

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11) 2 441 663⁽¹³⁾ C2

(51) МПК
A61K 36/02 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2008151175/15, 26.06.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.06.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
27.06.2006 US 60/816,593

(43) Дата публикации заявки: 27.06.2010 Бюл. № 18

(45) Опубликовано: 10.02.2012 Бюл. № 4

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 20050129709 A1, 16.06.2005. Pugh N. et al. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from Spirulina platensis, aphanizomenon flos-aquae and Chlorella pyrenoidosa. // Planta Med. 2001, 67(8):737-42. Torres A. et al. Porphyra-334, a potential natural source for UVA protective (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 23.12.2008

(86) Заявка РСТ:
EP 2007/005622 (26.06.2007)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/000430 (03.01.2008)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

СКОЛЬО Стефано (IT),
КАНЕСТРАРИ Франко (IT),
БЕНЕДЕТТИ Серена (IT),
БЕНЕДЕТТИ Янина (IT),
ДЕЛЬГАДО-ЭСТЕБАН Мария (ES)

(73) Патентообладатель(и):
НУТРАТЕК С.Р.Л. (IT)

R U 2 4 4 1 6 6 3 C 2

R U 2 4 4 1 6 6 3 C 2

(54) ПРЕПАРАТ APHANIZOMENON FLOS AQUAE, ЭКСТРАКТЫ И ОЧИЩЕННЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЭКСТРАКТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ, НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ И АФФЕКТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, в частности к экстракту для производства композиции для профилактики, борьбы или лечения неврологического заболевания, состояния, дисфункции или расстройства. Применение экстракта

микроводоросли Aphanizomenon Flos Aquae Aquae Ralfs ex Born. & Flah. Var. flos aquae (Кламатской водоросли AFA) для производства композиции для профилактики, борьбы или лечения неврологического заболевания, состояния, дисфункции или расстройства, выбранного из: болезни

R U 2 4 4 1 6 6 3 C 2

R U 2 4 4 1 6 6 3 C 2

Альцгеймера, болезни Паркинсона, рассеянного склероза, синдрома дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ), аутизма, депрессии, дефицита памяти и аффективных расстройств, где экстракт получают посредством определенных стадий.

(56) (продолжение):

sunscreens. // Photochem Photobiol. Sci. 2006, 5(4): 432-5. JP 58065216 A, 18.04.1983.

Вышеописанный экстракт эффективен для профилактики, борьбы или лечения неврологического заболевания, состояния, дисфункции или расстройства. З з.п. ф-лы, 24 ил., 3 табл.

R U 2 4 4 1 6 6 3 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 441 663⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A61K 36/02 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2008151175/15, 26.06.2007

(24) Effective date for property rights:
26.06.2007

Priority:

(30) Priority:
27.06.2006 US 60/816,593

(43) Application published: 27.06.2010 Bull. 18

(45) Date of publication: 10.02.2012 Bull. 4

(85) Commencement of national phase: 23.12.2008

(86) PCT application:
EP 2007/005622 (26.06.2007)

(87) PCT publication:
WO 2008/000430 (03.01.2008)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj

(72) Inventor(s):

SKOL'O Stefano (IT),
KANESTRARI Franko (IT),
BENEDETTI Serena (IT),
BENEDETTI Janina (IT),
DEL'GADO-EhSTEBAN Marija (ES)

(73) Proprietor(s):

NUTRATEK S.R.L. (IT)

R U 2 4 4 1 6 6 3 C 2

(54) MEDICINAL PRODUCT APHANZOMENON FLOS AQUAE, EXTRACTS AND PURIFIED
COMPONENTS OF EXTRACTIONS FOR TREATMENT OF NEUROLOGIC, NEURODEGENERATIVE
AND AFFECTIVE DISORDERS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention is referred to pharmaceutical industry, namely - to the extraction for production of composition for prevention, management or treatment of a neurologic disease, condition, dysfunction or disorder. Use of extraction of microalgae Aphanizomenon Flos Aquae Aquae Ralfs ex Born. & Flax. Var. flos algae (AFA Klamath algae) for production of composition for prevention, management or treatment of a neurologic disease,

condition, dysfunction or disorder chosen from: Alzheimer disease, Parkinson disease, multiple sclerosis, Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism, depression, memory deficiency and affective disorders where the extraction is produced using different stages.

EFFECT: prevention, management or treatment of a neurologic disease, condition, dysfunction or disorder.

3 cl, 24 dwg, 3 tbl

Настоящее изобретение относится к микроводоросли *Aphanizomenon Flos Aquae* *Aquaee Ralfs ex Born. & Flah. Var. flos aquae* (Кламатская водоросль AFA). Более конкретно, изобретение обеспечивает экстракты Кламатской водоросли AFA и очищенные компоненты указанных экстрактов, которые могут применяться для профилактики или лечения неврологических, нейродегенеративных и аффективных расстройств или заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Фенилэтиламин (ФЭА) представляет собой эндогенный амин, синтезируемый при декарбоксилировании фенилаланина в допаминергических нейронах нигростриарной системы, который может также функционировать как нейромодулятор катехоламин-опосредованной нейротрансмиссии в мозге (1). Наиболее важной функцией ФЭА является способствование нейротрансмиссии катехоламинов. Известно, что ФЭА стимулирует высвобождение ацетилхолина, а также допамина (2). Кроме того, ФЭА усиливает нейротрансмиссию норэпинефрина (НЭ) (6), а также нейротрансмиссию серотонина.

Недавно было продемонстрировано, что ФЭА может также функционировать как автономный нейромедиатор со своими специфичными нейронными рецепторами; и что ФЭА действует как истинный нейромодулятор со способностью подавлять нейротрансмиссию, если необходимо (8).

Это приводит к целому ряду эффектов: стимуляции внимания и памяти; улучшению настроения со значительной антидепрессивной активностью; стимуляции сочувствия и, таким образом, общительности, включая эмоциональное и половое поведение; подавлению чувства голода; снижению зависимости от сильнодействующих веществ и наркотической зависимости.

Связь между ФЭА и эмоциональным состоянием была подтверждена исследованиями, в соответствии с которыми значительно более низкие уровни чистого ФЭА или его метаболита ФУК (фенилуксусной кислоты) в плазме или моче были зарегистрированы у лиц с депрессивным состоянием (9).

Было отмечено, что лица, страдающие болезнью Паркинсона, имеют значительно более низкие уровни ФЭА при измерении непосредственно в плазме (12).

Прогрессирующее снижение нейротрансмиссии, особенно допаминергической, у указанных пациентов связано с прогрессирующей дегенерацией допаминергических нейронов черного вещества.

Указанное снижение уровней ФЭА происходит с параллельным повышением уровней МАО-В у лиц, страдающих болезнью Паркинсона, поэтому лекарственные средства, применяемые при лечении паркинсонизма, являются ингибиторами МАО-В, такими как селегилин (14). Кроме того, ФЭА при приеме может легко проходить через гематоэнцефалический барьер и стимулировать высвобождение допамина из нигростриарной ткани даже в низких дозах. Это является важным отличительным свойством, поскольку используемое в настоящее время лекарственное средство, селегилин, ингибируя МАО-В и обратный захват допамина, не оказывает никакого действия на его высвобождение из нигростриарной ткани и таким образом не способствует повышению выработки допамина, что является серьезным ограничением в такой патологии, как болезнь Паркинсона, при которой в значительной степени нарушается именно выработка допамина.

Болезнь Альцгеймера приводит к нарушению механизма выработки и обратного захвата допамина, а также к прогрессирующему разрушению нейронов стриарной области, которое со временем приводит к снижению числа допаминергических

нейронов и, следовательно, ухудшению передачи допамина (15).

Хотя каких-либо четких данных относительно того факта, что СДВГ (синдром дефицита внимания с гиперактивностью) является нейродегенеративной патологией, не существует, некоторые исследования проводились в попытке доказать, что разрушение нейронов является основной причиной СДВГ как у детей, так и у взрослых (19).

Наиболее важными являются свидетельства, согласно которым дети, пораженные СДВГ и пониженной обучаемостью, имеют значительно более низкие уровни ФЭА (21) и, как следствие, страдают снижением нейромодуляции внимания (допамин) и успокоения (серотонин). Именно поэтому препаратом выбора при СДВГ является метилфенидат, синтетическое производное ФЭА, который также стимулирует повышенную выработку ФЭА (22) и таким образом допамина и норэпинефрина, двух нейромедиаторов, непосредственно вовлеченных в этиологию СДВГ.

Хорошо известно применение амфетаминов для контроля чувства голода и, следовательно, веса. Их применение в данной области постоянно находилось под вопросом из-за побочных эффектов, которые, при наличии их переносимости, имеют тенденцию потенциально становиться крайне тяжелыми с течением времени. Это подтверждается тем фактом, что основные лекарственные средства, используемые в настоящее время для контроля чувства голода и веса, представляют собой амфетамин-подобные допаминергические антидепрессанты, такие как венлафаксин и бупропион. Указанные вещества, как и все амфетамины, являются синтетическими производными ФЭА. Последние действуют как мощные средства подавления аппетита, поскольку предотвращено их расщепление ферментами МАО-В.

Моноаминоксидаза (МАО) А и В катализируют расщепление нейроактивных и вазоактивных аминов в ЦНС и в периферических тканях. МАО-В, в частности, с учетом ее прямого и косвенного участия в допаминергической передаче вовлечена в неврологические расстройства, в которых важную роль играет допамин, например депрессивные и аффективные расстройства, болезни Паркинсона и Альцгеймера. По этой причине ингибиторы МАО-В используются при лечении таких неврологических расстройств (26).

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на выявлении в микроводоросли *Aphanizomenon Flos Aquae Aquaeralfs ex Born. & Flah. Var. flos aquae* (Кламатской водоросли AFA) веществ, которые в чистом виде или в комбинации оказывают благоприятное воздействие при различных неврологических заболеваниях, состояниях, дисфункциях или расстройствах, включая нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Альцгеймера и Паркинсона, рассеянный склероз, гиперактивность и синдром дефицита внимания (СДВГ), аутизм, депрессию, ухудшение памяти и аффективные расстройства. В частности, было установлено, что Кламатская микроводоросьль AFA, помимо фенилэтамина, который является нейромодулятором, обладающим допаминергической и норадренергической активностью, содержит особые вещества, которые, как совершенно неожиданно оказалось, являются очень эффективными ингибиторами моноаминоксидазы В (МАО-В), а именно: а) особый AFA-фитохром; б) AFA-фикобилипротeinовый комплекс, содержащий фикобилисому, образованную С-фикоцианином (С-РС) и фикоэритроцианином (РЕС, включая соответствующий хромофор фиковиолобилин или РВВ) ("AFA-фикоцианины"); с) микоспорин-подобные аминокислоты или МАК. Данное открытие является очень важным, так как ФЭА, содержащийся в морских водорослях, без защиты ингибиторов МАО-В очень быстро

разрушался бы ферментом МАО-В при приеме.

Те же соединения, которые действуют как избирательные ингибиторы МАО-В, также исполняют роль мощных нейропротекторов, значительно повышая, таким образом, способность экстракта содействовать неврологическому здоровью.

Таким образом, изобретение обеспечивает способ профилактики, борьбы или лечения вышеуказанных неврологических заболеваний, состояний, дисфункций или расстройств посредством введения нуждающемуся в этом субъекту препарата

Кламатской водоросли AFA, в частности экстракта, обогащенного такими активными компонентами, или выделенного и очищенного компонента, выбранного из: а) AFA фитохрома, б) комплекса с-филоцианина/филоэритроцианинов, присутствующего в AFA или в любых других микроводорослях; с) микоспорин-подобных аминокислот, порфиры и шинорина, присутствующих в AFA или из любого другого источника, относящегося к водорослям; д) или их смеси.

Предпочтительно экстракт Кламатской водоросли AFA согласно изобретению получают посредством следующих стадий:

а) замораживание свежесобранной морской водоросли AFA и ее размораживание, или, если исходным материалом является порошок высушенной AFA, обработка ультразвуком разбавленного в воде порошка AFA для разрушения клеток;

б) центрифugирование продукта стадии а) для отделения супернатанта (содержащего в основном цитоплазматическую фракцию) от осадка (содержащего в основном фракцию обломков клеточных стенок);

с) сбор супернатанта, содержащего растворимые в воде компоненты.

Конечный продукт представляет собой экстракт (обозначенный как "Основной Экстракт"), обогащенный ФЭА, а также другими синергическими веществами, такими как AFA-фитохром, AFA-филоцианины и МАК. Например, тогда как обычное содержание ФЭА в Кламатской микроводоросли находится в диапазоне от 2 до 4 мг/г, в Основном Экстракте указанная концентрация находится на уровне 9 - 11 мг/г (по данным анализа ВЭЖХ).

Можно дополнительно очистить экстракт, пропуская его через систему ультрафильтрации, предпочтительно через мембранию с предельной проницаемостью по молекулярной массе 30000 дальтон. Ультрафильтрационный концентрат (Экстракт А) содержит в качестве основных активных компонентов как AFA-филоцианины (мол. масса = 121000) и AFA-фитохром (мол. масса 480000). Интересно, что хотя МАК имеют молекулярную массу значительно ниже предельной проницаемости используемой мембранны, в концентрате также возрастает концентрация МАК.

Основной Экстракт, полученный на стадиях а) - с), то есть без ультрафильтрации, в целом предпочтителен, поскольку содержит наиболее подходящие количества ФЭА, AFA-фитохрома, AFA-РС и МАК. Кроме того, указанный Основной Экстракт также включает вещества, такие как хлорофилл и каротины, хотя и в уменьшенной концентрации, что придает экстракту антиоксидантные и противовоспалительные свойства.

В альтернативном варианте активные компоненты Кламатской водоросли AFA, а именно комплекс С-филоцианина/филоэритроцианинов (С-РС/PEC), AFA-фитохром и МАК, могут быть выделены и очищены, как дополнительно описано ниже, и применены в способе согласно изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления С-РС/PEC комплекс Кламатской водоросли AFA, AFA-фитохром и микоспорин-подобные аминокислоты используются

как комбинированный препарат для одновременного или раздельного введения субъекту, испытывающему в этом потребность; в еще одном предпочтительном варианте осуществления такой комбинированный препарат содержит фенилэтиламин в качестве дополнительного активного компонента. Из микоспорин-подобных аминокислот наиболее предпочтительными являются шинорин и порфира-334, поскольку они содержатся в относительно более высокой концентрации в Кламатской микроводоросли AFA.

Наблюдаемое ингибиование моноаминоксидазы-В особенно актуально, поскольку позволяет усилить допаминергическую передачу и минимизировать катаболизм ФЭА. В значительной степени и фитохром, и AFA-фикацианин ингибируют МАО-В обратимым и смешанным способом, тогда как ингибиование МАО-В под воздействием МАК является конкурентным и обратимым; таким образом, все три молекулы обеспечивают высокую эффективность в физиологических условиях при отсутствии побочных эффектов.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение направлено на нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, содержащую препарат Кламатской водоросли AFA, экстракт или выделенный компонент экстракта, который предпочтительно выбран из комплекса С-РС/РЕС, присутствующего в AFA, или из любого другого источника, относящегося к микроводорослям, или из выделенных отдельных компонентов С-РС и РЕС; AFA-фитохрома; микоспорин-подобных аминокислот, порфиры и шинорина, присутствующих в водорослях AFA, или из любого другого источника, относящегося к водорослям; или их смесей; с необязательным добавлением фенилэтиламина. В предпочтительном варианте осуществления пищевые композиции представляют собой биологически активные добавки в форме таблеток, капсул, напитков; в другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтические композиции находятся в форме таблеток, капсул, пакетиков, сиропов, суппозиториев, драже и мазей и могут использоваться для профилактики или лечения неврологических или нейродегенеративных заболеваний или состояний, указанных выше. Жидкие экстракты Кламатской водоросли AFA согласно изобретению могут использоваться в первоначальном виде или могут быть высушены посредством таких способов, как лиофилизация, сушка распылением и т.п.

Выделенные активные компоненты могут быть введены в композицию с использованием способов и последующих операций, известных любому специалисту, квалифицированному в данной области техники.

