



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 610**

51 Int. Cl.:

A61K 35/56 (2006.01) **A61P 1/06** (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) **A61P 9/12** (2006.01)
A61P 13/02 (2006.01) **A61P 13/10** (2006.01)
A61P 15/04 (2006.01) **A61P 17/14** (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08005560 .1**

96 Fecha de presentación : **26.03.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2105139**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.09.2009**

54

Título: **Método de producción de un polvo de lombriz seco.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2010

73

Titular/es: **WELL STONE Co.**
6742-1 Tanocho-ko
Miyazaki-shi, Miyazaki, JP

72

Inventor/es: **Ishii, Yoichi;**
Sumi, Hiroyuki y
Yoshida, Etsuo

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 347 610 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE UN POLVO DE LOMBRIZ SECO

Descripción

La presente invención se refiere a un método de producción de un polvo
5 de lombriz seco, eficaz en el tratamiento de diversas enfermedades, retirando la suciedad en los tractos digestivos y sobre la piel de las lombrices sin deteriorar la acción farmacológica inherente a las lombrices.

Las lombrices se han usado desde tiempo atrás en los países orientales
10 como fármacos para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades y se han descubierto aplicaciones tales como la contracción de cálculos intraquísticos y como agente de estimulación de la liberación, agente anti-coloplania, parturifaciente, tónico, tónico de crecimiento capilar, reconstituyente, antifebril, agente de tratamiento de espasmos, acelerador del flujo sanguíneo, agente de tratamiento de hemiplejía, analgésico indirecto,
15 agente de mejora de la micción, agente anti-bronquial para asma, agente anti-hipertensión y otros.

Es necesario retirar el producto digerido que queda en los tractos
digestivos de una lombriz, la suciedad sobre la piel y otros para la producción
de una medicina para administración oral usando el cuerpo vivo de una lombriz
20 como materia prima y se han propuesto diversos métodos para este propósito.

Hasta ahora, los ejemplos del mismo propuestos incluyen métodos de
producción de un polvo de lombriz seco, útil como un agente anti-diabetes, un
agente anti-hiperlipidemia o un agente de ajuste de la presión sanguínea,
sumergiendo los cuerpos vivos de las lombrices en una solución acuosa de una
25 sal alcalina, tal como sal sódica o sal potásica, permitiéndolas excretar el residuo en los tractos digestivos, molienda en húmedo de las lombrices y liofilización al vacío de la suspensión obtenida de esta manera (documentos JP1-47718A, JP1-47719A, JP1-47720A y JP1-268639A), y un método de
producción de una medicina para pacientes con trombosis, sumergiendo los
30 cuerpos vivos de las lombrices en una solución ácida acuosa mantenida de 6 a 26°C durante de 0,1 a 5 horas, permitiéndolas excretar el residuo en los tractos digestivos, moliendo las lombrices, desgasificando el homogeneizado y secando al vacío el homogeneizado, mientras que la temperatura se aumenta gradualmente (documento JP3-72427A).

35 Sin embargo, la inmersión de los cuerpos vivos de las lombrices en una

solución de sal alcalina o ácida acuosa durante un periodo prolongado de tiempo conduce al debilitamiento de las lombrices, consecuentemente a la desnaturalización de las proteínas contenidas en el cuerpo, el deterioro en las actividades enzimáticas y también en la acción farmacológica del polvo de lombriz obtenido.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de producción de un polvo de lombriz seco en el estado que tenga una acción farmacológica favorable, permitiendo que los cuerpos vivos de las lombrices excreten eficazmente el producto digerido que queda en los tractos digestivos y la suciedad sobre la piel sin, el debilitamiento de las lombrices.

Después de estudios intensivos para hacer que los cuerpos vivos de lombrices excreten eficazmente el producto digerido que queda en los tractos digestivos, sin el debilitamiento de las lombrices, los inventores han descubierto que, si las lombrices vivas se colocan a la luz, después se ponen en contacto con un ácido orgánico, un medio desfavorable para las lombrices, antes del procesamiento y se desarrollan en la condición de un tiempo particular, las lombrices excretan el producto digerido en los tractos digestivos y se cubren ellas mismas con la excreción para hacer frente al medio, y por lo tanto, que fuera posible obtener los cuerpos vivos purificados de las lombrices retirando la suciedad o la excreción sobre la piel y realizar la presente invención, basada en el descubrimiento.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método de producción de un polvo de lombriz seco, que comprende las etapas de: mantener las lombrices vivas a la luz durante de 10 a 50 horas, retirar la suciedad formada sobre la piel de las mismas, añadir un ácido orgánico a las lombrices vivas, diluir el ácido rápidamente con la adición de agua, ajustar el pH de la solución ácida acuosa de 2 a 5, mantener la mezcla de lombrices durante de 3 a 180 minutos en la condición de pH, lavar las lombrices con agua, moler las lombrices hasta obtener un homogeneizado, congelar el homogeneizado de -18°C a -35°C, mantener el homogeneizado congelado durante de 20 a 240 horas, liofilizar y desgasificar el homogeneizado congelado al vacío, simultáneamente.

