

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044135**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.07.26**

**(21)** Номер заявки  
**202000311**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.07.10**

**(51)** Int. Cl. *A61K 9/02* (2006.01)  
*A61K 9/20* (2006.01)  
*A61K 9/48* (2006.01)  
*A61K 35/64* (2015.01)  
*A61P 13/08* (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ЛИЧИНОК LYMANTRIA  
DISPAR**

---

**(31)** а 2018 0055

**(32)** 2018.07.19

**(33)** MD

**(43)** 2021.04.06

**(86)** PCT/MD2019/000004

**(87)** WO 2020/017944 2020.01.23

**(71)(72)(73)** Заявитель, изобретатель и  
патентовладелец:

**ЧУХРИЙ ЧЕСЛАВ (MD)**

**(56)** RU-C1-2117701

SU-A-577001

RO-B1-122332

Adenoprosin - ofitsialnaia instruksiia po  
primeneniiu. LP-004871. 18.06.2018 [on lain]  
[retrieved on 24.09.2019] Found in Internet: [https://  
medi.ra/instrukciya/adenoprosin\\_14831](https://medi.ra/instrukciya/adenoprosin_14831)

RO-B1-123368

RU-C1-2639479

MD-B1-4296

**(74)** Представитель:

**Ломский С.М. (RU)**

---

**(57)** Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к препаратам для лечения предстательной железы. Активный комплекс из личинок *Lymantria dispar*, характеризующийся тем, что в качестве активного комплекса используется вся биомасса личинок - 3-го, 4-го возраста. Способ получения активного комплекса из личинок *Lymantria dispar*. Фармацевтический препарат. Заявленное изобретение позволяет использовать полный комплекс биологически активных веществ из личинок *Lymantria dispar*, за счет использования в качестве сырья всего активного комплекса из биомассы личинок 3-го, 4-го возраста и исключения этапов, которые могут привести к разрушению термочувствительных компонентов активного комплекса.

**044135**

**B1**

**044135**

**B1**

Изобретение относится к области фармацевтики, а именно к способам получения противовоспалительных препаратов, для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы, ассоциированной или нет с хроническим простатитом.

Известен энтомологический активный комплекс в вазелиновом масле, полученный из биомассы личинок *Tenebrio molitor*, содержащий 45-80% общего энтомологического экстракта и 55-20% вазелинового масла, эффективный при лечении заболеваний простаты, характеризующийся высокой специфической антиоксидантной активностью: способностью ингибировать перекисное окисление липопротеинов (CI50% = 16 мг/мл) и способностью ингибировать радикал нитроксида (CI50% = 20 мг/мл). Для получения активного комплекса применяется сложный технологический процесс, который включает выращивание насекомых *Tenebrio molitor* в контролируемых условиях на искусственной стандартизированной среде; четырехкратное промывание личинок четырьмя объемами дистиллированной воды; дезинфекцию личинок ультрафиолетовыми лучами; замораживание личинок при -18°C; размораживание личинок путем постепенного повышения температуры до комнатной; гомогенизацию биомассы в гомогенизаторе с ножами из нержавеющей стали, при скорости их вращения 5000 об/мин до получения частиц размером 9-12 мкм; экстракцию водорастворимых компонентов из энтомологической биомассы дистиллированной водой; отделение экстракта путем вакуумной фильтрации; концентрирование экстракта путем выпаривания в вакууме до объема 250 мл; экстракцию 70%-ным этиловым спиртом спирторастворимых компонентов; отделение экстракта путем вакуумной фильтрации, концентрирование экстракта путем выпаривания в вакууме при 40°C до остаточного объема 100 мл; объединение двух экстрактов; лиофилизацию всего экстракта; кондиционирование общего экстракта в виде энтомологического активного комплекса в вазелиновом масле следующего состава: общий лиофилизированный энтомологический экстракт - 45-80%; вазелиновое масло - 55-20%. Энтомологическому активному комплексу придают форму фармацевтического продукта - суппозитории, которые содержат 250 мг энтомологического активного комплекса и 1750 мг липидов [1].

Недостаток этого активного комплекса и технологии его получения заключается в том, что технологический процесс включает несколько критических моментов, которые могут поставить под угрозу качество активного комплекса. Это этап концентрирования путем выпариванием в вакууме водного и спиртового экстракта. В обоих случаях происходит существенный нагрев, который приводит к повреждению компонентов энтомологических экстрактов, чувствительных к повышению температуры.