Доза активного компонента будет зависеть от предполагаемого применения композиций либо как биологически активных добавок, либо как фармацевтического препарата. Эффективное количество каждого компонента обычно находится в следующих диапазонах: ФЭА = 0,1-100 мг, предпочтительно 5-30 мг; фитохром = 0,1-1000 мг, предпочтительно 0,8-10 мг; МАК = 0,1-1000 мг, предпочтительно 10-100; фикацианины = 1-2500 мг, предпочтительно 50-1000 мг.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Идентификация "AFA-фитохрома", уникального фитохрома, типичного для Кламатских водорослей

Фитохромы являются фоторецепторами, пигментами, которые растения используют для обнаружения света и которые являются чувствительными к свету в красном и крайней красной области видимого спектра. В растениях они выполняют много различных функций, включая регулирование цветения (посредством циркадианых ритмов), образование почек и синтез хлорофилла. Последнее особенно

актуально в отношении водорослей AFA, так как присутствие данного фитохрома уникального типа в AFA можно объяснить нехваткой другого фикобилипротеина, обычно используемого другими цианобактериями в дополнение к С-фикацианину в процессе фотосинтеза, а именно алло-фикацианина. Так как вместо алло-фикацианина в Кламатских водорослях присутствует фикоэритроцианин или РЕС (см. ниже), вероятно, что присутствия одного РЕС не достаточно, особенно учитывая то, что Кламатские водоросли живут во внутропической среде, что требует высокой эффективности светоулавливания, и таким образом морские водоросли AFA, по-видимому, объединяют свои более высокие потребности с фитохромом.

AFA-фитохром, который имеет специфическую структуру, впервые описан в настоящей заявке. За прошедшие годы в растениях были обнаружены различные типы фитохромов, которые не только кодируются различными фитохромовыми генами (3 в рисе и 6 в кукурузе, например), но в большинстве случаев они имеют различные белковые субъединицы и структуру. Фитохромами их всех делает то, что все они используют один и тот же билипротеин, называемый фитохромобилин, в качестве светоулавливающего хромофора. Указанный хромофор подобен хромофору фикацианина, фикацианобилину и характеризуется одной молекулой билина, состоящей из линейной цепи из четырех пиррольных колец (тетрапирролов). Более конкретно, в своем нормальном состоянии P_g указанный билипротеин поглощает свет при максимуме 650-670 нм, тогда как при активации красным светом он переходит в P_{fr} с максимумом поглощения 730 нм.

Первым из фитохромов цианобактерий был открыт фитохром из *Synechocystis*, обладающий слабым структурным подобием с фитохромами растений. Однако билипротеин *Synechocystis* в целом считают фитохромом, поскольку он является обратимым хромопротеином в красной/крайней красной области (48).

Очистка фитохрома AFA и определение его свойств

AFA-фитохром в качестве хромофора несет билипротеин, который поглощает свет в красном/крайнем красном спектре. Для установления его структуры и функций фитохром очищали согласно следующей методике:

- 1 г экстракта суспендировали в 10 мл 1 К-fosfatного буфера, pH 7,0;
- дважды встряхивали в течение 1 минуты с половиной их объема;
- клетки инкубировали в течение 35' с 2% Тритона X100;
- центрифугировали при 28000 об/мин в течение 16-18 ч;
- супернатант собирали в ступенчатом градиенте плотности сахарозы;
- градиент центрифугировали, используя колебательные роторы при 150000 g в течение 12 ч;
- хранили на -20°C.

Фитохром соответствует полосе лизата с интенсивным оранжевым цветом, который виден приблизительно при 1М сахарозы, тогда как фикобилисома остается приблизительно при 0,75М. Данное соотношение указанных двух полос также дает достоверные данные молекулярной массы фитохрома, присутствующего в водорослях, которая приблизительно в 4 раза больше, чем молекулярная масса тримерного AFA-РС: так как последняя составляет 121 кДа, можно предварительно определить молекулярную массу AFA-фитохрома как приблизительно 480 кДа (Фигура 22).

При анализе светопоглощающих свойств фитохром поглощал свет с двумя пиками при 672 нм и 694 нм, которые отвечают соответственно формам P_g (поглощению красного света) и P_{fr} (поглощению крайнего красного света) в состоянии равновесия

(Фигура 23).

Относительно количества фитохрома, содержащегося в АFA, первая оценка дала следующий предварительный результат: 2 мг/г (или 0,2% собственного веса).

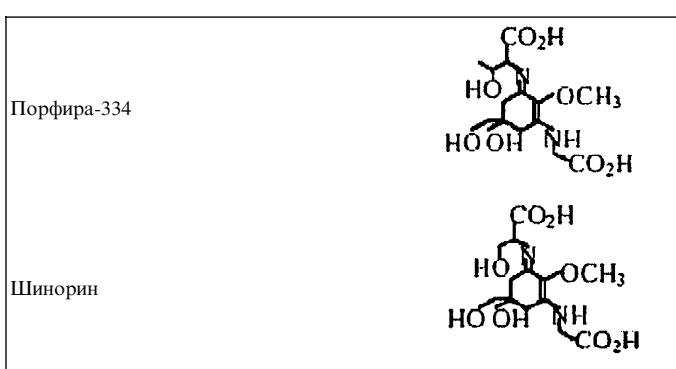
Относительно экстрактов, концентрация увеличивается приблизительно до 0,5% в Основном Экстракте, и приблизительно до 1% в Экстракте В. Это довольно низкие концентрации, однако антиоксидантные и противовоспалительные свойства данного соединения настолько сильны, что даже очень малое количество может производить весьма значительные эффекты.

10 Антиоксидантная активность

Очищенный АFA-фитохром, как было установлено, является очень мощным антиоксидантом. Более того, в абсолютных значениях самая мощная молекула на настоящий момент найдена в Кламатских водорослях. Инкубация в течение 2 ч образцов плазмы крови человека с окислителем CuCl₂ при концентрации 100 мкМ приводит к образованию повышенных уровней малонового диальдегида (МДА), одного из конечных побочных продуктов перекисного окисления липидов, который определяют с помощью спектрофотометра при 535 нм после реакции с тиобарбитуровой кислотой (тест ТВА). Когда плазму инкубируют в течение 2 часов при 37°C с 100 мкМ CuCl₂ при повышении концентрации АFA-фитохрома (2-16 нМ), экстрагированного из водорослей АFA, наблюдается очень сильное дозозависимое снижение уровней МДА (Фигура 24). Более того, почти при полном ингибиции перекисного окисления липидов всего лишь при 16 нМ АFA-фитохрома уровни МДА были близки к контролльному значению. Что важно, значение IC₅₀ 3,6 нМ в 45 раз меньше, чем значение, полученное для РСВ. Фитохром является основным соединением, ответственным за антиоксидантный и нейропротективный эффекты Основного Экстракта, которые сильнее, чем соответствующие эффекты АFA-РС.

Экстракт, очистка и количественное определение МАК

Было проанализировано присутствие МАК в цианофите *Aphanizomenon flos-aquae* из озера Кламат, общеизвестном как Кламатские водоросли. Несколько было известно, лишь в одной из последних статей сообщалось о присутствии МАК в некоторых видах *Aphanizomenon* (47); однако в указанном сообщении в качестве присутствующих МАК идентифицировали только порфири, тогда как в настоящем исследовании показано присутствие двух МАК, и порфиры, и шинорина. С другой стороны, что касается всей литературы по водорослям, то тогда как большинство известных на сегодняшний день цианобактерий содержат шинорин в качестве основных МАК, авторы настоящего изобретения обнаружили необычное присутствие порфиры-334 в качестве основной МАК в *Aphanizomenon flos-aquae* в дополнение к шинорину.



МАК экстрагировали, как описано ранее (29). Кратко, 20 мг порошка АFA или 20 мг водного экстракта экстрагировали 2 мл 20% (об./об.) водного раствора метанола

(для ВЭЖХ) при инкубировании в водяной бане при 45°C в течение 2,5 ч. После центрифугирования (5000 g; Центрифуга GS-15R, Beckman, Пало-Альто, США) супернатант выпаривали досуха и повторно растворяли в 2 мл 100%-го метанола, встряхивали на вортексе в течение 2-3 минут и центрифugировали при 10000 g в течение 10 мин. Супернатант выпаривали, а экстракт повторно растворяли в таком же объеме 0,2% уксусной кислоты для анализа с помощью ВЭЖХ или в 200 мкл фосфатного буфера (PBS) для оценки антиоксидантных свойств. Пробы фильтровали через шприцевые фильтры с размером пор 0,2 мкм (VWR International, Милан, Италия) перед анализом с помощью ВЭЖХ или анализом антиоксидантных свойств (см. ниже).

МАК из Кламатских водорослей имеют максимум поглощения при 334 нм. Последующую очистку МАК выполняли, используя систему ВЭЖХ (Jasco Corporation, Токио, Япония), оборудованную колонкой Alltima C18 и защитной колонкой (внутр. сеч. 4,6 × 250 мм, набивка 5 мкм, Alltech, Милан, Италия), в соответствии с

литературными данными (30). Длина волны для детектирования составляла 330 нм; подвижной фазой являлась 0,2% уксусная кислота при расходе 1,0 мл*мин⁻¹.

Идентификацию МАК проводили, сравнивая спектры поглощения и время удержания со стандартами, такими как *Rorphyra* и *Pterocladia sp.*, главным образом содержащими порфиру-334, шинорин и палитин, любезно предоставленные доктором Манфредом Клишем, университет им. Фридриха-Александра, Эрланген, Германия. Спектры поглощения проб измеряли при 200 - 800 нм на однолучевом спектрофотометре (DU 640, Beckman, Пало-Альто, США). Нерасшифрованные спектры перенесли в компьютер и обработали математически с целью анализов пиков МАК.

МАК частично очищали из образца AFA и из водного экстракта, как описано ранее. Экстракция образцов в 20%-ом метаноле при 45°C в течение 2,5 ч привела к заметному пику при 334 нм (МАК); даже если небольшие количества фотосинтетических пигментов (например, фикоцианина при 620 нм) были также экстрагированы в данной методике (см. Фигуру 1, пунктирная линия). Затем пробы МАА обрабатывали 100%-ым метанолом с целью удаления белков и солей, и в завершении 0,2% уксусной кислотой для удаления неполярных фотосинтетических пигментов. Полученные в результате частично очищенные МАК имели максимум поглощения при 334 нм (Фигура 1, сплошная линия).

Последующий анализ и очистку МАК выполняли с помощью ВЭЖХ в целях подтверждения, соответствуют ли соединения с поглощением при 334 нм одной МАК или смеси более чем одной МАК. Хроматограмма пробы (Фигура 2) показала присутствие двух МАК с временем удержания 4,2 (пик 1) и 7,6 минут (пик 2), которые были идентифицированы как шинорин и порфира-334 соответственно. Порфира-334, по-видимому, является основной МАК в AFA, так как шинорин присутствовал лишь в небольших количествах (соотношение площади пиков 1:15).

УФ-спектры очищенных МАК подтверждали соответствующий максимум поглощения при 334 нм (Фигура 3).

Принимая во внимание, что молярные коэффициенты экстинкции при 334 нм для шинорина и порфиры-334 составляют 44700 и 42300 M⁻¹ см⁻¹, соответственно, было вычислено:

а) для водорослей AFA, концентрация шинорина 0,49 мг г⁻¹ собственного веса и порфиры-334 7,09 мг г⁻¹ собственного веса; общее содержание МАК, таким образом, составляет 0,76% собственного веса водорослей;

б) для Основного Экстракта, концентрации МАК 17-21 мг (что составляет 1,7-2,1% собственного веса).

Это важные данные, поскольку цельные AFA содержат высокие уровни МАК (0,76% собственного веса), близкие к максимальной концентрации, найденной при УФ-облучении, то есть 0,84% (31). Кроме того, было обнаружено, что экстракт имеет более высокую концентрацию, чем цельные водоросли, достигая намного более высоких уровней, чем максимальная потенциальная концентрация.

МАК (шинорин и порфира-334) являются структурно простыми молекулами с молекулярной массой 300. Это позволяет указанным водорастворимым молекулам легко проходить через гематоэнцефалический барьер, что подтверждает их способность проявлять свой потенциал в ингибировании МАО-В в той области, где это наиболее необходимо, в мозге.

Фикоцианины

Фикоцианины присутствуют в экстракте в концентрации 8-10% (количественный анализ см. ниже). Фикоцианины представляют собой синие пигменты, типичные для всех цианобактерий или сине-зеленых водорослей, хотя и со специфическими свойствами для каждого конкретного вида водорослей (32). Что касается функциональных и терапевтических свойств фикоцианинов, пока исследования главным образом сфокусированы на фикоцианинах из микроводоросли *Spirulina*. Очищенные фикоцианины из *Spirulina*, как установили, обладают антиоксидантными (33) и противовоспалительными (34, 35, 36) свойствами в различных физиологических системах, таких как печень (37), дыхательная система (38) и мозг (39, 40). Такие свойства очищенного РС из *Spirulina* в целом могут быть также приписаны фикоцианинам других водорослей, учитывая их существенное подобие.

Однако между различными фикоцианинами из различных микроводорослей могут существовать видоспецифические различия, что может привести к различной активности при проявлении вышеописанных функциональных и терапевтических свойств.

Структурное определение и специфические свойства фикобилисом Кламатских водорослей

В общем, в интактной клетке цианобактерии фикоцианины (РС) присутствуют в фикобилисоме в функциональной форме ($\alpha\beta$)₆ (41). После вскрытия клетки белок может быть обнаружен в различных агрегированных формах (мономеры, димеры, тримеры, гексамеры) в зависимости от исследуемого организма. В случае Кламатских водорослей электрофоретический анализ РС, непосредственно содержащегося в экстракте и очищенного из экстракта, показал, что белок главным образом присутствует в форме тримера ($\alpha\beta$)₃, с общей молекулярной массой 121000. Мономер $\alpha\beta$ имеет массу приблизительно 40000 (18500 α субъединица + 21900 β субъединица). Большинство исследований очищенного РС из Спирулины напротив указывает, что мономерная форма $\alpha\beta$ белка, обнаруженного в Спирулине, обладает молекулярной массой приблизительно 37500, таким образом, демонстрируя другое агрегированное состояние в отличие от очищенного РС из AFA.

Хроматографический анализ фикобилисом AFA также показал, что, как в других видах цианобактерий α субъединица РС связывает простетическую группу, тогда как β субъединица связывает две. Простетическая группа или хромофор называется фикоцианобилином (PCB) и отвечает за синий цвет белка и его антиоксидантный потенциал (42).

Фундаментальное различие между AFA и *Спирулина* основано на различной структуре фикобилисомы. В отличие от Спирулины, фикобилисома Кламатской водоросли AFA не содержит пигмент алло-фикоцианин, при этом только пигмент с-

фикоцианин соединен со структурным компонентом, который отсутствует в Спирулине, а именно, фикоэритроцианином (PEC). PEC представляет собой фотосинтетический пигмент, который на сегодняшний день был идентифицирован лишь у ограниченного числа видов цианобактерий (43). Химическая структура PEC в значительной степени схожа со структурой PC и состоит из двух субъединиц α и β , которые соединяются с образованием мономеров и тримеров. Однако тогда как каждый мономер PC связывает 3 молекулы PCB, PEC обладает уникальной особенностью связывания двух молекул PCB с β субъединицей и одной молекулой фиковоиолобилина (PVB) с α субъединицей, которая отвечает за пурпурный цвет пигмента.

Исключительно впервые фикобилисома Кламатских водорослей определена как совершенно точно состоящая из комплекса с-фикоцианина и фикоэритроцианина, причем данная различная характерная структура фикобилисомы Кламатской водоросли AFA добавляет дополнительный решающий фактор, отличающий AFA от Спирулины.

Фигура 4 подтверждает вышесказанное, сравнивая компоненты клеточного лизата AFA с компонентами лизата другой известной цианобактерии, *Synechocystis* PCC 6803. У обоих цианобактерий можно увидеть синюю полосу, соответствующую фикобилисоме, но в водорослях AFA фикобилисома имеет более низкую молекулярную массу, что подтверждает, в противоположность обычным микроводорослям, таким как Спирулина, что в фикобилисоме AFA присутствуют только фикоцианины, а алло-фикоцианины не присутствуют. Кроме того, Фигура 4 показывает, что в AFA также присутствует светло-пурпурная полоса (показана стрелкой), которая типична для фикоэритроцианинов, что доказывает, таким образом, их присутствие в фикобилисоме Кламатских водорослей.

В целях более интенсивного определения каждую синюю полосу дополнительно проанализировали с помощью ВЭЖХ, связанной с масс-спектрометром (ОФ-ВЭЖХ-ИЭ-МС). Благодаря различному времени удержания белки фикобилисомы были разделены и идентифицированы на основании их молекулярной массы. Полученные результаты показаны в следующих таблицах. Вначале можно увидеть, что в *Synechocystis* (Таблица 1) присутствуют фикоцианин (срсA 28,2 мин и срсB 28,9 мин), и алло-фикоцианин (арсA 30,7 мин и арсB 31,2 мин), а в AFA (Таблица 2) только фикоцианин (срсA 28,8 мин и срсB 30,0 мин). Во-вторых, в AFA был идентифицирован белок с молекулярной массой 19469, который не присутствует в *Synechocystis* и который соответствует бета-субъединице фикоэритроцианина с двумя присоединенными билинами (ресB 25,0 мин).