En lo sucesivo en este documento, el método de acuerdo con la presente invención se describirá en detalle.

En el método de acuerdo con la presente invención, se usa una lombriz

viva como la materia prima y la lombriz viva usada se selecciona arbitrariamente entre los organismos que pertenecen a Annelida Oligochaeta, generalmente denominadas lombrices, tales como *Lumbricus rubellus*, *Lumbricus terrestris*, *Eisenia foetida*, *Allolobophora caliginosa*, *Dendrobaena octaedra*, *Allolobophora japonica* Michaelsen, *Drawida hattamimizu* Hatai, 5 *Pheretima divergens* Michaelsen, *Pheretima communissima*, *Pheretima agrestis*, *Pheretima sieboldi* Horst, *Pheretima hilgendorfi*, *Pontodrilus matsushimensis* Izuka, *Tubifex hattai* Nomura, *Limnodrilus gotoi* Hatai o *L. Socialis* Stephenson y similares.

10 En el método de acuerdo con la presente invención, en primer lugar, las lombrices vivas se colocan a la luz durante un periodo particular. Específicamente, las lombrices vivas extraídas de un lecho de lombriz se colocan en una caja plana con forma de bandeja y se mantienen ahí durante de 10 a 50 horas a la luz solar o con iluminación por la noche. Después, la 15 capacidad interna de la caja plana es una cantidad correspondiente a un espesor de aproximadamente 30 a 60 mm, preferiblemente de 40 a 50 mm. Cuando se colocan a la luz, las lombrices, que son nocturnas, tratan de protegerse ellas mismas, cubriéndose la piel con suciedad para bloquear el paso de la luz o evitar la vaporización de agua, y la retirada repetida de la 20 suciedad varias veces, mediante un medio adecuado, finalmente impulsa a las lombrices a liberar la materia sólida y el fluido corporal fuera de los tractos intestinales y a cubrir la piel con los mismos. Después, en la caja plana, las múltiples lombrices vivas apiladas unas sobre otras tratan de arrastrarse más profundamente bajo otras lombrices, buscando un sitio más oscuro, mientras 25 están en contacto unas con otras, lo que a su vez conduce a la separación de la suciedad y de la excreción sobre la piel por fricción. Si las lombrices vivas se encierran, por ejemplo, con una tela sin tejer, la suciedad y la excreción separadas por fricción pueden adsorberse y retirarse fácilmente.

En el método de acuerdo con la presente invención, las lombrices vivas, 30 de las que se han retirado la suciedad y la excreción, después se lavan con agua y se llevan a un medio de vida desahogado para las lombrices vivas mediante la adición de un ácido orgánico. La adición del ácido orgánico puede realizarse dispersando un ácido orgánico en polvo tal cual o como una solución acuosa de ácido orgánico concentrada sobre las lombrices vivas.

35 Los ejemplos de ácido orgánico usado incluyen, entonces, ácido acético,

ácido málico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico y similares. Estos ácidos pueden usarse solos o como una mezcla de dos o más ácidos. El ácido orgánico particularmente favorable es el ácido cítrico.

5 En dicho caso, el contacto prolongado entre las lombrices vivas y un ácido orgánico en polvo o una solución acuosa de ácido orgánico concentrada, conduce a la muerte o debilitamiento de las lombrices y, por lo tanto, no hay excreción del producto digerido en los tractos digestivos, y por lo tanto, las lombrices vivas se lavan preferiblemente con agua tan pronto como sea posible después del contacto con el ácido orgánico, normalmente a los 30 segundos o 10 menos, preferiblemente 20 segundos o menos, hasta que el pH de las lombrices se encuentra en el intervalo de 2 a 5. La dilución con agua debe realizarse lo antes posible. Debe prestarse suficiente atención al hecho de que el retraso puede conducir a la muerte de las lombrices.

15 Por lo tanto, en el método de acuerdo con la presente invención, es posible asegurar la acción esterilizante una vez que se esterilizan las lombrices vivas usando la acción esterilizante de un ácido orgánico y después, esterilizarlas adicionalmente por liofilización al vacío.