Известен также противовоспалительный и антиоксидантный энтомологический препарат для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы и способ его приготовления [2]. Согласно описанию, противовоспалительный и антиоксидантный энтомологический препарат, полученный из личинок насекомых *Lepidoptera*, род *Lymantria* путем измельчения их в физиологическом растворе до образования однородной массы, фильтрации и удаления воды путем лиофилизации, содержит следующие компоненты: белки - 265,0-292,0 мг/г; липиды - 140,0 мг/г, холестерин - 0,1 мг/г; триглицериды - 90,0 мг/г, амилаза - 5,1 МЕд/г, липаза - 100,0 МЕд/г, антиоксиданты - 16,86 мг/г, незаменимые и полузаменимые аминокислоты - 379,7 мг/г. Антиоксидантное действие препарата проявляется в ингибировании перекисного окисления липидов и определяется водорастворимыми антиоксидантными соединениями [2].

Недостатком этого способа является то, что процедура культивирования насекомых для получения биомассы личинок не указана, активное вещество экстрагируется водой, поэтому препарат содержит только водорастворимые антиоксидантные компоненты.

Также известен способ получения энтомологического препарата из биомассы личинок первого возраста *Lymantria dispar*, путем водно-спиртовой экстракции. Личинки выращивают в лабораторных условиях на среде, состоящей из пшеничной муки, кукурузной крупы, сухой растительной массы, сухого молока, сухих дрожжей, глицерина и меда. Собранный биомасса личинок первого возраста *Lymantria dispar* промывается четыре раза 4-мя объемами дистиллированной воды. После этого биомассу диспергируют в течение 15 мин в растворе NaCl, 0,9%. Личинки замораживают. Замороженную биомассу размораживают, постепенно доводя ее до комнатной температуры. Используя ножевую мельницу из нержавеющей стали, биомассу перемешивают со скоростью 5000 об/мин и измельчают до получения частиц размером 9-12 мкм. Полученную массу подвергают экстракции биологически активных веществ 20%-ным гидроэтанольным раствором. Экстракция занимает 60 мин в условиях постоянной температуры (18-20°C) при постоянном встряхивании на орбитальном шейкере со скоростью вращения 280 об/мин (альтернативно 240-320 об/мин). Экстракт отделяют от биомассы путем вакуумной фильтрации, после чего следует лиофилизация экстракта [3]. Фармацевтический продукт получают в виде ректальных суппозиториях, содержащих 60% лиофилизированного экстракта.

Недостаток данного способа заключается в том, что он позволяет получить препарат, который состоит только из тех компонентов биомассы, которые можно экстрагировать 20%-ным водно-спиртовым раствором, и, следовательно, в нем отсутствует большинство жирорастворимых компонентов.

Другой недостаток данного способа получения активного комплекса заключается в том, что в качестве сырья для экстракции используется биомасса личинок первого возраста, которые характеризуются

небольшими размерами и массой, что предполагает увеличение себестоимости конечной технологии; проводится однократная экстракция гидроэтанолом продолжительностью 60 мин, в результате чего остаются неиспользованными некоторые активные компоненты биомассы.

Наиболее близким к заявленному объекту является способ получения энтомологического препарата из куколок и личинок последнего возраста (5-го или 6-го в зависимости от пола) и яиц *Lymantria dispar*, который входит в состав фармацевтической композиции в виде ректальных и вагинальных суппозиториях для лечения геморроя, аденомы предстательной железы, миомы матки [4]. Согласно указанному источнику, изготовление фармацевтической композиции включает следующие рабочие этапы: сбор куколок и личинок последнего возраста *Lamyantia dispar* со стволов пораженных деревьев дуба и тополя начиная с июня и яиц - в августе-сентябре или выращивание личинок и куколок в лабораторных условиях; промывание биологического материала и его ресуспендирование в физиологическом растворе; фильтрация и высушивание биологического материала; при необходимости - заморозка материала в целях хранения до момента дальнейшего использования; измельчение материала до получения частиц размером 9-12 мкм; фильтрация через фильтр Bucket, имеющий 200 отверстий на 1 см<sup>2</sup>; вакуумное распыление полученного экстракта, при температуре 130-140°C на входе и 85-90°C на выходе или лиофилизация в течение 24-30 ч - активная субстанция для производства лекарственной формы; приготовление фармацевтической композиции, состоящей из 1% активной субстанции в форме экстракта *Lymantria dispar*, 82% масла какао, 10% дистиллированной воды, 2,68% геликса, 2% лаурата, 1,3% 2-бromo-нитропропана, 1% полиглицерил-4-цетилизостеарата ПЭГ/ППГ диметикана 10/1 и 0,02% диала; кондиционирование этой формулы путем плавления и гомогенизации полученной смеси при температуре 60°C и заливки в формы для ректальных или вагинальных суппозиториях; упаковка и последующее хранение.

Недостатком этого способа является то, что в качестве биологического сырья используется три стадии развития насекомого - яйца, личинки последнего возраста и куколки. Биохимический состав личинок, куколок и яиц существенно различается. Биологическая активность этих видов биомассы также существенно отличается. Например, антирадикальная активность экстракта личинок в 5-7 раз выше по сравнению с активностью яиц и куколок [3].

