor de propagare a semnalelor proliferative ce au loc în etapele de inițiere/propagare a afecțiunilor prostatei, fracția lipidică manifestă efect semnificativ de supresare a expresiei unor oncogene care participă la declanșarea proceselor tumorale: FZD-1- frizzled family receptor 1 cu rol în creșterea celulelor prostatice cu proliferare anormală; MDM2 - cu rol în carcinogeneza prostatei, prin inhibarea activării transcripționale a genelor corelate cu blocarea ciclului celular și declanșarea apoptozei, fiind frecvent detectată și asociată cu proliferarea celulară și creșterea în volum a prostatei; VEGFA - factorul de creștere a endoteliului vascular A este implicat în promovarea proliferării celulelor endoteliale, în permeabilitatea vasculară și angiogeneza care reprezintă etape critice în creșterea și dezvoltarea aberantă a volumului prostatei displazice. VEGFA este secretat de celulele adenocarcinomatose de prostată, ceea ce reflectă un nivel crescut la nivel sangvin de VEGF - fiind considerat un potențial marker pentru anomalii proliferative de prostată; LEF1 - factorul de legare a enhancerului limfoid 1 determină expresia receptorilor androgeni și, implicit, creșterea și invazia celulelor de prostată aberant proliferative. Se remarcă efectul fracției lipidice de supresare a expresiei genelor cu potențial oncogen, în special a VEGFA, ceea ce sugerează acțiunea de blocare a transmiterii unor semnale proliferative în celulele de prostată displazice ca urmare a implicațiilor fiziopatologice ale oncogenelor supresate.

Pe de altă parte, complexul entomologic standardizat are efect de suprareglare a unor gene cu rol de supresor tumoral, evidențiind un sinergism de acțiune cu funcțiile genelor supresor tumorale de tipul: CDKN1B - cyclin-dependent kinase inhibitor 1B care funcționează ca un punct de control pentru ciclul celular G1-S; APC - adenomatous polyposis coli, are un rol critic în căile de semnalizare proliferative; TP53 codifică o moleculă cheie cu rol de supresor tumoral, care are potențial de reacție la diferite forme de stres celular prin activarea genelor implicate în blocarea creșterii celulare aberante și inducerea apoptozei.

Acțiunea fracției lipidice de suprareglare asupra principalei proteine cu rol de supresor tumoral TP53 demonstrează profilul inhibitor asupra proliferării aberante a celulelor de prostată.

Concluzii privind activitatea biologică *in vitro* a complexului entomologic standardizat:

Fracția lipidică are o activitate biologică *in vitro* care se înscrie în algoritmul proceselor proliferative, antioxidante și antiinflamatorii, care susține utilizarea materiei entomologice în terapeuța farmaceutică și dermatocosmetică.

În contextul proliferării celulare cu transformări hiperplazice și aberante, complexul entomologic standardizat are efect antitumoral prin acțiune antiproliferativă, încetinind procesul de multiplicare a materialului genetic și astfel procesul de diviziune, fiind și un inductor de apoptoză. Produsul are intervenție pronunțată în procese inflamatorii asociate cu factori de semnalizare extracelulară, inițiere și dezvoltare tumorală, și dovedește efect antiinflamator semnificativ prin inhibiția interleukinelor până la nivelul inflamației cronicizate, asociată cu un prognostic negativ în tumorile de prostată. Acțiunea produsului se remarcă și prin efectul antiangiogenic, prin inhibarea factorului VEGF, asociată cu progresia tumorii de la nivel local, la cel metastatic.

# RO 130740 B1

1 Toate aceste acțiuni demonstrate la nivel celular sunt susținute de răspunsul molecular  
al fracției lipidice, la nivel de genă, constând în modularea expresiei acestora către un status  
3 metabolic ameliorat, cu reducerea efectelor displazice ale dezvoltării aberant proliferative a  
celulelor de prostată.

## 5 Exemplul 1

### Obținerea complexului entomologic standardizat în acizi grași $\omega$ -3 și $\omega$ -6

7 1 kg biomasă decongelată și omogenizată, de larve *Lymantria dispar*, se supune  
operației de extracție într-un omogenizator anti-ex, în raport 1:25, timp de 1 h, cu agitare ușoară  
9 la 50 rpm; extractul apos se colectează prin decantare și filtrare pe filtru de hârtie industrială și  
biomasa rămasă se supune, în continuare, extracției cu alcool etilic 70%, în raport 1:15, timp  
11 de 2 h, cu agitare ușoară la 50 rpm; extractul hidroalcoolic se colectează prin decantare și  
filtrare, și biomasa rămasă se supune extracției cu hexan în raport 1:7, cu agitare la 50 rpm,  
13 timp de 4 h, după care extractul organic se colectează, iar biomasa rămasă pe filtru în cantitate  
de 320 g se consideră reziduu. Extractele selective obținute în cele trei etape ale procesului se  
15 prelucrează separat prin concentrare sub vid, se reunesc sub formă de extract moale, și se  
supun operației de uscare protejată sub vid, la 80 mbari și 40°C. Complexul entomologic stan-  
17 dardizat obținut în cantitate de 650 g are aspectul unei de pulberi galben-cafenii, standardizată  
în conținutul de acizi grași totali de minimum 3%, din care  $\omega$ -3 și  $\omega$ -6 de 29% din total și proteine  
19 solubile de 24%.

## 21 Exemplul 2

### Obținerea produsului medicamentos sub formă de ovule

21 Produs medicamentos, conținând ca substanțe biologic active complexul entomologic  
standardizat în acizi grași  $\omega$ -3 și  $\omega$ -6, în concentrație 1,00%, condiționat sub formă de ovule.