20 En el método de acuerdo con la presente invención, debido a que las lombrices se colocan a la luz, es decir, un medio de vida no favorable para la actividad de las lombrices vivas nocturnas y, adicionalmente, se llevan a un medio de vida extremadamente desfavorable para las lombrices vivas, las lombrices vivas liberan materias sólidas y líquidas de la suciedad y la excreción para protegerse a sí mismas y para la mejora del medio de vida para purificarse a sí mismas automáticamente.

25 El uso de un ácido orgánico, que tiene una acción esterilizante, en el método de acuerdo con la presente invención, conduce a la excreción de los productos digeridos que quedan en los órganos digestivos, como se ha descrito anteriormente, y a la esterilización de las bacterias no deseadas, que no se retiran simplemente por lavado con agua.

30 La presencia de agua es indispensable para la función autoprotectora, pero aproximadamente el 65% de la estructura de las lombrices vivas es agua y, por lo tanto, existe alguna tolerancia periódica para la función autoprotectora. Sin embargo, debido a que la muerte de las lombrices vivas no se desea, debe prestarse atención al control del periodo durante el cual las lombrices vivas se 35 colocan en un medio de vida desfavorable. El periodo puede variar de acuerdo

con la condición usada, pero normalmente está en el intervalo de 3 a 180 minutos.

Como se ha descrito anteriormente, cuando las lombrices vivas se llevan a un medio de vida desfavorable mediante la adición de un ácido orgánico, el producto digerido que queda en los tractos digestivos, amoniaco, una causa del olor pestilente, y un fluido corporal que contiene arsénico que es tóxico para el cuerpo, se excretan, y la mayoría del amoniaco se retira mediante el ácido.

Convencionalmente, las lombrices vivas limpiadas se pulverizaron y se congelaron tal cual, dejando el amoniaco sin retirar, y el amoniaco se retiró en la siguiente etapa de liofilización al vacío, pero la retirada del amoniaco fue insuficiente y fluctuante, haciendo el control de la calidad del producto más difícil. Además, debido a que el amoniaco se retira en la etapa de liofilización al vacío, los aparatos se dañan más fácilmente en esta etapa, requiriendo un mantenimiento frecuente y, por lo tanto, aumentando el coste de funcionamiento y haciendo al sistema menos atractivo económicamente. Además, el amoniaco tenía un problema en la dificultad del control de la calidad del producto, porque el contenido de amoniaco de las lombrices vivas varía estacionalmente y el amoniaco puede causar gastritis cuando queda algo del mismo, incluso en cantidades pequeñas. En el método de acuerdo con la presente invención, la mayor parte del amoniaco se retira antes de la liofilización al vacío y el amoniaco que queda en una cantidad pequeña se retira también completamente mediante liofilización al vacío, dando ventajosamente un producto de calidad uniforme.

Después, los cuerpos vivos de las lombrices, después de una retirada prácticamente completa de la suciedad, se lavan con agua purificada y después se muelen hasta obtener el homogeneizado líquido o similar a una pasta. La molienda se realiza, por ejemplo, en un homogeneizador, mezclador, homomezclador, máquina maceradora o un molino de celdas a alta presión, normalmente a una temperatura de 1 a 25°C o, preferiblemente, de 2 a 15°C. Después, el homogeneizado se coloca y se seca en una bandeja de acero inoxidable. Ya que las enzimas contenidas en el cuerpo vivo de la lombriz están inactivas cuando las células están aún vivas, pero reaccionan instantáneamente con las células muertas para generar calor y un fuerte olor pestilente por putrefacción, para prevenirlo, se requiere usar un proceso de liofilización al vacío en el que el homogeneizado puede enfriarse rápidamente a

una temperatura de -18°C a -35°C y las actividades enzimáticas están limitadas.

Para la pulverización sin deteriorar la acción farmacológica inherente a la lombriz, el homogeneizado debe congelarse rápidamente, pero, por otra parte, la congelación en un periodo de tiempo excesivamente corto o una congelación extremadamente rápida también es desfavorable, porque las impurezas presentes junto con las proteínas, que son los componentes principales de la pasta de lombriz, pueden formar regiones descongeladas moteadas y puede que no se separen. Por esta razón, la congelación se realiza favorablemente a una baja temperatura de -18°C a -35°C durante un periodo de 20 a 240 horas, preferiblemente de 50 a 170 horas.