Также было показано, что с возрастом биологическая активность личинок уменьшается, например, антирадикальная активность личинок последнего возраста по меньшей мере на 30% ниже по сравнению с активностью личинок первого возраста. Таким образом, еще одним недостатком самого близкого решения является использование личинок последнего возраста, характеризующихся самой низкой антиоксидантной активностью [3].

В то же время источник, выбранный в качестве наиболее близкого решения, не указывает пропорции для получения смеси личинок и куколок. Исходя из их различной активности, в случае применения разных пропорций личинок и куколок будут получены продукты с различной биологической активностью. Также выбранный источник не включает описание процесса выращивания личинок и куколок в лабораторных условиях, что может быть фактором, влияющим на изменение количества и биологических свойств полученного биологического материала. Вышеуказанное делает невозможным контроль состава действующего вещества.

Задача, решаемая настоящим изобретением, состоит в разработке способа получения нового энтомологического активного комплекса, нового, который обеспечивает качество и эффективность продукта, благодаря последовательности всех технологических этапов: выращивание насекомых, получение активного комплекса, включающего обоснованное количество активного вещества, обладающего противовоспалительным действием, эффективного для лечения заболеваний предстательной железы.

Сущность изобретения состоит в том, что предлагается способ получения активного комплекса из личинок *Lymantria dispar*, 3-го, 4-го возраста, который включает:

выращивание *Lymantria dispar* в искусственных условиях на стандартной среде следующего состава (на 1 кг среды):

Пшеничная мука	80-95 г
Кукурузная мука	82-87 г
Сухая растительная масса	110-120 г
Сухое обезжиренное молоко	2,5-3,5 г
Пчелиный мед	17-19 г
Глицерин	10-12 г
Пинобанксин	0,01-0,02 г
Пиноцембрин	0,01-0,02 г
Очищенная вода	696,5 - 663,5 мл

замораживание личинок при  $-18^{\circ}\text{C}$ ;  
 промывание личинок;  
 первичное измельчение личинок - получение активного комплекса;  
 лиофилизация активного комплекса;  
 измельчение активного комплекса при крайне низкой температуре ( $-55^{\circ}\text{C}$ );  
 гомогенизация активного комплекса (соединение фракций);  
 упаковка активного комплекса;

хранение активного комплекса в условиях морозильной камеры ( $-18^{\circ}\text{C}$ ).

Технический результат изобретения по сравнению с самым близким решением состоит в том, что способ получения активного комплекса позволяет использовать общий биохимический состав личинок лимантрии 3-го, 4-го возраста, а процесс измельчения биомассы личинок после лиофилизации проводится при крайне низкой температуре ( $-55^{\circ}\text{C}$ ), что обеспечивает сохранение биохимического состава сырья и получение продукта с очень высокой степенью однородности.

Технический результат изобретения достигается благодаря использованию полного комплекса биологически активных веществ биомассы личинок лимантрии 3-го, 4-го возраста и исключению этапов, которые могут привести к разрушению термочувствительных компонентов активного комплекса.

Вариант осуществления изобретения.

Выращивание насекомых вида *Lymantria dispar* включает следующие этапы.

1. Создание условий для прохождения жизненного цикла насекомых в искусственных условиях. Насекомые выращивают в помещениях площадью 15-20 м<sup>2</sup>. Стены окрашены специальной смолой, которая обеспечивает возможность дезинфекции дезинфицирующими растворами. По периметру комнаты стоят полки с темными ящиками Rubbermaid. Температура поддерживается на уровне  $27^{\circ}\text{C}$ , а влажность составляет 75%. Также обеспечивается фотопериодизм.

2. Выращивание насекомых. 300-500 взрослых особей помещают в ящик Rubbermaid и кормят исключительно пшеничными отрубями высокого качества. С началом вылупления личинки первого возраста собирают и помещают в ящики Rubbermaid с питательной средой, которая имеет следующий состав:

Пшеничная мука	91,45 г
Кукурузная мука	85,55 г
Сухая растительная масса	117,99 г
Сухое обезжиренное молоко	2,95 г
Пчелиный мед	17,70 г
Глицерин	11,80 г
Пинобанксин	0,015 г
Пиноцембрин	0,015 г
Очищенная вода	627,57 мл

Личинки выращивают в течение 21 дня с момента вылупления, с последовательными переносами на свежую питательную среду.

3. Получение активного энтомологического комплекса из личинок *Lymantria dispar* 3-го, 4-го возраста. Личинки собирают с помощью пинцета и переносят в специальные контейнеры для замораживания. Личинки замораживают при  $-18^{\circ}\text{C}$ . В таком виде сырье можно хранить в течение 24 месяцев и использовать по мере необходимости.