23 Formula de condiționare: . . . . . g/100 g

25 - Propilenglicol . . . . .	5
- Polietilenglicol 400 . . . . .	3,2
27 - Complex entomologic standardizat . . . . .	0,1
- Suppocire AM . . . . .	87,5
29 - Polisorbat 80 . . . . .	3,9
- Metilparaben . . . . .	0,2
31 - Propilparaben . . . . .	0,1

Într-un vas de omogenizare, se dizolvă baza de ovule, la viteza de rotație de 1000 rpm,  
33 timp de 10 min, la temperatura 50°C; se adaugă conservanții și se continuă agitarea la o viteză  
de rotație de 100 rpm, timp de 60 min. Se răcește amestecul la 25°C și se adaugă complexul  
35 entomologic standardizat sub agitare, la viteza de rotație de 100 rpm, timp de 60 min. La  
sfârșitul procesului, masa de ovule se ambalează în ambalaj primar pentru ovule.

## 37 Exemplul 3

### Obținerea produsului medicamentos sub formă de supozitoare

39 Produs medicamentos, conținând ca substanțe biologic active complexul entomologic  
standardizat, îmbogățit în acizi grași  $\omega$ -3 și  $\omega$ -6, în concentrație 1,00%, condiționat sub formă  
41 de supozitoare.

Formula de condiționare: . . . . . g/100 g

43 - Masa Witepsol S 55 . . . . .	95
- Glicerol . . . . .	3
45 - Aerosil . . . . .	2
- Complex entomologic standardizat . . . . .	0,1

## RO 130740 B1

Într-un vas de omogenizare se dizolvă baza de supozitoare la viteza de rotație de aproximativ 1300 rpm, timp de 10 min, la temperatura 50°C; se adaugă glicerolul și se continuă agita- 1  
rea la o viteză de rotație de aproximativ 500 rpm, timp de 5 min. În masa fluidificată se adaugă 3  
complexul entomologic standardizat, sub agitare, la viteza de rotație de 200 rpm, timp de  
20 min. La final, se adaugă aerosilul și se continuă agitarea la o viteză de rotație de aproximativ 5  
500 rpm, timp de 15 min. Masa fluidificată și omogenizată se toarnă în forme. După răcire, masa  
omogenă obținută se ambalează în ambalaj primar pentru supozitoare. 7

### Exemplul 4

*Obținerea produsului medicamentos sub formă de unguent* 9

Produs medicamentos, conținând ca substanțe biologice active complexul entomologic  
standardizat, îmbogățit în acizi grași  $\omega$ -3 și  $\omega$ -6, în concentrație 1,00%, condiționat sub formă 11  
de unguent.

Formula de condiționare: ..... g/100 g 13

- Ceară albă ..... 5

- Vaselina albă ..... 59 15

- Parafina lichidă ..... 25

- Sesquioleat de sorbitan ..... 10 17

- Complex entomologic ..... 1

Baza de unguent se prepară prin topirea componentelor pe baia de apă la o temperatură 19  
de 60°C. Se adaugă complexul entomologic standardizat în masa fluidificată, se amestecă și  
se omogenizează până la răcire. 21

## Revendicări

1  
3 1. Complex entomologic standardizat, **caracterizat prin aceea că** se prezintă sub forma  
5 unei pulberi omogene de culoare galben-cafenie, cu un conținut total de acizi grași de 1...3%,  
dintre care acizii  $\alpha$ -linolenic ( $\omega$ -3) și linoleic ( $\omega$ -6) în proporție de minimum 25% din total, și  
7 proteine solubile de minimum 20%, procentele fiind exprimate în greutate.

9 2. Procedeu de preparare a unui complex entomologic standardizat definit în  
11 revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** biomasa de larve de insecte din ordinul Lepidoptere  
(*Lymantria dispar*, *Bombyx mori*, etc.) și Coleoptere (*Tenebrio Molitor*, *Tenebrio opacus*, etc.),  
13 decongelată și omogenizată, se supune operației de extracție cu apă purificată, în raport  
1:20...1:30 în greutate, timp de 1...2 h, extractul apos se colectează prin decantare și filtrare,  
iar biomasa rămasă se supune, în continuare, extracției cu alcool etilic 70%, în raport  
15 1:10...1:20, timp de 1...2 h, extractul hidroalcoolic se colectează prin decantare și filtrare, iar bio-  
masa rămasă se supune extracției cu un solvent organic de tipul acetona, hexan, ciclohexan,  
17 alcool etilic 96% în raport 1:5...1:10 în greutate, timp de 2...4 h, după care extractul organic se  
colectează, pulberea rămasă se consideră reziduu, iar extractele selective obținute în cele trei  
19 etape ale procesului și prelucrate separat prin concentrare sub vid se reunesc în instalația de  
concentrare, sub formă de extracte moi, urmată de etapa de uscare protejată sub vid,  
obținându-se complexul entomologic standardizat, sub formă de pulbere galben-cafenie.

21 3. Compoziție medicamentoasă cu efect de inhibare a eliberării citokinelor proinflamatorii  
asociată cu factori de semnalizare intracelulară care modulează proliferarea aberantă a celulelor  
23 displazice, **caracterizate prin aceea că** are un conținut de 0,1...10% complex entomologic  
standardizat definit în revendicarea 1, condiționat sub formă de cremă, unguent, capsule, ovule  
sau supozitoare cu ingrediente specifice uzuale.