Durante la liofilización al vacío, es importante seleccionar una condición que permita la retirada favorable del agua así como de las impurezas. Para este propósito, es ventajoso realizar la liofilización al vacío aumentando la temperatura gradualmente en el intervalo de -60°C a $+90^{\circ}\text{C}$ con una presión de 50 Pa o menos, tardando de 10 a 60 horas.

Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, el homogeneizado se congela a una temperatura de -18°C a -35°C durante un periodo de 20 a 240 horas y se realiza la liofilización al vacío durante de 10 a 60 horas cambiando la temperatura y la presión gradualmente en el intervalo de -60°C a $+90^{\circ}\text{C}$ y de 4 a 80 Pa, respectivamente, para obtener un polvo de lombriz seco de color amarillo pálido en el estado estéril. Después, la desaireación se realiza mediante aspiración al vacío.

En el método de acuerdo con la presente invención, es posible acortar el periodo de liofilización, que convencionalmente emplea 100 horas o más, seleccionándose significativamente la condición de secado como se ha descrito anteriormente.

Por lo tanto, el polvo de lombriz seco obtenido contiene arginina en una cantidad de 70 a 120 mg, lisina de 110 a 150 mg, histidina de 35 a 60 mg, fenilalanina de 55 a 80 mg, tirosina de 50 a 75 mg, leucina de 100 a 150 mg, isoleucina de 60 a 90 mg, metionina de 25 a 40 mg, valina de 70 a 105 mg, alanina de 85 a 135 mg, glicina de 75 a 105 mg, prolina de 60 a 85 mg, ácido glutámico de 210 a 300 mg, serina de 80 a 110 mg, treonina de 75 a 110 mg, ácido aspártico de 150 a 220 mg, triptófano de 15 a 30 mg y cisteína de 20 a 35 mg, en 100 g del polvo, aunque la composición puede variar ligeramente de

acuerdo con el tipo de lombriz usada y el sitio y periodo de muestreo.

Aplicabilidad Industrial

De acuerdo con el método de la presente invención, es posible retirar la suciedad o la excreción de las lombrices vivas usando su comportamiento natural, sin ninguna acción realizada por el hombre y también obtener polvo de lombriz seco favorable, que no contenga microbios o un olor pestilente, tal como de amoniaco, y que contenga sólo una cantidad limitada de arsénico. Además, el polvo de lombriz seco obtenido por el método de acuerdo con la presente invención, contiene enzimas a actividades de aproximadamente 1,2 a 1,5 veces mayores que las del polvo obtenido por métodos convencionales y muestra mayor permeabilidad dentro de las células.

De forma similar al polvo de lombriz seco preparado por métodos convencionales, el polvo de lombriz seco preparado por el método de acuerdo con la presente invención es útil como un agente de ajuste de la presión sanguínea, un agente hiperlipidemia, un agente anti-diabetes, un agente trombolítico o similares. Los ingredientes activos separados del polvo de lombriz seco pueden usarse en aplicaciones tales como blanqueante, agente anti-arrugas, agente anti-eczema y agente para el tratamiento de pies de atleta.

En lo sucesivo en este documento se describirán los mejores modos para realizar la presente invención.

Ejemplo 1

30 kg de lombrices vivas de *Lumbricus rubellus* se colocaron y se extendieron a un espesor de aproximadamente 5 cm en una caja plana y se expusieron a la irradiación de una lámpara fluorescente durante 24 horas; las lombrices vivas se cubrieron con una tela sin tejer, permitiendo la adsorción de la suciedad y la excreción acumulada sobre la piel con la tela sin tejer y, después, se lavaron con agua. Posteriormente, se dispersaron 250 g de ácido cítrico en polvo, uniformemente, sobre las mismas y después de 15 segundos, la mezcla de lombrices se diluyó con 30 litros de agua purificada. El pH inmediatamente después de la adición de agua era de 2,25, mientras que el pH al final de la dilución era de 2,74.

Después, las lombrices sumergidas en el ácido cítrico diluido se dejaron en reposo a 20°C durante 60 minutos, cuando las lombrices, para modificar el medio de vida desapacible para ellas mismas, excretaron el fluido corporal y el producto digerido en los tractos digestivos fuera del cuerpo, así como el

amoníaco, una causa del olor pestilente, y el arsénico, un compuesto peligroso para el cuerpo.

5 Convencionalmente, se requirió sumergir las lombrices en una solución acuosa de ácido cítrico a un pH de 3 a 6 durante al menos una hora, dando como resultado el debilitamiento de las lombrices y un aumento en la pérdida de las mismas, pero el breve contacto con ácido cítrico de alta concentración dio como resultado la eliminación casi completa del amoníaco sin el debilitamiento de las lombrices.