ТАБЛИЦА 1:
Белки, присутствующие в фикобилисоме *Synechocystis*.

Время удержания (мин)	Измеренная молекулярная масса	Ожидаемая молекулярная масса	Белок [гомологичный организм]	Номер NCBI
45	14,5	9322	срсD	gil16329820
	22,6	32505	срсC	gil16329821
		32388	срсC	gil16329822
24,6	28770	27392	срсG	gil16329710
24,8	28885	28522	срсG	gil16332194
28,2	18173	17586	срсA (α субъединица фикоцианина)	gil2493297
28,9	19313	18126	срсB (β субъединица фикоцианина)	gil2493300
30,7	17866	17280	арсA (α субъединица алло-фикоцианина)	gil266765
31,2	17816	17215	арсB (β субъединица алло-фикоцианина)	gil266766

ТАБЛИЦА 2: Белки, присутствующие в фикобилисоме Кlamатской водоросли AFA					
	Время удержания (мин)	Измеренная молекулярная масса	Ожидаемая молекулярная масса	Белок [гомологичный организм]	Номер NCBI
5	15,2	9031	8925	гипотетический белок Avar03000795 [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]	gil45510540
			8895	cpcD [<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120]	gil131740
10	25,0	19469	18284	ресB: бета цепь фикоэритроцианина [<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120]	gil548504
		19308	18370	гипотетический белок Avar03000787 (ресB) [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]	gil45510532
15	26,4	31044	32078	cpcC [<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120]	gil20141679
			32219	гипотетический белок Avar03000794 (линкер мол. масса 32000) [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]	gil45510539
20		30124	31295	ресC [<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120]	gil464511
			31304	гипотетический белок Avar03000789 (ресC) [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]	gil45510534
25		26,8 27,8 28,8 30,0	29333	гипотетический белок Avar03000801 (cpcG4) [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]	gil46135436
			28637	гипотетический белок Avar03000799 (cpcG2) [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]	gil45510544
			10986	fdxH2: ferredoxin, растительный [<i>Anabaena variabilis</i>]	gil1169673
			17457	cpcA [<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120]	gil9957319
30		17714 19222	18332	cpcB [<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120]	gil38894
			26119	гипотетический белок Avar03000799 (cpcG2) [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]	gil45510544
			10994	fdxH2: ferredoxin, растительный [<i>Anabaena variabilis</i>]	gil1169673
			17714	cpcA [<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120]	gil9957319
			19222	cpcB [<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120]	gil38894
<p>Подобная уникальная структура является важным элементом в объяснении более сильного антиоксидантного и противовоспалительного действия целого AFA-PC по отношению к его PCB. Антиоксидантные и противовоспалительные свойства становятся актуальными в данном контексте, поскольку они производят сильный нейропротективный эффект; также в отношении нейропротекции целый PC более эффективен, чем его PCB, что ясно указывает на то, что другой активный компонент помимо PCB в фикобилисоме, а именно, PEC и его специфический хромофор PVB, являются, по-видимому, наиболее активным действующим началом AFA-PC, улучшающим самочувствие. То, что очищенный AFA-PC действительно содержит не только С-PC и его хромофор PCB, но также PEC и его хромофор PVB, становится очевидным при изучении спектрометрии экстракта, полученного в результате очистки (Фигура 5). Фактически, максимум поглощения С-PC составляет 620 нм, что в спектрометрии на Фигуре 5 соответствует вершине пика. Но максимум поглощения PEC, как известно, составляет 566 нм для α-субъединицы (фиквиолобилин или PVB) и соответственно 593 нм и 639 нм для двух PCB β-субъединицы. Все три значения действительно включены в колоколообразный пик, составляющий спектральный профиль очищенного PC. Принимая во внимание сильную связь между С-PC и PEC в водорослях AFA, с большим трудом поддающуюся разрыву, это подтверждает, что помимо С-PC PEC также является обязательной частью очищенного экстракта PC. Это в свою очередь означает, что PC из AFA</p>					

значительно отличен, как структурно, так и функционально, от РС из другой цианобактерии, включая РС из Спирулины, который был исследован более подробно, а также то, что указанное различие состоит в наличии лишь одной части в целом, а именно, С-РС, но не другой; с выводом, что тогда как свойства С-РС могут также быть приписаны С-РС компоненту АФА-РС, свойства всего РС из АФА, который находится в комплексе С-РС/РС (включая его хромофоры РСВ и РВБ), связаны исключительно с ним (так же как и с любым комплексом С-РС/РС, присутствующим в любых других микроводорослях).

10 Методики очистки (Фигура 5)

РС очищали из высушенного экстракта АФА следующим образом:

- 500 мг экстракта суспендировали в 50 мл 100 мМ НА-фосфатного буфера, рН 7,4;
- центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10' при 4°C;
- супернатант собирали и добавляли твердый сульфат аммония до 50% насыщения;
- белки осаждали в течение 60 минут при 4°C, продолжая перемешивать пробу;
- центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 мин при 4°C;

15 - прозрачный бесцветный супернатант отбрасывали и ресуспендировали синий осадок в малом объеме 5 мМ НА-фосфатного буфера, рН 7,4;

- диализ проводили при 4°C в течение ночи против того же буфера;

20 - диализированный РС переносили в гидроксиапатитовую колонку,

уравновешенную 5 мМ НА-фосфатным буфером, рН 7,4;

25 - пробу элюировали НА-фосфатным буфером, рН 7,4 с повышением ионной силы (с 5 до 150 мМ);

- фракции собирали и регистрировали поглощение при 620 нм и 280 нм с помощью спектрофотометра;

- фракции со значением $\text{Abs}_{620}/\text{Abs}_{280} > 4$ (индекс чистого РС) объединяли;

- РС осаждали сульфатом аммония при 50% насыщения в течение 1 часа при 4°C;

30 - центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30' при 4°C;

- супернатант отбрасывали, а РС ресуспендировали в 150 мМ НА-фосфатным буфером, рН 7,4;

- диализ проводили против того же буфера при 4°C;

- очищенный РС переносили в колбу и хранили в темноте на +4°C или -20°C.

35 Количественный анализ фикоцианина

Для измерения молярной концентрации чистого РС использовали его коэффициент молярной экстинкции при 620 нм, который для тримерной формы $(\alpha\beta)_3$ равен $770000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Это означает, что 1М раствор РС при 620 нм имеет значение поглощения 770000.

40 Для измерения концентрации РС в экстракте использовали коэффициент удельной экстинкции $E^{1\%}$ при 620 нм $70 \text{ л г}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Это означает, что раствор, содержащий 1% РС (то есть 1 г/100 мл), при 620 нм поглощает с интенсивностью 70. На основе данных вычислений среднее содержание РС в экстракте равно 80-100 мг/г собственного веса (8-10% собственного веса).

45 Очистка хромофора РСВ (Фигура 6)

• 500 мг экстракта суспендировали в 50 мл дистиллированной H_2O .

• Центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10' при 4°C.

50 • Ярко-синий супернатант сливали с осадка и осаждали РС 1% трихлоруксусной кислотой.

• Инкубировали в течение 1 ч в темноте при 4°C с перемешиванием.

• Центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30' при 4°C.

- Осадок, содержащий РС, собирали и промывали 3 раза метанолом.
- Осадок ресуспендировали в 10 мл метанола, содержащего 1 мг/мл HgCl₂.
- Инкубировали в течение 20 ч при 42°C в темноте для выделения PCB из РС.
- Центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10' для удаления белков.
- 5 • К супернатанту, содержащему PCB, добавляли β-меркаптоэтанол (1 мкл/мл) для осаждения HgCl₂.
- Инкубировали при -20°C в течение 24 ч.
- Центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30' при 4°C с целью удаления белого осадка.
- 10 • К супернатанту добавляли 10 мл метиленхлорида/бутанола (2:1, об./об.).
- Промывали 20 мл дистиллированной H₂O и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10'.
- Верхнюю фазу удаляли, отбирали более низкую часть, содержащую PCB.
- 15 • PCB промывали 15 мл H₂O 3 раза.
- Высушивали под азотом и хранили при -20°C.

ОЦЕНКА ИНГИБИРОВАНИЯ МАО-В ЭКСТРАКТОМ КЛАМАТСКОЙ ВОДОРОСЛИ AFA И ЕГО АКТИВНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ ФОТОХРОМОМ, 20 ФИКОЦИАНИНОМ И МАК

Была проанализирована ингибирующая активность Основного Экстракта в отношении МАО-В с использованием специфического субстрата бензиламина (1 мМ). Анализ проводили с использованием спектрофотометра при 30°C с длиной волны 250 нм, предварительно инкубируя МАО-В (2 мкг/мл) с водорастворимыми и жирорастворимыми компонентами основного экстракта при различных концентрациях, полученными на стадиях а) - с), описанных выше (начальная концентрация 10 мг/мл). Экстракт, обогащенный водорастворимыми компонентами, получали путем ресуспендирования водного экстракта в воде и сбора супернатанта 25 после центрифugирования. Экстракт, обогащенный жирорастворимыми компонентами, получали путем ресуспендирования экстракта в ацетоне; впоследствии супернатант было высущено, а осадок ресуспендирован в ДМСО, растворителем, фармацевтически совместимым с МАО-В.

Как показано на Фигуре 7А, водорастворимая фракция ингибитирует МАО-В 35 дозозависимым образом, тогда как липофильная фракция не ингибирует фермент. Водорастворимая фракция Основного Экстракта AFA является мощным селективным ингибитором МАО-В с IC₅₀ 6,9 мкл. Селективность по отношению к МАО-В составляет 4 (IC₅₀ МАО-В/IC₅₀ МАО-А>4,05) (Фигура 7В).

График в координатах Лайнувера-Берка на Фигуре 8 показывает, что такое 40 ингибиование является обратимым смешанного типа по отношению к конкуренции, с уменьшением V_{max} и увеличением константы K_m Михаэлиса-Ментен. Построив график зависимости наклона от концентрации водорастворимой фракции экстракта AFA, получили Константу ингибиования K_i при 1 мкл. По сравнению с водорастворимой фракцией Основного Экстракта данное низкое значение K_i 45 указывает на высокую аффинность к ферменту МАО-В.

Тот факт, что ингибиование под воздействием экстракта является обратимым, означает, что экстракт проявляет физиологическую активность без побочных 50 эффектов. Что касается смешанной конкуренции, вероятно, это происходит из-за сложной природы экстракта, включающего молекулы с различной функциональностью, одни из которых являются конкурентными, а другие неконкурентными. Основными активными компонентами экстракта являются AFA-

фитохром (0,5% собственного веса); фикоцианины (8-10% собственного веса); а также МАК или микоспорин-подобные аминокислоты (1,7-2,1% собственного веса), которые отдельно анализировали как ингибиторы МАО-В.

Ингибиование МАО-В под действием фикоцианинов

5 Тест проводили с использованием спектрофотометра при 30°C с длиной волны 250 нм, используя бензиламин в качестве субстрата, с предварительным инкубированием МАО-В с очищенным РС из АФА (0,5-4 мкМ) при различных концентрациях. Как показано на фигуре 9, АФА-РС вызывает дозозависимое снижение 10 активности МАО-В, с IC₅₀ 1,44 мкМ. Селективность АФА-РС к МАО-В выше 3,5 (IC₅₀ МАО-В/IC₅₀ МАО-А > 3,5).

15 График в координатах Лайнувера-Берка на Фигуре 10 показывает, что, как и в случае экстракта, ингибиование является обратимым смешанного типа (конкурентным и неконкурентным) с изменением V_{max} и K_m.

Построив график зависимости наклона от концентрации РС, получили значение 20 константы ингибиования K_i, которая в данном случае составило 1,06 мкМ. Константа ингибиования определяет аффинность ингибитора к ферменту: высокая K_i указывает на низкую аффинность к ферменту, и наоборот. В данном случае низкое значение K_i указывает на высокую аффинность РС АФА к МАО-В.

Ингибиование МАО-В под действием МАК

Активность МАО-В в отношении субстрата бензиламина оценивали относительно 25 растущих концентраций МАК (0,5-8 мкМ), предварительно очищенных из Основного Экстракта с использованием 20% метанола. На Фигуре 11 показано дозозависимое ингибиование МАО-В под действием МАК с IC₅₀ 1,98 мкМ. Селективность МАК к МАО-В выше 2 (IC₅₀ МАО-В/IC₅₀ МАО-А > 2,02).

График в координатах Лайнувера-Берка (Фигура 12) показывает, что 30 ингибиование является обратимым и конкурентным, с ростом K_m, но без изменения V_{max}. Это означает, что МАК, благодаря своей химической структуре, конкурируют с субстратом за связь с активным сайтом фермента. Построив график зависимости наклона от концентрации МАК (Фигура 13), получили значение константы ингибиования K_i, которое составило 0,585 мкМ, что демонстрирует очень высокую степень аффинности к ферменту.

Ингибиование МАО-В под действием АФА-фитохрома

Тест проводили с использованием спектрофотометра при 30°C с длиной волны 250 нм, используя бензиламин в качестве субстрата, с предварительным инкубированием МАО-В с очищенным АФА-фитохромом при различных 40 концентрациях (8,3 - 66,4 нМ). Как показано на Фигуре 15, АФА-фитохром вызывает дозозависимое снижение активности МАО-В, с IC₅₀ не более 20,2 нМ.

График в координатах Лайнувера-Берка на Фигуре 16 показывает, что, как и в случае экстракта, ингибиование является обратимым смешанного типа (конкурентным и неконкурентным) с изменением V_{max} и K_m.

45 Построив график зависимости наклона от концентрации АФА-фитохрома, получили значение константы ингибиования K_i, которое составило 10,48 нМ. Константа ингибиования определяет аффинность ингибитора к ферменту: высокая K_i указывает на низкую аффинность к ферменту, и наоборот. В данном случае, чрезвычайно низкое 50 значение K_i указывает на очень высокую аффинность АФА-фитохрома к МАО-В.

Конкурентное и обратимое действие МАК делает указанные соединения очень мощными ингибиторами МАО-В. Фактически конкурентный и обратимый характер ингибиования МАО-В обеспечивает одновременно высокую эффективность, а также

физиологическую активность без побочных эффектов. В данном смысле, МАК, содержащиеся в экстракте, также и из-за их молекулярной массы и, в результате, способности легко проходить через гематоэнцефалический барьер, составляют решающий компонент, даже *in vivo*, производящий терапевтические эффекты, полученные в результате ингибиования МАО-В.

Даже в большей степени, чем МАК, фитохром, как оказалось, является наиболее мощным ингибитором МАО-В из всех известных на настоящий момент веществ. Его очень высокая аффинность к ферменту МАО-В, а также его эффективное ингибиование при концентрациях немного ниже наномолярных, делает это соединение само по себе не только прекрасным терапевтическим агентом, но и фактором, который, по всей вероятности, обеспечивает наиболее весомый вклад в высокую неврологическую эффективность экстракта (экстрактов) АФА.

Следует добавить, что некоторые из факторов, касающиеся МАК и фитохрома, можно также отнести к поведению фикоцианинов *in vivo*. Известно, что РС оказывают нейропротективное действие на мозг *in vivo*, а также что они способны проходить через гематоэнцефалический барьер (44). Это означает, что они также способны проявлять *in vivo* свою ингибирующую активность в отношении МАО-В в мозге. Молекулярная масса хромофора действительно составляет лишь 700, что не намного больше, чем молекулярная масса МАК. То же справедливо для хромофора фитохрома - фитохромобилина - структурно подобного фикоцианобилину.