Перед использованием личинки дважды промывают четырьмя объемами 0,9% физиологического раствора и еще два раза 4 объемами очищенной воды. Эта процедура позволяет удалить волоски внешних оболочек личинок.

В дальнейшем, биомасса подвергается измельчению в измельчителе, оснащенный ножами из нержавеющей стали, до получения частиц, размеры которых не превышают 2 мм. Полученный активный комплекс подвергают процессу лиофилизации.

Последний этап заключается в измельчении активного комплекса в криогенной мельнице при чрезвычайно низкой температуре, что обеспечивает получение дисперсных частиц размером до 200 мкм.

Активный комплекс, полученный описанным выше способом, герметично упаковывают в алюминиевые пакеты и хранят до использования (до 24 месяцев) в условиях морозильной камеры ( $t=-18\pm 3^{\circ}\text{C}$ ).

Результаты, полученные в рамках заявленного способа, сравнивались с результатами, полученными в соответствии с наиболее близким решением. В последнем случае (самое близкое решение) личинки были выращены в лабораторных условиях на заявленной среде (п.2 примера), личинки последнего воз-

раста (5-го или 6-го) были собраны на 35-й день после того, как личинки вылупились из яйца.

Количество биомассы и противовоспалительная активность энтомологического комплекса согласно заявленному способу и в соответствии с ближайшим решением

Параметр	По ближайшему решению	По заявленному способу
Количество биомассы личинок, мг, на 1г используемой среды	51,07±0,74	53,96±1,87*
Снижение уровня высвобожденного IL <sub>8</sub> (% снижения по отношению к контролю)	27,75±3,15	42,02±2,63**

\* P=0,047 (<0,05).

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

Из таблицы видно, что предлагаемый способ более эффективен с точки зрения накопления биомассы на грамм используемой питательной среды. Таким образом, на 1 г среды в заявленном способе было получено 53,96±1,87 мг личинок, а в ближайшем решении - 51,07±0,74.

Количество высвобожденного IL<sub>8</sub> было снижено активным комплексом, полученным в соответствии с заявленным способом, на 42,02±2,63%, а в случае активного комплекса, полученного в соответствии с ближайшим решением, - только на 27,75±3,15% по сравнению с контрольным уровнем.

#### Источники

1. Патент MD 4296. Препарат из личинок *Tenebrio molitor* с антиоксидантным действием, способ его получения и фармацевтический препарат на его основе/ Чухрий В. (Brevet de invenție MD 4296. Preparat din larve de *Tenebrio molitor* cu acțiune antioxidantă, procedeu de obținere a acestuia și produs farmaceutic pe baza lui /Ciuhrii V).
2. Патент MD 2788. Энтомологический противовоспалительный и антиоксидантный препарат / Гикавый В., Чухрий М., Бачинский Н., Чухрий В., Гикавый В. (Brevet de invenție MD 2788. Preparat entomologic antiinflamator și antioxidant /Ghicavâi V., Ciuhrii M., Bacinschi N., Ciuhrii V., Chicavâi V. )
3. Чухрий В. Биотехнология получения лекарственной формы для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Кишинев 2019, 129 стр. (Ciuhrii V. Biotehnologia obținerii formei medicamentoase pentru tratarea hiperplaziei benigne de prostată. Teză de doctor în biologie. Chișinău 2010, 129 p.)
4. Патент 122332, RO. Фармацевтический препарат в виде ректальных и вагинальных суппозиторий для лечения геморроидов, аденомы предстательной железы, маточной фибромы и способ его получения/ Чухрий М. (Brevet de invenție 122332, RO. Compoziție farmaceutică sub formă de supozitoare sau ovule, pentru tratarea hemoroizilor, adenomului de prostată, fibromul uterin, și procedeu de preparare /Ciuhrii M.)

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения активного комплекса из личинок *Lymantria dispar* 3-го, 4-го возраста, который включает:

выращивание *Lymantria dispar* в искусственных условиях;

замораживание личинок при  $-18^{\circ}\text{C}$ ;

промывание личинок перед использованием;

первичное измельчение личинок до частиц, размер которых не превышает 2 мм, с получением активного комплекса;

лиофилизация активного комплекса и его измельчение при температуре  $-55^{\circ}\text{C}$  с получением гомогенного активного комплекса с размером дисперсных частиц до 200 мкм, при этом выращивают *Lymantria dispar* на питательной среде следующего состава, на 1 кг среды:

пшеничная мука: 80-95 г;

кукурузная мука: 82-87 г;

сухая растительная масса: 110-120 г;

сухое обезжиренное молоко: 2,5-3,5 г;

пчелиный мед: 17-19 г;

глицерин: 10-12 г;

пинобанксин: 0,01-0,02 г;

пиноцембрин: 0,01-0,02 г;

очищенная вода: 663,5-696,5 мл.