10 Después, las lombrices vivas se separaron de la solución acuosa de citrato ensuciada, se lavaron con agua y se molieron hasta obtener una pasta de lombriz a 10°C usando un homogeneizador. Después, la pasta de lombriz se colocó en una bandeja de acero inoxidable, se enfrió instantáneamente a -30°C y se mantuvo a la misma temperatura, permitiendo la congelación gradual durante un periodo de 50 horas.

15 La liofilización al vacío se realizó de tal forma que la pasta de lombriz así congelada se mantuvo a una temperatura fija de -35°C a una presión que se redujo gradualmente por debajo de 50 Pa, tardando 3 horas, y la pasta de lombriz congelada se calentó gradualmente a una temperatura de 20°C a una presión de 40 Pa durante 12 horas, a una temperatura de 40°C a una presión de 35 Pa durante 25 horas y finalmente a una temperatura de 80°C a una presión de 20 Pa durante 5 horas. El procesamiento dio como resultado un polvo de lombriz seco de color amarillo pálido que tiene un contenido de agua del 80% en masa. Los contenidos de aminoácidos del polvo seco así obtenido se muestran en la Tabla 1.

25 Ejemplo 2

30 Un polvo de lombriz seco, de color amarillo pálido, se obtuvo de una forma similar a la del Ejemplo 1, excepto que los 30 kg de las lombrices de *Lumbricus rubellus* en el Ejemplo 1 se sustituyeron por 30 kg de las de *Lumbricus terrestris*. Los contenidos de aminoácidos de los polvos secos así obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS (unidad: mg/100 g)		
Ejemplo	Ejemplo 1	Ejemplo 2
Arginina	114	72,5
Lisina	148	128
Histidina	55	40
Fenilalanina	77	62,5
Tirosina	73	57
Leucina	145	119,5
Isoleucina	87	74
Metionina	35	33
Valina	104	89
Alanina	131	98
Glicina	103	82,5
Prolina	83	65,5
Ácido glutámico	296	245,5
Serina	105	87
Treonina	104	81,5
Ácido aspártico	212	167
Triptófano	28	20
Cisteína	32	21,5

Ejemplo 3

Un polvo de lombriz seco, de color amarillo oscuro, con una composición similar a la del polvo obtenido en el Ejemplo 1, se obtuvo de una forma similar a la del Ejemplo 1, excepto que se sustituyeron los 250 g de ácido cítrico por 160 g de ácido succínico.

Ejemplo de Referencia

El polvo de lombriz seco obtenido en el Ejemplo 1 se procesó mediante el método descrito en el Ejemplo del documento JP2716472B, para dar una proteasa purificada.

A 0,5 μ g de la proteasa purificada, se le añadió plasminógeno humano purificado (fabricado por KABIAB, 0,05 CU) para la reacción y se determinó la actividad de la plasmina después de la reacción. Posteriormente, la actividad

hidrolítica de la plasmina, como se determina a partir de la diferencia entre cuando la proteasa purificada se añadió y no se añadió, era de 0,145 nmol/minuto. La actividad hidrolítica de la plasmina, como se determina por comparación de forma similar usando la proteasa purificada preparada a partir del polvo de lombriz seco de acuerdo con el método convencional descrito en la publicación de patente descrita anteriormente, era de 0,112 nmol/minuto, indicando que la actividad enzimática derivada del polvo de lombriz seco preparado mediante el método de acuerdo con la presente invención era aproximadamente 1,3 veces mayor.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un polvo de lombriz seco que comprende las etapas de: mantener las lombrices vivas a la luz durante de 10 a 50 horas,
5 retirar la suciedad formada sobre la piel de las mismas, añadir un ácido orgánico a las lombrices vivas, diluir el ácido rápidamente con la adición de agua, ajustar el pH de la solución ácida acuosa de 2 a 5, mantener la mezcla de lombrices durante de 3 a 80 minutos en la condición de pH, lavar las lombrices con agua, moler las lombrices hasta obtener un homogeneizado,
10 congelar el homogeneizado de -18°C a -35°C, mantener el homogeneizado congelado durante de 20 a 240 horas, liofilizar y desgasificar el homogeneizado congelado al vacío, simultáneamente.

2. El método de producción de un polvo de lombriz seco de acuerdo con la
15 reivindicación 1, en el que el ácido orgánico es un ácido orgánico seleccionado entre ácido acético, ácido málico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido malónico y ácido succínico.