В заключение активность ингибиования МАО-В со стороны экстракта и его активных компонентов, фитохрома АФА, АФА-РС и МАК, является чрезвычайно актуальной, поскольку как указанные соединения, так и экстракт обладают наиболее высоким уровнем активности, равной или выше активности фармакологических веществ, и существенно выше любой исследованной природной молекулы, как показано в следующей таблице (45):

Таблица 3:
Сравнительные кинетические параметры (IC_{50} и K_i) ингибиования МАО-В под действием известных синтетических и природных ингибиторов

Ингибиторы МАО-В	IC_{50}	K_i	Тип ингибиования
Депренил	0,31 мкМ	0,002 мкМ	Необратимый
Эпикатехин	58,9 мкМ	21 мкМ	Смешанный
Катехин	88,6 мкМ	74 мкМ	Смешанный
Алкалоид (не харман)	6,47 мкМ	1,12 мкМ	Смешанный
Пиперин	91,3 мкМ	79,9 мкМ	Конкурентный
Пеонол	42,5 мкМ	38,2 мкМ	Конкурентный
Эмодин	35,4 мкМ	15,1 мкМ	Смешанный
<i>AFA-фикоцианин</i>	<i>1,44 мкМ</i>	<i>1,06 мкМ</i>	<i>Смешанный</i>
<i>AFA-МАК</i>	<i>1,98 мкМ</i>	<i>0,585 мкМ</i>	<i>Конкурентный</i>
<i>AFA-фитохром</i>	<i>0,02 мкМ</i>	<i>0,010 мкМ</i>	<i>Смешанный</i>

Как показано в таблице, только фикоцианины и МАК имеют IC_{50} немного выше 1 мкМ, что очень близко к IC_{50} Депренила (0,31 мкМ), и в десять раз ниже, чем IC_{50} других исследуемых соединений. АФА-фитохром, с другой стороны, имеет IC_{50} в 15 раз ниже, чем IC_{50} Депренила. То же справедливо для константы ингибиования K_i , которая определяет аффинность ингибитора к ферменту. АФА-фикоцианины имеют K_i порядка 1 мкМ, как ненаркотические (не харманового типа) алкалоиды кофе и табака (но конечно без какой-либо из проблем, связанных с двумя указанными веществами). С другой стороны, МАК и АФА-фитохром, наряду с Депренилом, являются единственными соединениями, обладающими K_i ниже 1 мкМ, и, таким

образом, очень высокой аффинностью к МАО-В. Фактически, АФА-фитохром является единственной природной молекулой, помимо селегилина/Депренила, К_i которой имеет порядок нескольких наномолей. И все же существует существенное различие между 5 селегилином/Депренилом и веществами экстракта АФА: первый является необратимым ингибитором, таким образом, отличающимся потенциальными побочными эффектами; тогда как все ингибирующие МАО-В вещества, содержащиеся в Кламатской водоросли АФА, являются обратимыми ингибиторами, отличающимися физиологической активностью, лишенной проблем, связанных с синтетическими 10 молекулами.

На Фигуре 14 графически показана ингибирующая активность по отношению к МАО-В трех молекул АФА в сравнении с Депренилом. Учитывая совместные действия всех трех молекул в Основном Экстракте (и других экстрактах АФА), полная ингибиторная активность Основного Экстракта в отношении МАО-В является в 15 результате очень высокой. Также весьма существенным является высокое количество ФЭА, присутствующее в Основном Экстракте. Если сравнивать основной экстракт с Депренилом на основе содержания в нем РС, мы получим то, что Основной Экстракт достигает IC₅₀ при концентрации РС не более 0,05 мкМ, при котором его 20 эффективность в 7,5 раз выше, чем у Депренила (и в десятки раз выше, чем у природных веществ). Это становится понятным в свете эффективности фитохрома, содержащегося в Основном Экстракте: в среднем эффективность ингибирования РС и МАКА отличается фактически в 7,5 раз, что немного ниже по сравнению с Депренилом, а также фитохромом, который в 15 раз более эффективный (Фигура 17). 25 Это также показывает, что более высокая эффективность экстракта по сравнению с очищенным АФА-РС главным образом обусловлена фитохромом.

Кроме того, экстракт обладает еще одним преимуществом, так как является 30 природным физиологически активным веществом, ингибирующим МАО-В обратимо и главным образом конкурентно, в результате чего экстракт лишен побочных 35 эффектов, потенциально связанных с необратимыми ингибиторами, такими как Депренил и другие синтетические соединения (46).

Дополнительным преимуществом экстракта является высокое содержание в нем 35 фенилэтиламина, мощного допаминергического нейромодулятора, который работает в полной синергии с другими молекулами, при этом можно выделить следующие 40 синергические эффекты:

- Фенилэтиламин или ФЭА обладает удвоенной допаминергической активностью, поскольку он стимулирует высвобождение допамина из нигростриарной ткани, и 45 поскольку он ингибирует постсинаптический обратный захват самого допамина;
- Фитохром, МАК и фикоцианины, как мощные ингибиторы МАО-В, также усиливают допаминергическую передачу, поскольку сниженная активность МАО-В приводит к увеличению жизни нейроаминов, включая допамин;
- Фитохром, МАК и фикоцианины, как ингибиторы МАО-В, также продлевают 50 жизнь и активность фенилэтиламина, который сам по себе является объектом дезаминирующей активности фермента МАО-В, с последующим созданием эффективного цикла, дополнительно поддерживающего допаминергическую передачу и активность, а также общую нейромодуляцию, производимую ФЭА.

- Наконец, мощная антиоксидантная и противовоспалительная активность фикоцианинов, вместе с их способностью или способностью их хромофора проходить через гематоэнцефалический барьер, а также чрезвычайно высокая антиокислительная активность фитохрома и менее сильная, но все же существенная антиоксидантная

активность МАК, обеспечивают нейропротекцию, которая ограждает различные активные молекулы и в целом неврологический эффективный цикл, который они создают, от любого окислительного и воспалительного повреждения.

НЕЙРОПРОТЕКЦИЯ

Были исследованы нейропротективные свойства экстракта АФА, специфического АФА-РС и его хромофора РСВ, а также МАК против нейротоксического эффекта глутамата.

Глутамат является главным возбуждающим нейромедиатором в центральной нервной системе млекопитающих, однако сверхстимуляция его рецептора подтипа NMDA в нейронах вызывает массивное внутриклеточное накопление Ca^{2+} , что приводит к гибели клеток. Кроме того, внутримитохондриальное накопление

Ca^{2+} , после стимуляции рецептора NMDA, транзистентно повышает концентрацию свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле, активирующих нейронную изоформу синтазы оксида азота (NOS) (49), фермента, который синтезирует оксид азота (NO) или, главным образом в первичных нейронах, продукт его реакции с супероксидом (O_2^-), пероксинитрит (ONOO^-).

Воздействие глутамата на нейроны проводили согласно несколько измененной методике (50): культуральную среду удаляли и однократно промывали нейроны предварительно нагретым до 37°C буфером Хэнкса (5,26 мМ KCl, 0,43 мМ KH_2PO_4 , 132,4 мМ NaCl, 4,09 мМ NaHCO_3 , 0,33 мМ Na_2HPO_4 , 20 мМ глюкозы, 2 мМ CaCl_2 , и 20 мМ HEPES, pH 7,4) и предварительно инкубировали в отсутствие или присутствии нескольких концентраций экстракта АФА (1-50 нМ), РС (10-1000 нМ), РСВ (10-1000 нМ) и МАК (1-10 мкМ) в предварительно нагретом до 37°C буфере Хэнкса. Через 30 минут предварительной инкубации добавляли концентрированный раствор L-глутамата до конечной концентрации 100 мкМ плюс 10 мкМ глицина. Нейроны инкубировали при 37°C в течение 15 минут, удаляли буфер с помощью аспиратора, заменив его средой DMEM, после чего клетки инкубировали при 37°C в течение еще 24 ч в отсутствии эффекторов.

Апоптоз оценивали, окрашивая ядра клеток ДАФИ (50), флуоресцентным красителем, проходящим через мембрну, который связывает ДНК и позволяет количественно определять апоптические нейроны, то есть нейроны с фрагментированными или сжатыми ядрами. Вкратце, через 24 ч после воздействия глутамата, культуры нейронов промывали теплым PBS (37°C) и фиксировали 4% (масс./об.) раствором параформальдегида в PBS в течение 30 минут при комнатной температуре. После промывки PBS клетки обрабатывали 3 мкМ ДАФИ в течение 10 минут при комнатной температуре в темноте, а затем дважды промывали PBS. Клетки исследовали на предмет конденсации хроматина с помощью люминесцентной микроскопии, используя флюоресцентный фильтр (330-380 возбуждение; 30X увеличение). Подсчитывали общее количество и количество апоптических ядер. Во всех случаях приблизительно 600-1000 клеток было подсчитано оператором, неосведомленным о схеме эксперимента. Измерения отдельных культур выполняли дважды, а результаты выражали как средние значения со стандартной ошибкой среднего для указанного количества культур. Статистический анализ результатов проводили с использованием теста Крускала-Уоллиса с последующим использованием множественного критерия размаха выборки с наименьшей значимой разностью. Во всех случаях p-0,05 считали значимым.

С помощью данного теста повреждения глутаматом впервые показана

нейропротективная способность Основного Экстракта AFA, AFA-PC, его PCB и MAK. Как показано на Фигуре 18, добавление глутамата к культуре нейронных клеток увеличивало уровень апоптоза до $22,9\% \pm 3$ n = 4 (p<0,05), тогда как одновременное добавление Основного Экстракта AFA обеспечивало высокую защиту от токсичности глутамата, понижая уровень апоптоза ниже контрольного уровня ($6,3\% \pm 1$ p>0,05) уже при концентрации экстракта не более 1 нМ (приведены средние значения ± СОС от 3 до 8 различных культур клеток. # Значимо различный при сравнении с группой контроля (p<0,05); * Значимо различный при сравнении с глутаматом (контроль) (p<0,05). Что касается защиты, обеспечиваемой MAK, то MAK также понижают уровень апоптоза ниже уровня контроля, при более высокой концентрации 1 мкМ (Фигура 19), приведены средние значения ± СОС от 3 до 8 различных культур клеток. # Значимо различный при сравнении с группой контроля (p <0,05); * Значимо различный при сравнении с глутаматом (контроль) (p<0,05)). В отношении AFA-PC и PCB можно видеть, что уровень их ингибирования апоптоза довольно схож: их добавление к культуре клеток понижает степень апоптоза ниже контроля при концентрации приблизительно 10 нМ (Фигуры 20 и 21 - приведены средние значения ± СОС от 3 до 8 различных культур клеток. # Значимо различный при сравнении с контрольной группой (p<0,05); * Значимо различный при сравнении с глутаматом (контроль) (p<0,05)).

Степень ингибирования AFA-PC приблизительно равна степени ингибирования PCB.

Это несколько неожиданно, учитывая то, что PCB, возможно, является действующим началом AFA-PC и при очистке и, таким образом, при более высокой концентрации, должен быть значительно более эффективным, чем целая молекула, активным компонентом которой и является PCB. Тот факт, что PCB имеет фактически такую же эффективность, означает, что в целой молекуле PC присутствуют другие факторы, которые фактически могут быть еще более эффективными, чем сам PCB. Известно, что в составе молекулы PC, помимо C-PC и его хромофора PCB, присутствует PEC, который включает в качестве своих хромофоров и PCB, и PVB (фиковиолобилин). Поэтому можно предположить, что фактором, создающим существенное различие в эффективности между очищенным PCB и целым PC, является именно компонент PEC, в особенности его хромофор PVB, который, как предполагают, является очень сильным антиоксидантом.

В отношении нейропротекции, MAK, по-видимому, играют некоторую роль, однако значительно менее важную, чем PC и PCB. Впрочем, наиболее мощным нейропротектором очевидно является цельный экстракт AFA, который способен полностью ингибировать апоптоз клеток при концентрациях порядка всего лишь 1 нМ (наномоля). Это в 10 раз выше эффективности PC и PCB. Разумеется, это можно объяснить синергией многих различных антиоксидантных факторов, присутствующих в цельном экстракте AFA; и все же, так как из вышеизложенного можно видеть, что на настоящий момент AFA-фитохром возможна является наиболее мощным антиоксидантом, способным почти полностью ингибировать образование MDA (побочный продукт последних стадий перекисного окисления липидов) при концентрации всего лишь 16 наномолей, вероятно, что AFA-фитохром является наиболее важным фактором при объяснении более высокой эффективности Основного Экстракта. Таким образом, можно заключить, что AFA-фитохром, так же как и все и любые фитохромы, являются важными нейропротективными агентами.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou G. et al., *Platelet monoamine oxidase B and plasma β-phenylethylamine in Parkinson's disease*, in *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2001; 70:229-231, 229.
- 5
2. Ispida K. et al., *β-phenylethylamine stimulates striatal acetylcoline release through activation of the AMPA glutamatergic pathway*, in *Biol Pharm Bull* 2005 Sep.; 28(9):1626-9.
- 10
3. Barroso N., Rodriguez M., *Action of β-phenylethylamine and related amines on nigrostriatal dopamine neurotransmission*, in *European Journal of Pharmacology*, 297 (1996), 195-203, 200.
- 15
4. Dyck L.E., *Release of monoamines from striatal slices by phenelzine and β-phenylethylamine*, in *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1983, 7:797-800; Philips S.R., Robson A.M., *In vivo release of endogenous dopamine from rat caudate nucleus by phenylethylamine*, in *Neuropharmacology* 1983, 22:1297-1301; Raiteri m., et al., *Effect of sympathomimetic amines on the synaptosomal transport of noradrenaline, dopamine and 5-hydroxytryptamine*, in *Eur J Pharmacol* 1977, 41:133-143.
- 20
5. Janssen P.A.J, et al., *Does phenylethylamine act as an endogenous amphetamine in some patients?*, in *International Journal of Neuropsychopharmacology* 1999, 2: 229-240, 232.
- 25
6. Paterson I.A. et al., *2-phenylethylamine: a modulator of catecholamine transmission in the mammalian central nervous system?*, in *Journal of Neurochemistry* (1990), 55:1827-1837.
- 30
7. Sabelli H.C., Javaid I.J., *Phenylethylamine Modulation of Affect: Therapeutic and Diagnostic Implications*, in *Journal of Neuropsychiatry* (1995), 7(1):6-14, 7.
- 35
8. Mauro Federici et al., *Trace Amines Depress Gabab Response In*

45

50

Dopaminergic Neurons By Inhibiting Girk Channels, in Molecular Pharmacology Fast Forward. Published on January 11, 2005 as
 5 doi:10.1124/mol.104.007427.

9. Gusovsky F. et al., *A high pressure liquid chromatography method for plasma phenylacetic acid, a putative marker for depressive disorders*, in *Anal Biochem*, 1985 Feb. 15; 145(1):101-5. In this study, the depressed patients had a PAA level in the plasma of 327.64 +/- 45.44 ng/ml, against the 536.18 +/- 54.99 ng/ml. of the control group. In another study, in the urine of the 15 depressed patients was found an average PAA of 66 +/- 23 mg/die, against the 104 +/- 23 mg/die of non depressed patients. See Sabelli HC. et al., *Urinary phenylacetic acid in panic disorder with and without depression*, in 20 *Acta Psychiatr Scand* 1990 Jul;82(1):14-6.
10. Szabo A. et al., *Phenylethylamine, a possible link to the antidepressant effects of exercise?*, in *Br J Sports Med* 2001 Oct; 25 35(5):342-3.
11. Sabelli H et al., *Sustained antidepressant effect of PEA replacement*, in *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 8(2): 168-71.
12. Miura Y., *Plasma beta-phenylethylamine in Parkinson's disease*, in 30 *Kurume Med J* 2000;47(4):267-72.
13. *Ibid.*,
- 35 14. Ebadi M. et al., *Neuroprotective actions of selegiline*, in *J Neurosci Res* 2002 Feb 1;67(3):285-289.
15. Kemppainen N. et al., *Different pattern of reduction of striatal dopamine reuptake sites in Alzheimer's disease and ageing*, in *J Neural Transm* 2001;108(7):827-36.
- 40 45 16. Knoll J., *(-)Deprenyl (Selegiline): past, present and future*, in *Neurobiology (Bp)* 2000;8(2):179-99.
17. Knoll J., *The pharmacological basis of the beneficial effects of*

(-)-deprenyl (selegiline) in Parkinson's and Alzheimer's diseases, in J Neural Transm Suppl 1993;40:69-91.

- 5 18. Rimbau V., et al., *Protective effects of C-phycocyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus, in Neurosci Lett 1999 Dec 3;276(2):75-8.* In this study phycocyanins have been used from the microalga Spirulina. The phycocyanins from Klamath algae are different and endowed with a higher antioxidant activity. See Benedetti S., Scoglio S., Canestrari F., et al., *Antioxydant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga Aphanizomenon Flos Aquae, in Life Sciences, 75* 15 (2004): 2353-2362.
- 20 19. Swanson J. et al., *Cognitive neuroscience of attention deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder, in Curr Opin Neurobiol. 1998 Apr;8(2):263-71.*
- 25 20. Citazione solo di Benedetti et al. LifeScience; o menzione del parallelo brevetto? Attendere l'anno provisional in attesa di effettuare studi sulla neuroprotezione?
- 30 21. Kusaga A., *Decreased beta-phenylethylamine in urine of children with attention deficit hyperactivity disorder and autistic disorder, in No To Hattatsu 2002 May; 34(3):243-8; Matsuishi T, Yamashita Y., Neurochemical and neurotransmitter studies in patients with learning disabilities, in No To Hattatsu 1999 May;31(3):245-8.*
- 35 22. Kusaga A. et al., *Increased urine phenylethylamine after methylphenidate treatment in children with ADHD, in Ann Neurol 2002 Sep;52(3):372-4.*
- 40 23. Jain AK., Et al., *Bupropion SR vs. placebo for weight loss in obese patients with depressive symptoms, in Obes Res. 2002 Oct;10(10):1049-56.*
- 45 24. Rudolph et al., *A randomized, placebo-controlled, dose-response trial of venlafaxine hydrochloride in the treatment of major depression, in J Clin*

Psychiatry (1998); 59(3):116-22.

25. PEA is a lipid-soluble molecule quite subject to be damaged by heat.

5 This means that drying methods using high temperatures, such a freeze drying, usually have lower concentration of PEA. The highest content of PEA is found in the algae dried with the Refractance Window® method. It is from
10 this type of algae that the Basic Extract is realized.

26. Yamada M. et al., *Clinical Pharmacology of MAO Inhibitors: Safety and Future*, in *Neurotoxicology* 2004; 25:215-21; Youdim M., et al., *Therapeutic 15 Applications of Selective and Non-Selective Inhibitors of Monoamine Oxidase A and B that do not Cause Significant Tyramine Potentiation*, in *Neurotoxicology* 2004;25:243-50.

20. Groniger A et al., *Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae-a database*, in *J Photochem Photobiol B*. 2000 Nov;58(2-3):115-22.

25. Suh HJ et al., *Mycosporine glycine protects biological systems against photodynamic damage by quenching singlet oxygen with a high efficiency*, in *Photochem Photobiol*. 2003 Aug;78(2):109-13.

30. Groniger A et al., *Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae-a database*, in *J Photochem Photobiol B*. 2000 Nov;58(2-3):115-22.

35. Sinha RP et al., *Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation*, in *J Photochem Photobiol B*. 2001 Jul; 60(2-3):129-35.

40. Garcia-Pichel F et al., *Occurrence of UV-Absorbing, Mycosporine-Like Compounds among Cyanobacterial Isolates and an Estimate of Their Screening Capacity*, in *Appl Environ Microbiol*. 1993 Jan;59(1):163-169.

45. Glazer A.N., *Phycobiliproteins*, in *Methods Enzymol*, 1988, 167: 291-303.

33. Bhat V.B., et al., *C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro*, in *Biochem Biophys Res Commun.*, 2000; 275(1):20-25;
- 5 Romay, C. et al., *Antioxidant and antinflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae*, in *Inflamm Res*, 1998, Jan.; 47(1): 36-41.
- 10 Reddy C.M., et al., *Selective Inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin*, in *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 277(3): 599-603.
- 15 Gonzales R., et al., *Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid induced colitis in rats*, in *Pharmacol Res*, 1999; 39(1): 55-9.
36. Gonzales R., et al., *Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid induced colitis in rats*, in *Pharmacol Res*, 1999; 39(1): 55-9.
- 20 37. Vadiraja BB. et al., *Hepatoprotective effect of C-phycocyanin:protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats*, in *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 249(2):428-31.
38. Romay C., et al., *Phycocyanin extract reduces leukotriene B4 levels in arachidonic induced mouse-ear inflammation test*, in *J Pharm Pharmacol.* 1999, 51(5):641-42. Come è noto, il leucotriene B4 è uno dei fattori principalmente responsabili di patologie respiratorie quali asma e allergie.
- 30 39. Rimbau V., et al., *Protective effects of C-phycocyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus*, in *Neurosci Lett* 1999, 276(2):75-8.
- 40 40. Rimbau V. et al., *C-phycocyanin protects cerebellar granule cells from low potassium/serum deprivation-induced apoptosis*, in *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 364(2): 96-104.
41. Glazer A.N., *Phycobilisomes*, in *Methods Enzymol* 1988, 167:304-312.
- 45 42. Hirata T., et al., *Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from Spirulina platensis*, in *J Appl Phycol* 2000, 12:435-439.

43. Fuglistaller P., et al., *Isolation and characterization of phycoerythrocyanin and chromatic adptation of the thermophilic cyanobacterium Mastigocladus laminosus*, in *Arch Microbiol* 1981, 129:268-274.
- 5
44. Rimbau V., et al., *Protective effects of C-phycocyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus*, in *Neurosci Lett* 1999, 276(2):75-8.
- 10
45. The data in this table are drawn from the following studies: Magyar K.
15 et al., *Pharmacological aspects of (-)-deprenyl*, in *Curr Med Chem*, 2004 Aug, 11(15):2017-31; Hou et al., *Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition by active principles from Uncaria rhyncophylla*, in *Journal of Ethnopharmacology*
20 100 (2005) 216-220; Herraiz T, Chaparro C., *Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: β-carboline alkaloids act as potent and revesible inhibitors*, in *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326
25 (2005) 378-386; Kong LD et al., *Inihibition MAO-A and B by some plant-derived alkaloids, phenols and anthraquinones*, in *Journal of Ethnopharmacology* 91 (2004) 351-355.
- 30
46. Yoshida S. et al., *Fluorinated phenylcyclopropylamines. Part 3: Inhibition of monoamine oxidase A and B*, in *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12 (2004) 2645-2652.
- 35
47. Torres A. et al., *Porphyra-334, a potential natural source for UVA protective sunscreens*, in *Photochem. Photobiol. Sci.* 5 (2006) 432-435.
- 40
48. Hughes J, Lamarter T., *Prokaryotes and Phytochrome. The Connection to Chromophores and Signaling*, in *Plant Physiology*, December 1999, Vol. 121, pp. 1059-1068.
- 45
49. Garthwaite et al., *Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain*, in *Nature*. 1988 Nov 24;336(6197):385-8.
- 50
50. Delgado-Esteban M. et al., *D-Glucose prevents glutathione oxidation and mitochondrial damage after glutamate receptor stimulation in rat cortical primary neurone*, in *J Neurochem*. 2000 Oct;75(4):1618-24.

Формула изобретения

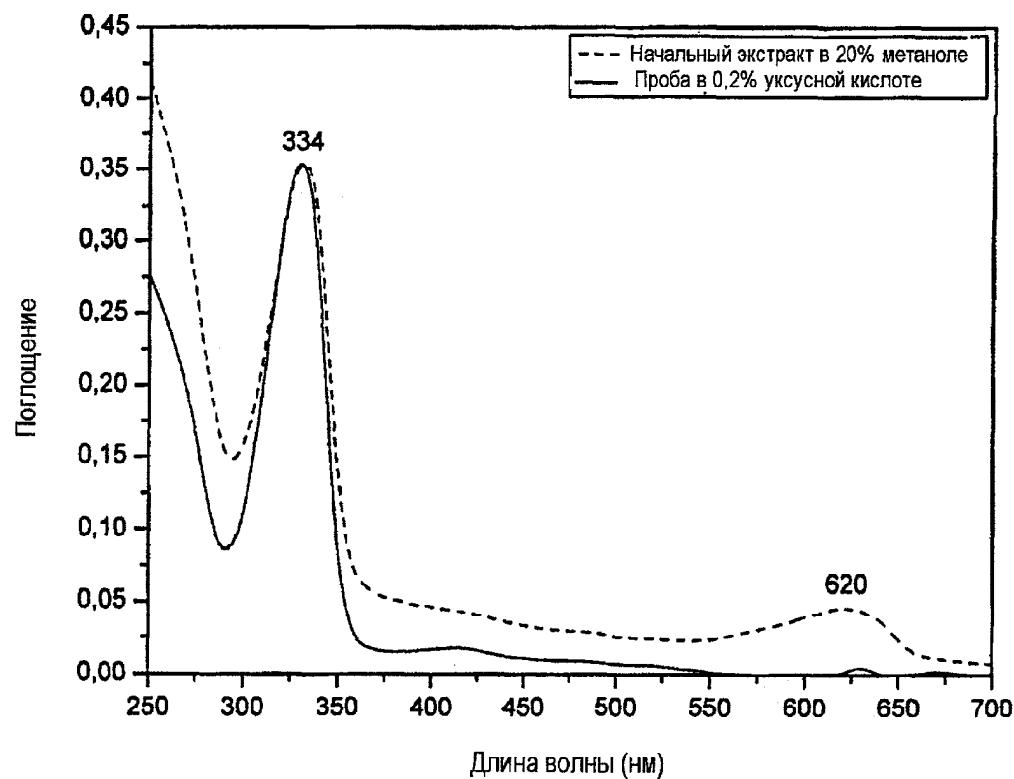
1. Применение экстракта микроводоросли *Aphanizomenon Flos Aquae* Ralfs ex Born. & Flah. Var. *flos aquae* (Кламатской водоросли АФА), где экстракт, содержащий следующие компоненты:
 - комплекс С-Фикоцианина/фикоэритроцианинов (С-PC/PEC), и отдельных хромофоров фикоцианобилина (PCB) и фиковиолобилина (PVB), АФА-фитохром и микоспорин-подобные аминокислоты (МАК), порфиры и шинорина, и
 - 10 фенилэтиламин (ФЭА)
 получают посредством следующих стадий:
 - a) замораживания свежесобранной водоросли АФА и ее размораживания или, если исходный материал является высушенным порошком АФА, обработки ультразвуком разбавленного в воде порошка АФА для разрушения клеток;
 - 15 b) центрифугирования продукта стадии а) для отделения супернатанта от осадка;
 - c) сбора супернатанта, содержащего водорастворимые компоненты, для производства композиции для профилактики, борьбы или лечения неврологического заболевания, состояния дисфункции или расстройства,
 выбранного из: болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, рассеянного склероза, синдрома дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ), аутизма, депрессии, дефицита памяти и аффективных расстройств.
- 20 2. Применение по п.1, где экстракт Кламатской водоросли АФА дополнительно очищен посредством ультрафильтрации указанного супернатанта с использованием ультрафильтрационной мембранны с пределом пропускания по молекулярной массе 30000 Да.
- 25 3. Применение по п.1, где экстракт Кламатской водоросли АФА включен в композицию с фармацевтически приемлемыми носителями или наполнителями.
- 30 4. Применение по п.1, где указанная композиция подходит для введения человеку.

35

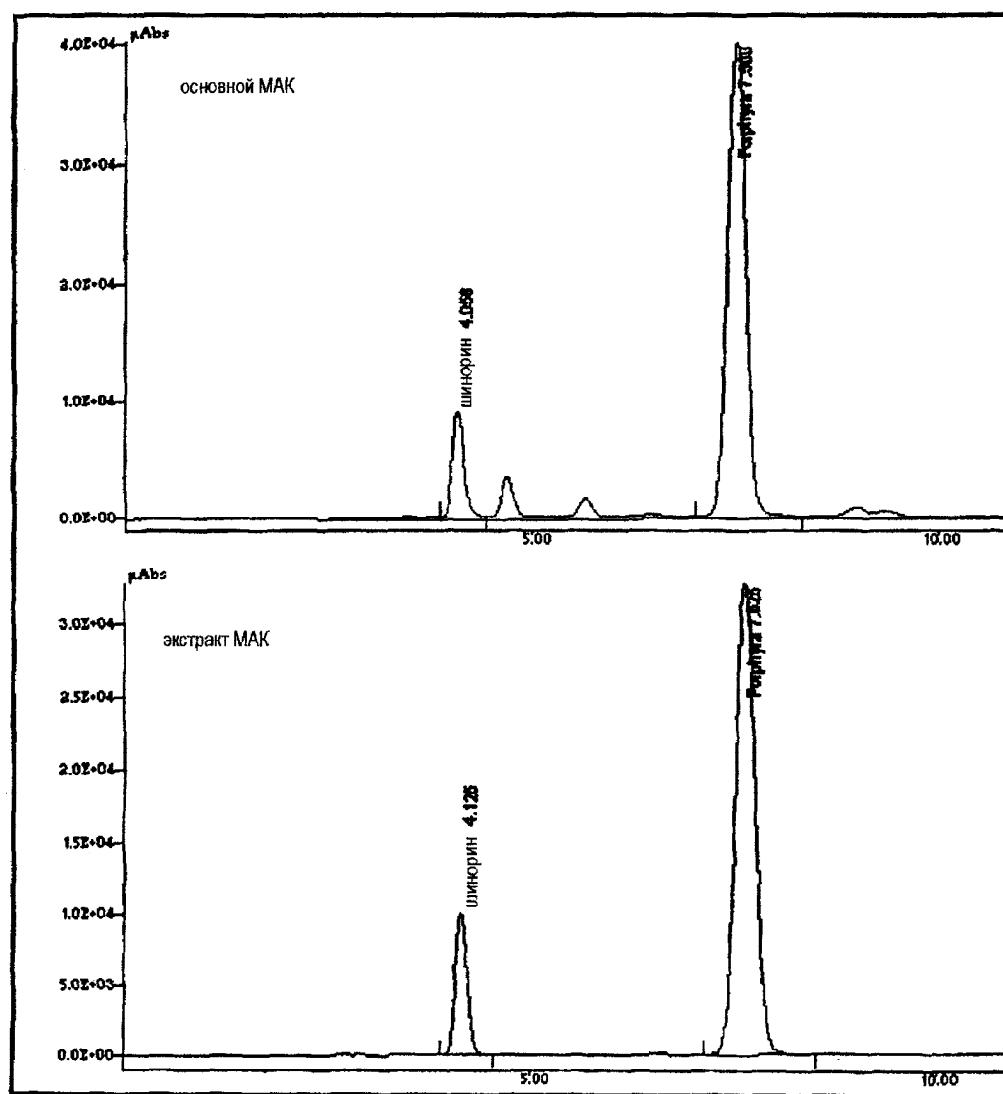
40

45

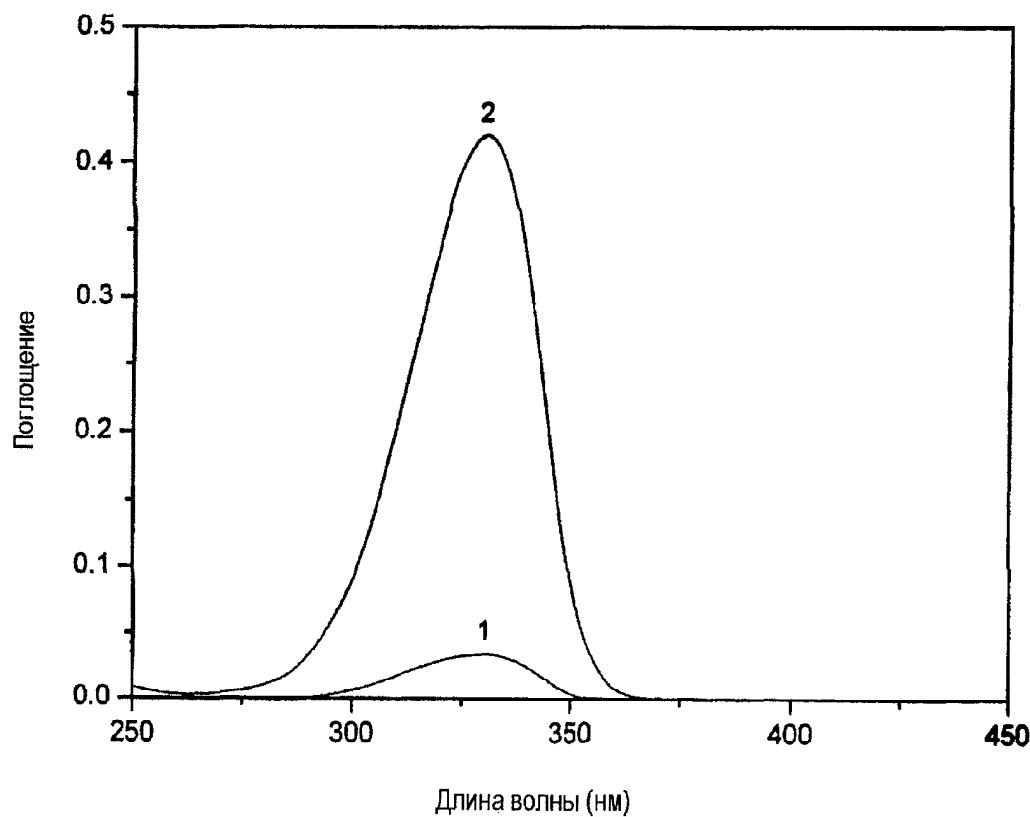
50



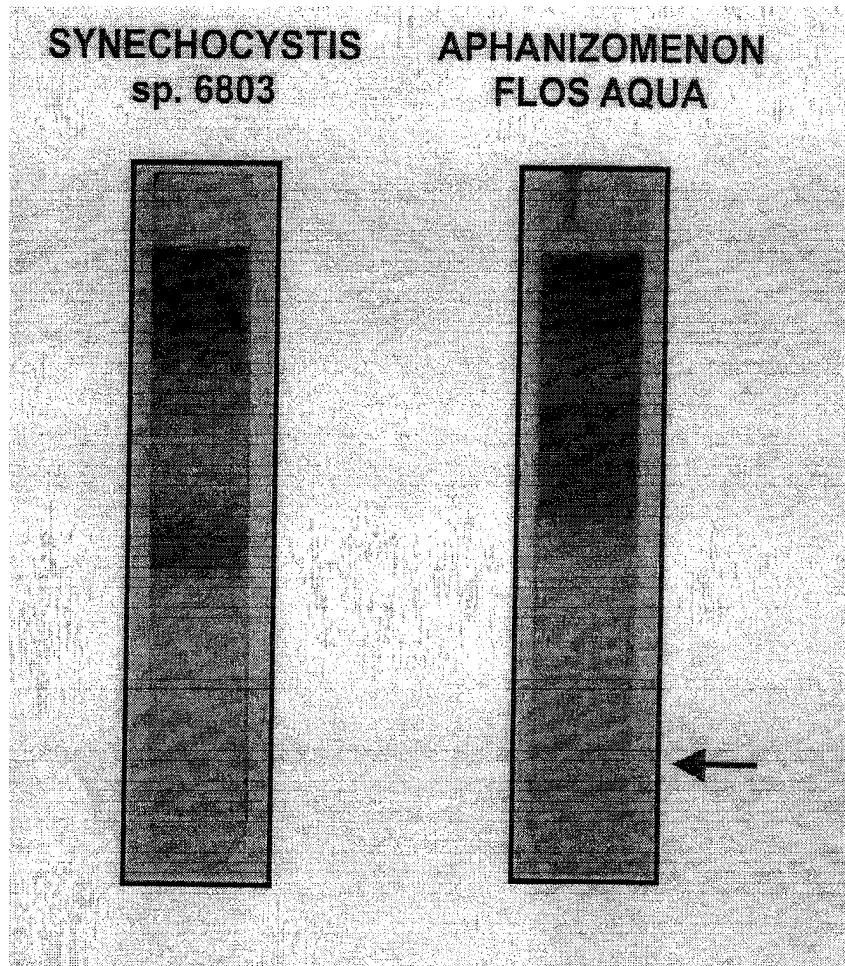
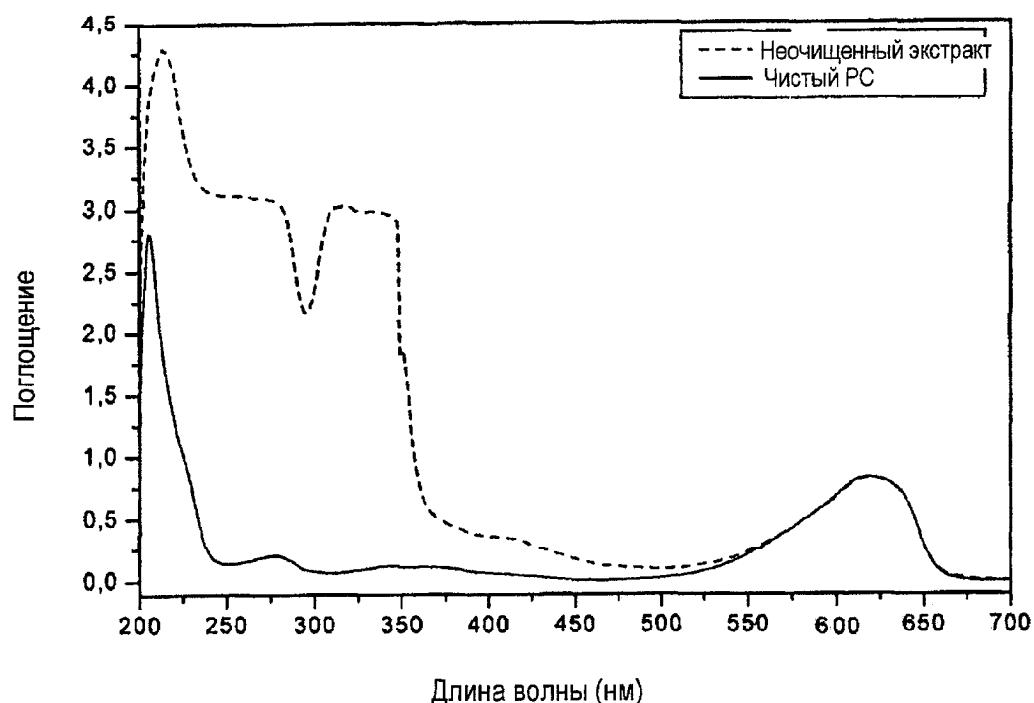
ФИГ.1

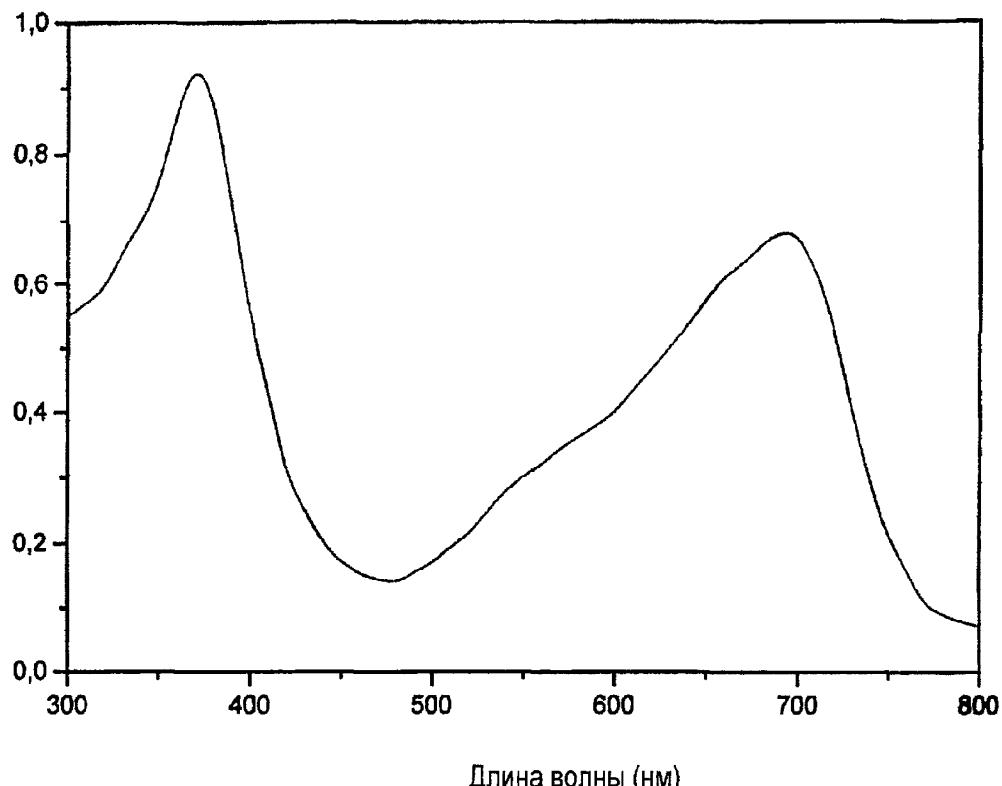


ФИГ.2

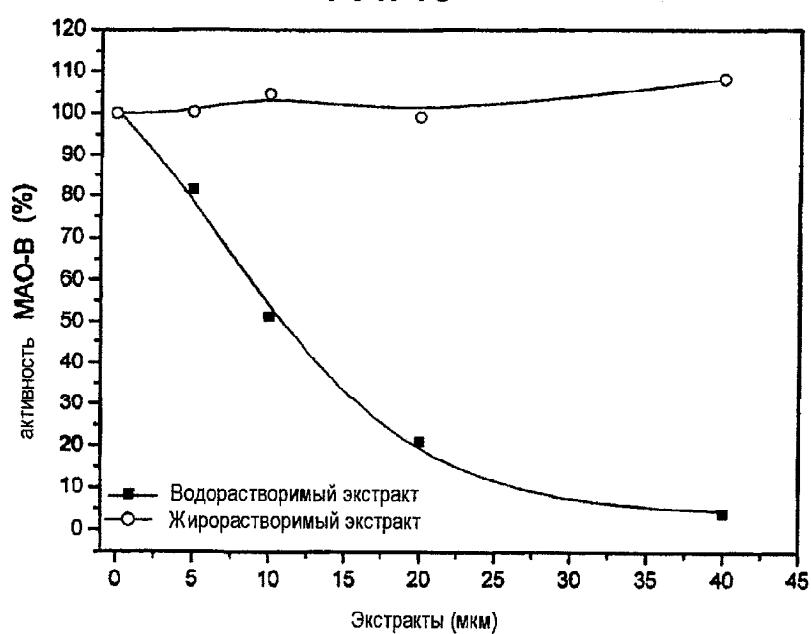


ФИГ.3

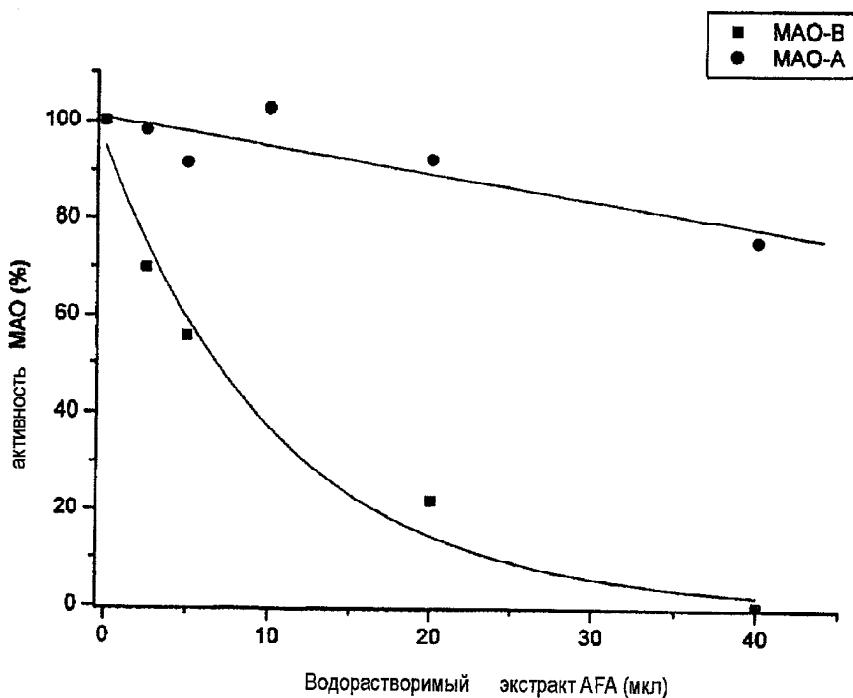
**ФИГ.4****ФИГ.5**



ФИГ.6

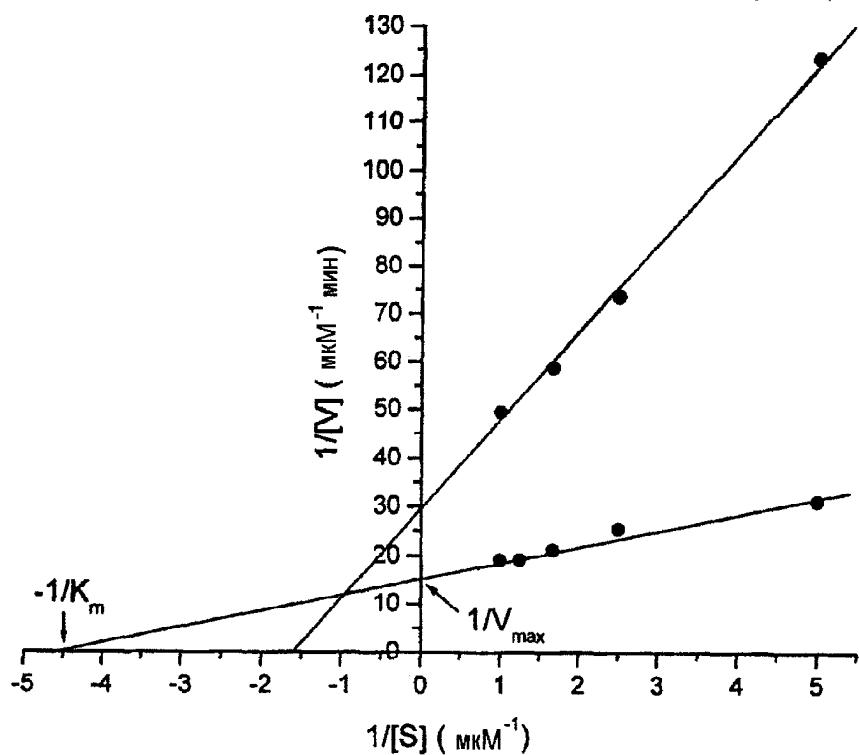


ФИГ.7А

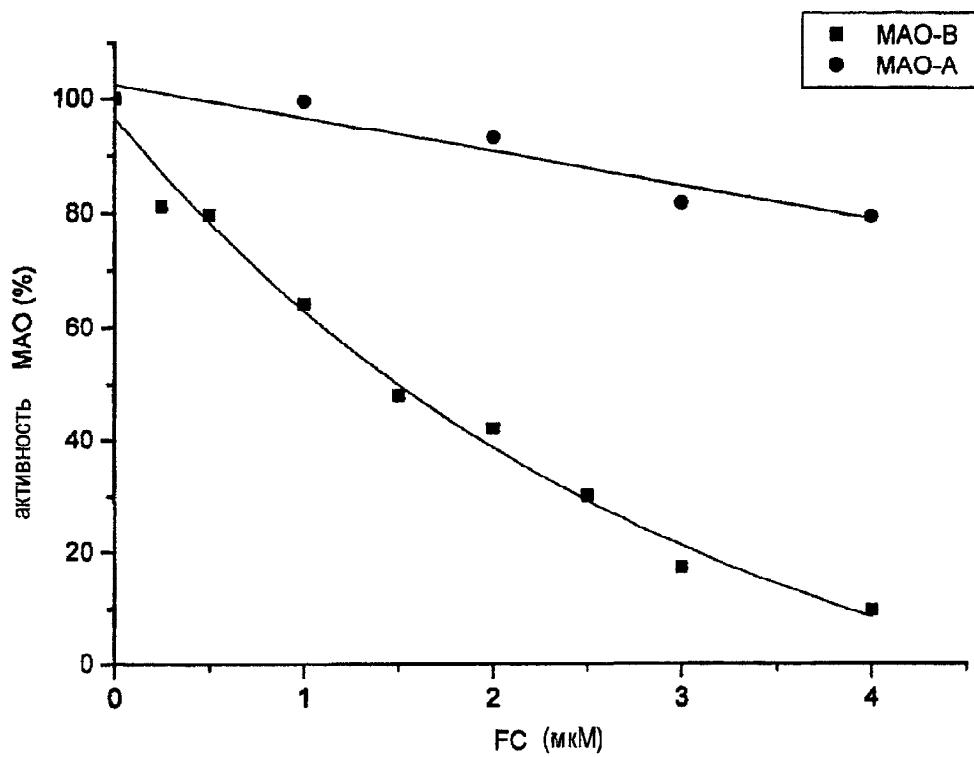


ФИГ.7В

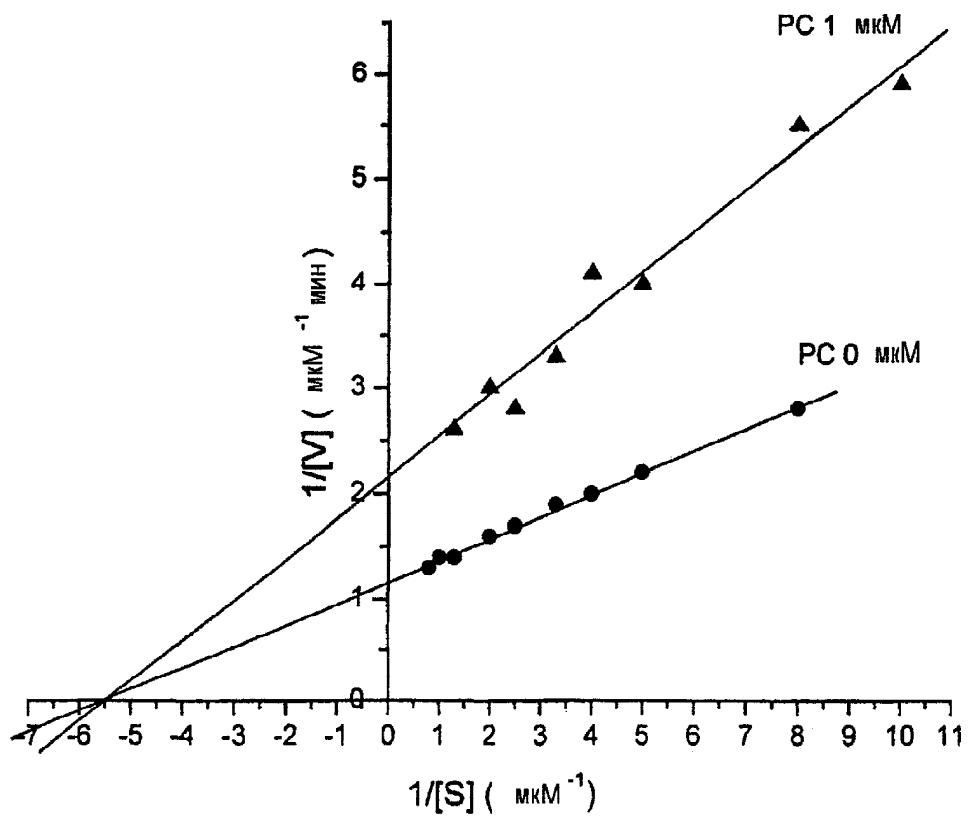
Водорастворимый экстракт 5 мкл



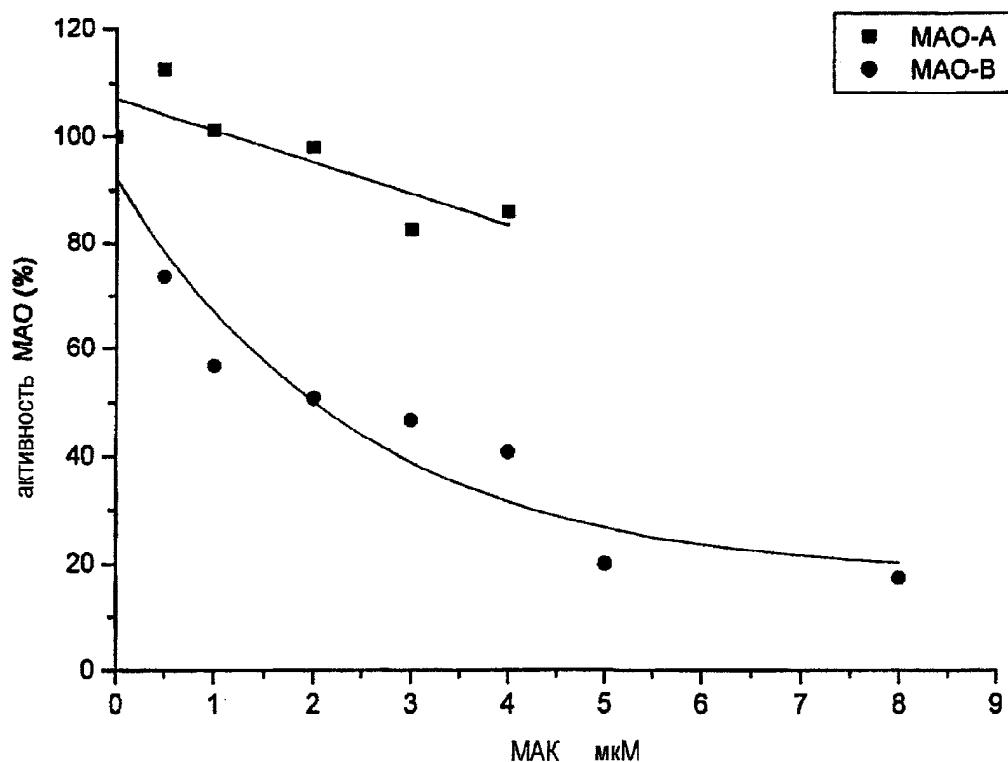
ФИГ.8



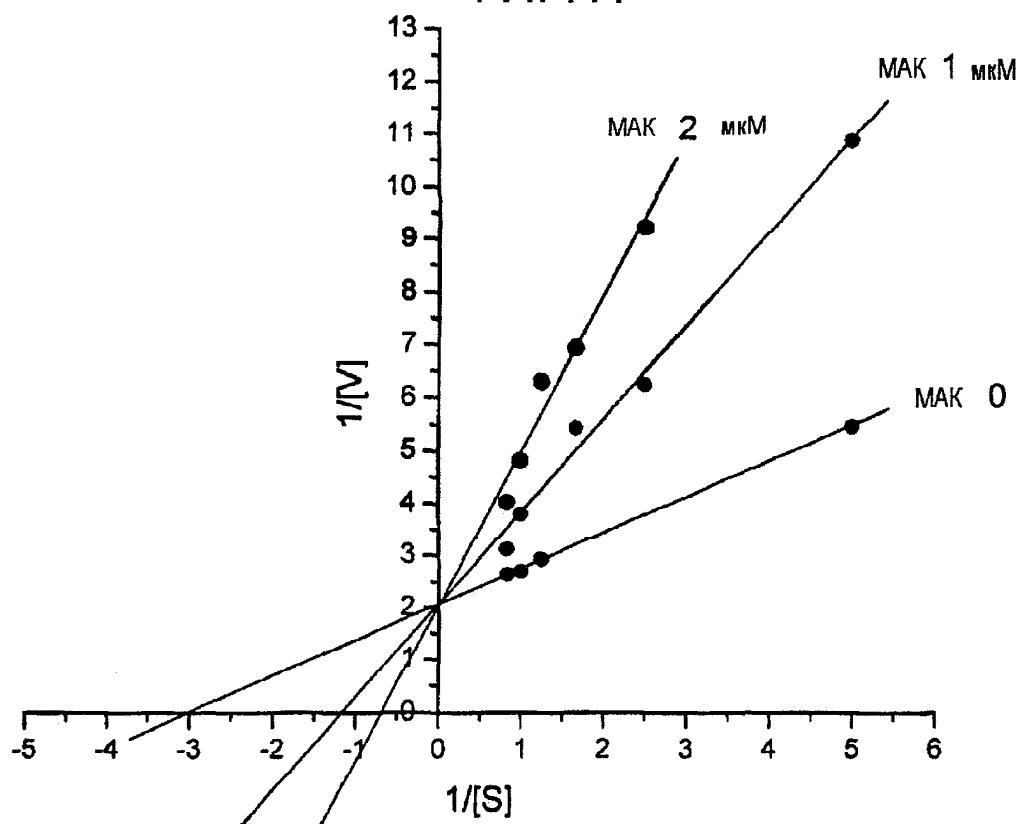
ФИГ.9



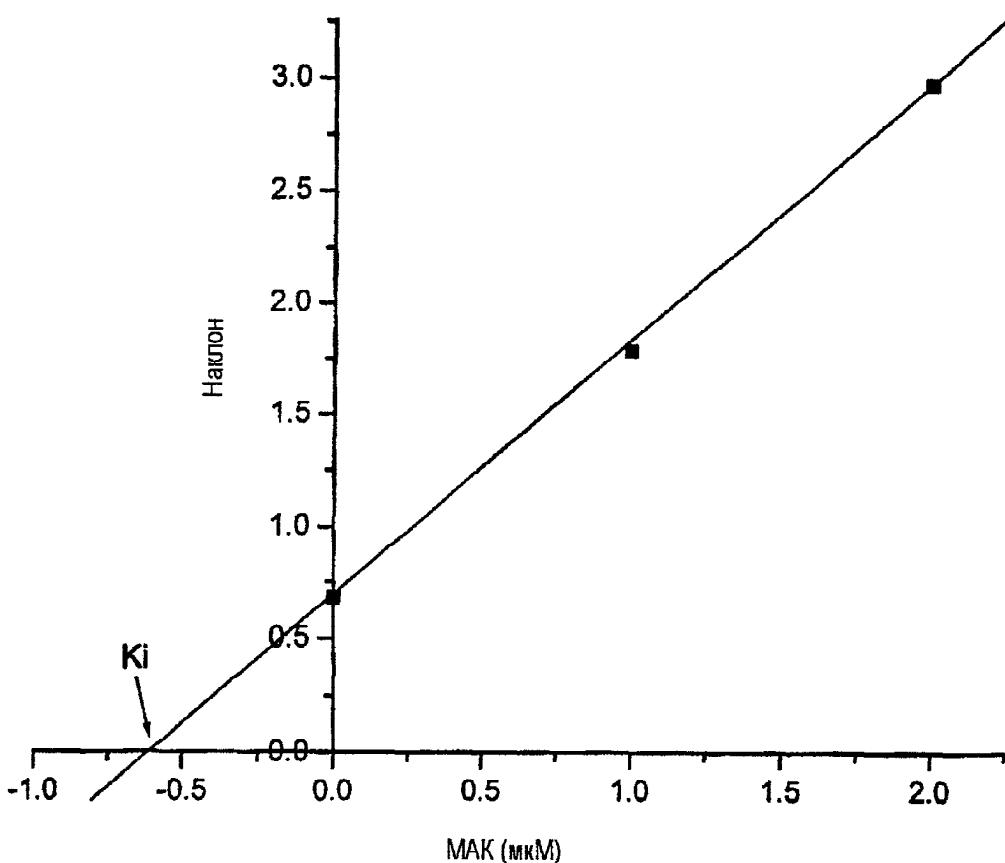
ФИГ.10



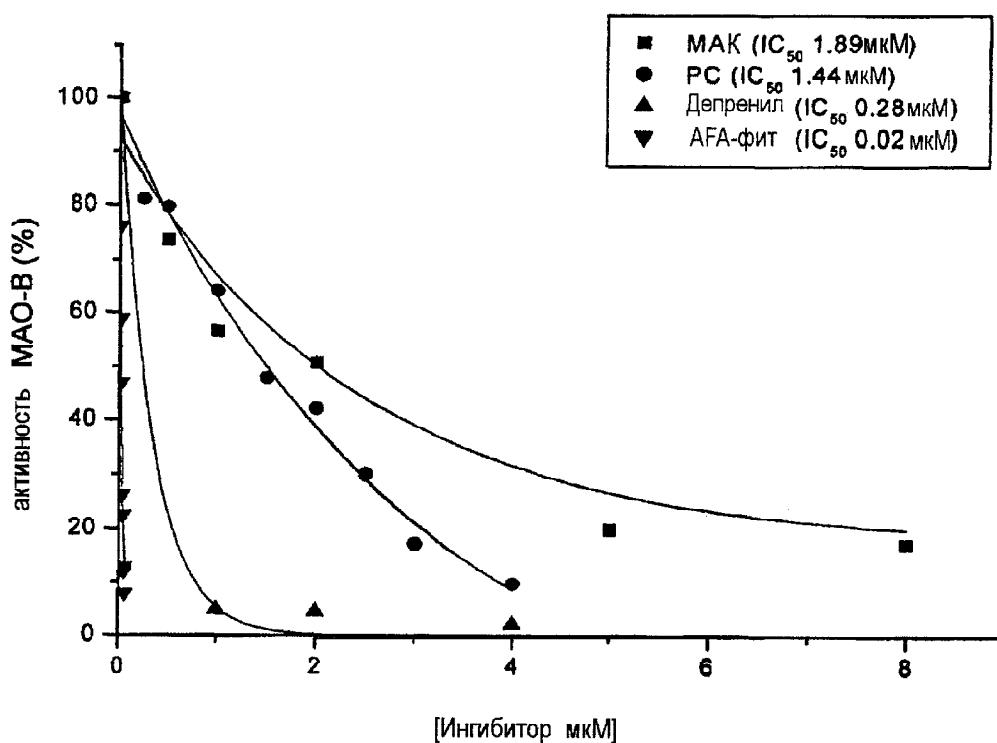
ФИГ.11



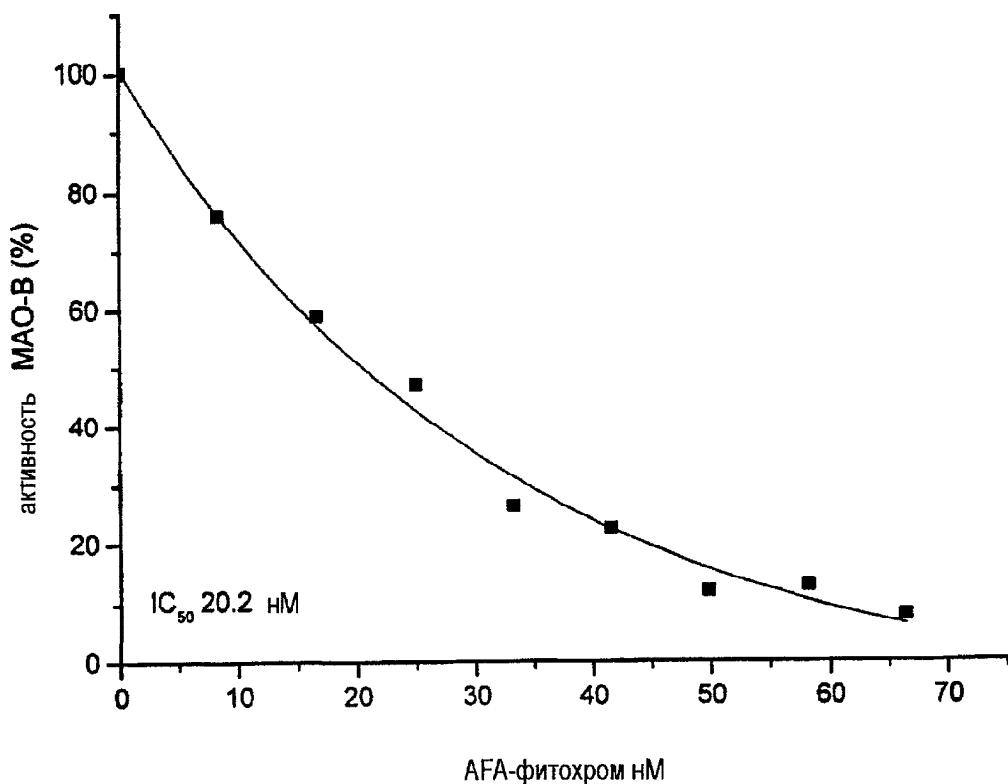
ФИГ.12



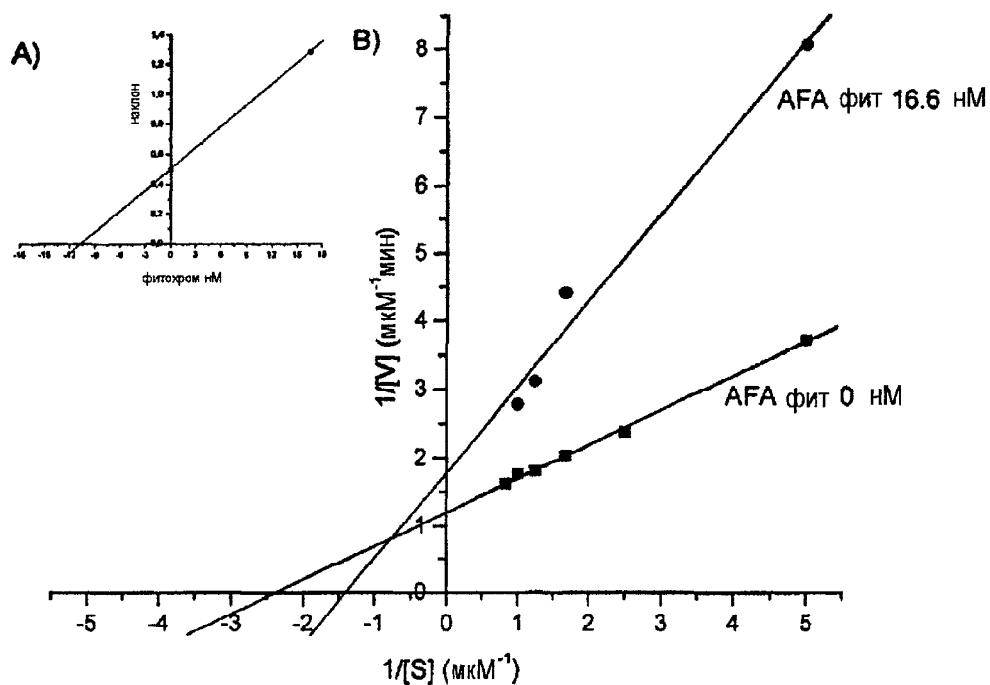
ФИГ.13



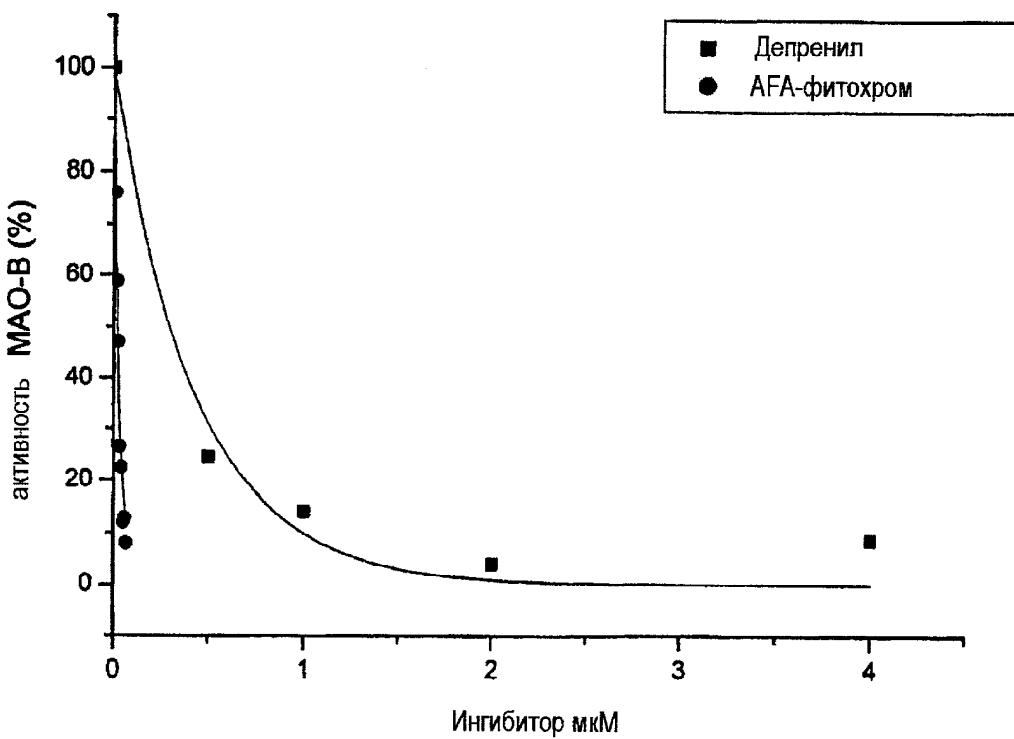
ФИГ.14



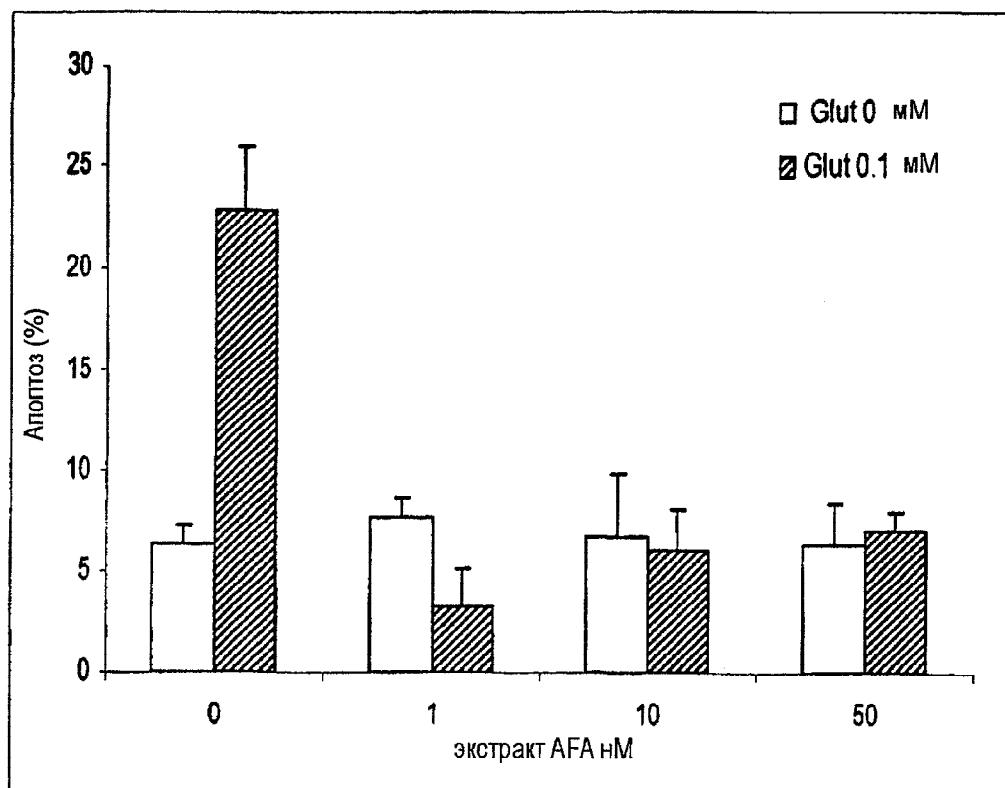
ФИГ.15



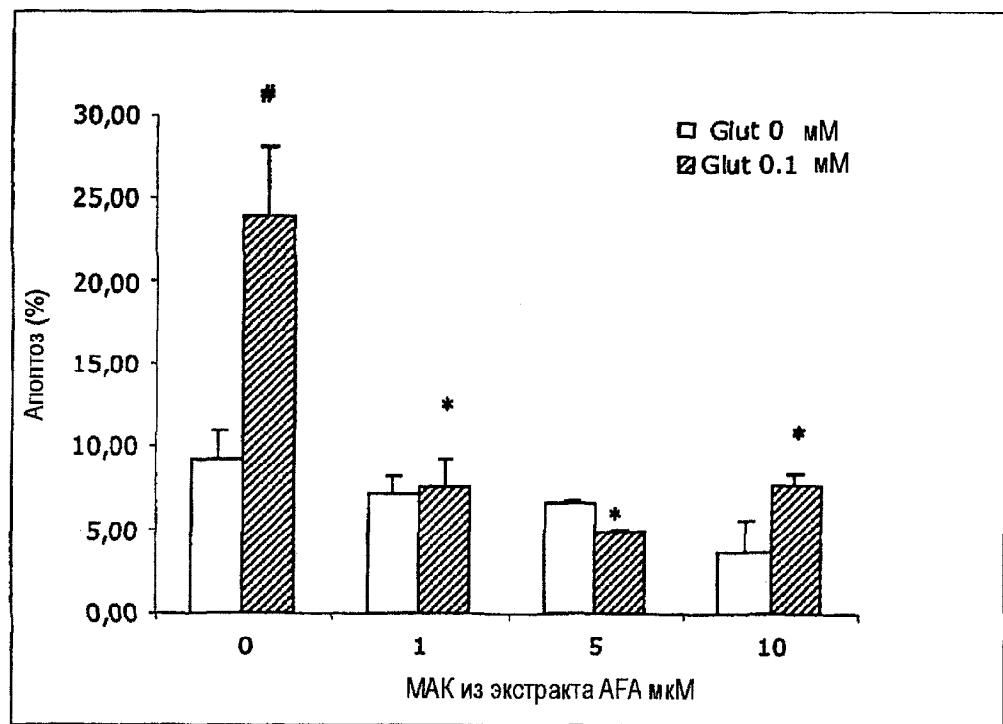
ФИГ.16



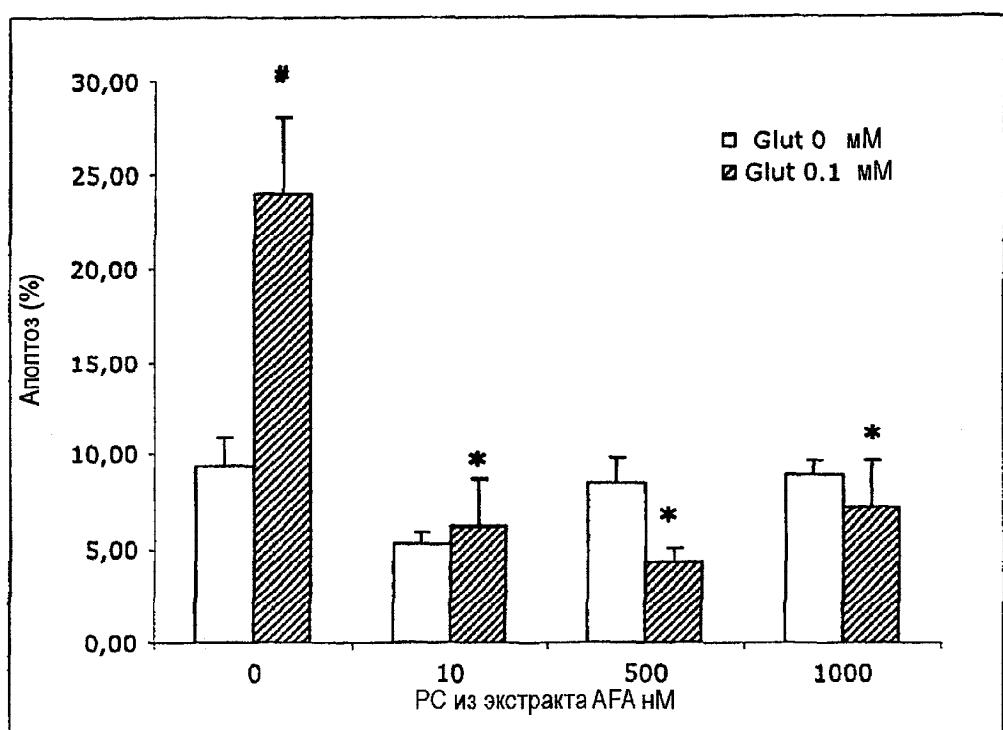
ФИГ.17



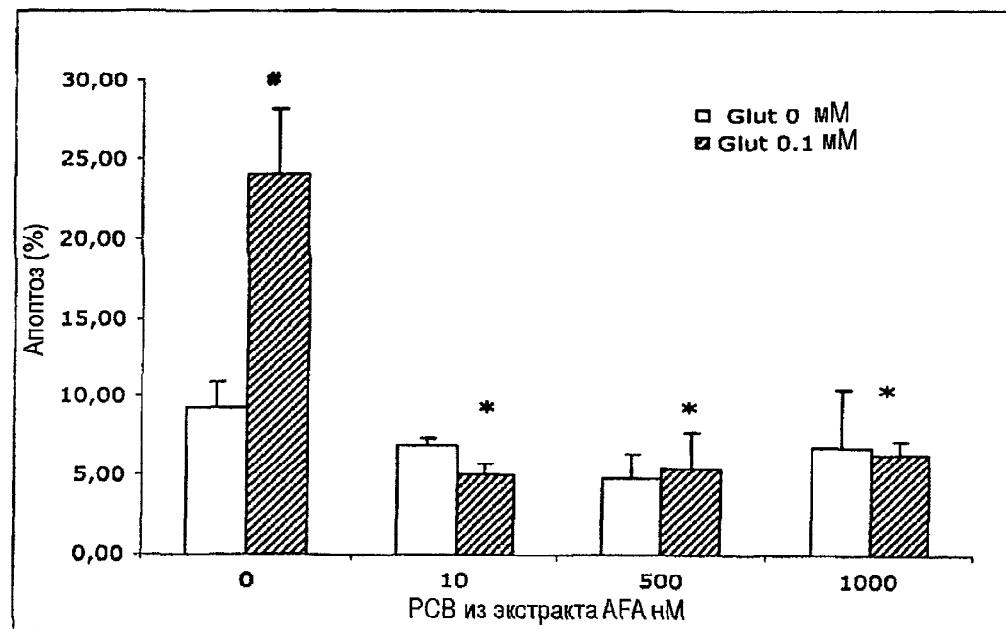
ФИГ.18



ФИГ.19



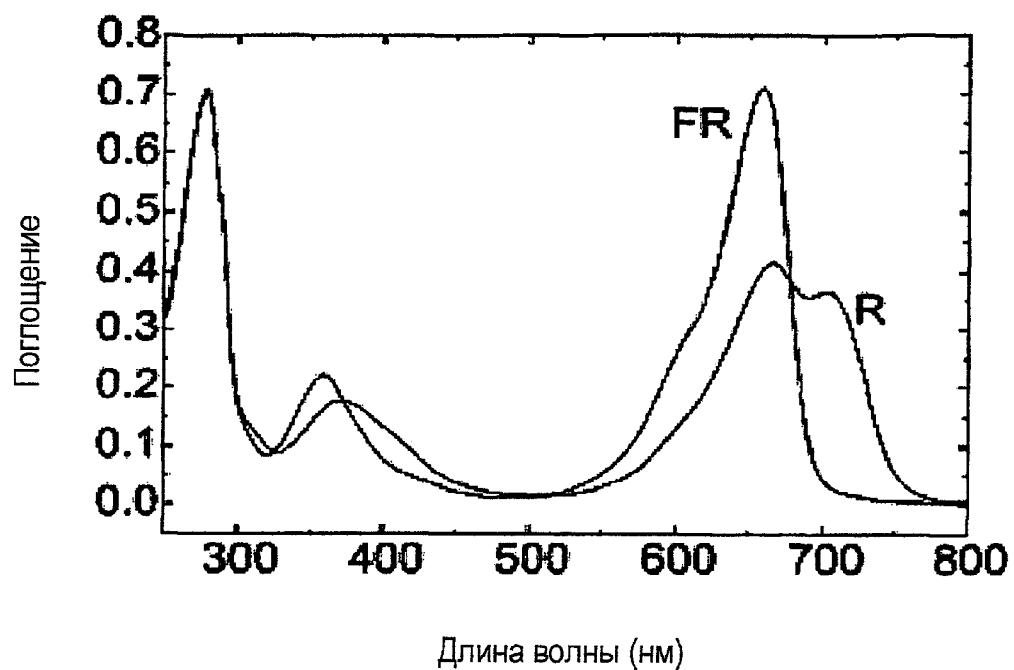
ФИГ.20



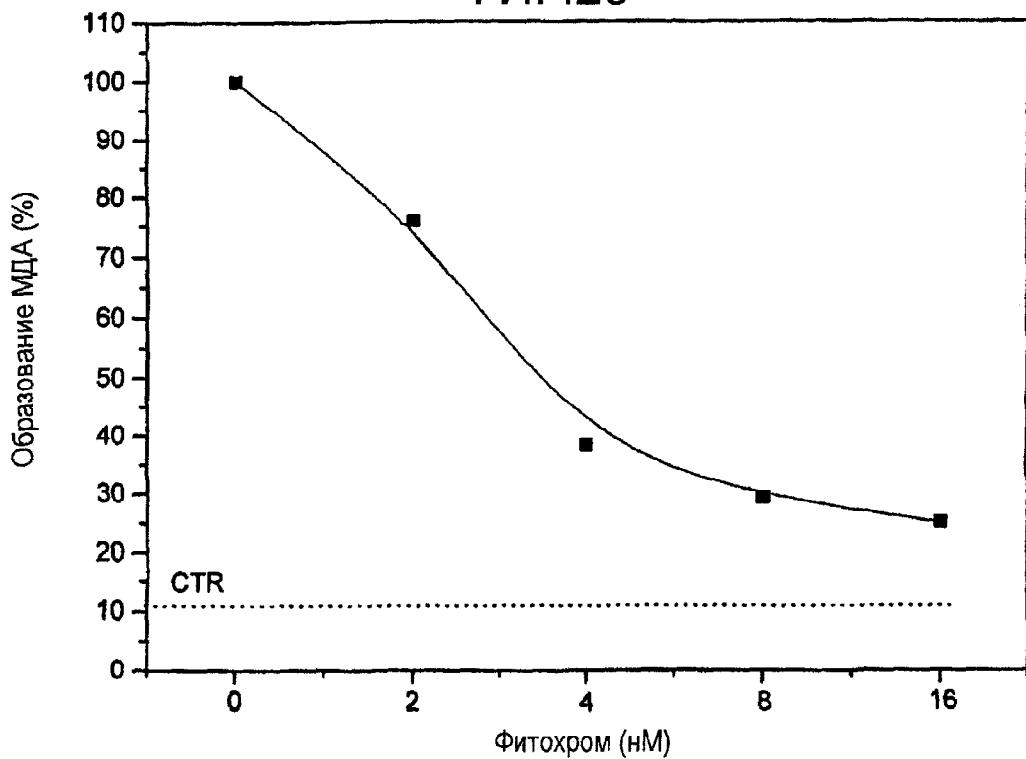
ФИГ.21



ФИГ.22



ФИГ.23



ФИГ.24