



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 35/62 (2020.08); *A61P 25/28* (2020.08); *A61P 43/00* (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2017118158, 02.11.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 02.11.2015

Дата регистрации:
 09.02.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 04.11.2014 JP 2014-223977

(43) Дата публикации заявки: 05.12.2018 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 09.02.2021 Бюл. № 4

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 05.06.2017

(86) Заявка РСТ:
 JP 2015/080934 (02.11.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2016/072392 (12.05.2016)

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

(72) Автор(ы):

ИСИИ Йоити (JP),
 НЕМОТО Такаюки (JP),
 ОКАМОТО Такеси (JP)

(73) Патентообладатель(и):
 ВЕЛЛ СТОУН КО. (JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: EP 0383533 A1, 22.08.1990. CN
 103550537 A, 05.02.2014. JP 59216572 A,
 06.12.1984. JP 2013032308 A, 14.02.2013. RU
 2177784 C2, 10.01.2001. YAMAJI AKIKO et al.
 Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding
 protein// JOURNAL OF BIOLOGICAL
 CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR
 BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR
 BIOLOGY, (19980227), vol. 273, N. 9, p. 5300 -
 5306.

(54) СРЕДСТВО, СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ПРОДУКЦИЮ ТАУ-БЕЛКА, И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ИЛИ
 ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО И ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ИЛИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ
 ПИЩЕВАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ,
 ВЫЗВАННЫХ ДЕФИЦИТОМ ТАУ-БЕЛКА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к
 фармацевтической промышленности, а именно:
 к способу получения средства, стимулирующего
 продукцию тау-белка, к способу получения
 терапевтического или профилактического
 средства и композиции для лечения или
 профилактики заболевания, вызванного
 дефицитом тау-белка, к терапевтическому или
 профилактическому средству и композиции для

лечения или профилактики заболевания,
 вызванного дефицитом тау-белка, к способу
 стимуляции продукции тау-белка в клетке, к
 применению сухого порошка экстракта красного
 дождевого червя *Lumbricus rubellus* и к способу
 лечения или профилактики заболевания,
 вызванного дефицитом тау-белка.
 Вышеописанная группа позволяет уменьшить
 симптомы заболеваний, вызванные дефицитом

R U 2 7 4 2 6 5 8 C 2

тау-белка, при использование натурального продукта в качестве активного вещества. 8 н. и 2

з.п. ф-лы, 9 ил., 1 пр.

R U 2 7 4 2 6 5 8 C 2

RUSSIAN FEDERATION



(19)

RU

(11)

2 742 658⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.
A61K 35/62 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 35/62 (2020.08); *A61P 25/28* (2020.08); *A61P 43/00* (2020.08)

(21)(22) Application: 2017118158, 02.11.2015

(24) Effective date for property rights:
02.11.2015

Registration date:
09.02.2021

Priority:

(30) Convention priority:
04.11.2014 JP 2014-223977

(43) Application published: 05.12.2018 Bull. № 34

(45) Date of publication: 09.02.2021 Bull. № 4

(85) Commencement of national phase: 05.06.2017

(86) PCT application:
JP 2015/080934 (02.11.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/072392 (12.05.2016)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

ISHII Yoichi (JP),
NEMOTO Takayuki (JP),
OKAMOTO Takeshi (JP)

(73) Proprietor(s):

WELL STONE CO. (JP)

**C 2
8 5 8
2 6 5 8
2 4 2 6 5 8
R U**

**R U
2 7 4 2 6 5 8
C 2**

(54) TAU PROTEIN STIMULATING AGENT AND A THERAPEUTIC OR PREVENTIVE AGENT AND A THERAPEUTIC OR PREVENTIVE FOOD COMPOSITION FOR TREATING DISEASES CAUSED BY DEFICIENCY OF TAU PROTEIN

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceutical industry.

SUBSTANCE: group of inventions relates to a method for producing an agent stimulating tau protein production, to a method of producing a therapeutic or prophylactic agent and a composition for treating or preventing a disease caused by deficiency of tau protein, to a therapeutic or prophylactic agent and a composition for treating or preventing a disease caused by deficiency of tau protein, to a method for stimulating tau protein

production in a cell, to application of dry powder of *Lumbricus rubellus* red earthworm extract and to method of treatment or prevention of disease caused by deficiency of tau-protein.

EFFECT: above described group enables reducing symptoms of diseases caused by deficiency of tau protein when using a natural product as an active substance.

10 cl, 9 dwg, 1 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение предлагает: средство, стимулирующее продукцию тау-белка; терапевтическое или профилактическое средство для лечения заболевания, вызванного дефицитом тау-белка; и пищевую композицию для лечения или профилактики 5 заболевания, вызванного дефицитом тау-белка.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Тау-белки относятся к типу белков, ассоциированных с микротрубочками. В особенно большом количестве тау-белки присутствуют в нейронах центральной нервной системы и функционируют путем связывания с белком, называемым тубулином, который является 10 основной составляющей частью компонента цитоскелета, микротрубочек, стабилизируя микротрубочки и стимулируя сборку тубулина в микротрубочки. Известно, что помимо тубулина тау-белки также ассоциируются с другими сигнальными молекулами (семейство Src, PI3K, Fyn) и стимулируют рост нейритов и удлинение конусов роста нервов (см., например, непатентные документы 1-3).

15 *In vivo* может наблюдаться повышенное фосфорилирование тау-белков. Повышенное фосфорилирование тау-белков приводит к ингибированию их связывания с тубулином, в результате чего уменьшается число микротрубочек, или происходит дестабилизация микротрубочек и подавление транспорта внутриклеточных веществ (см., например, непатентные документы 4 и 5). Повышенное фосфорилирование сопровождается 20 агрегацией тау-белков с образованием агрегатов, называемых нейрофибрillaryные клубки. Болезнь Альцгеймера и прогрессирующий надъядерный паралич, связанные с образованием нейрофибрillaryных клубков, классифицируют как нейродегенеративные заболевания, называемые таупатия.

Существуют способы лечения таупатии путем компенсации функций тау-белков.

25 Например, в патенте США № 5580898 предлагают использовать паклитаксел [TAXOL (зарегистрированное торговое наименование)] для лечения у пациентов болезни Альцгеймера посредством стабилизации микротрубочек. Кроме того, в патентном документе 1 описан эффективный терапевтический способ лечения таупатии с использованием стабилизатора микротрубочек, эпотилона D.

30 Между тем, преимущественно в восточных странах, с древних времен используют экстракти дождевого червя и сухой порошок из дождевого червя в качестве профилактических и терапевтических средств для лечения разных заболеваний, причем их известные примеры включают в себя средства, уменьшающие количество камней в мочевом пузыре, средства, стимулирующие выведение камней из мочевого пузыря, 35 терапевтические средства от желтухи, утеротоники, тонизирующие вещества, средства, стимулирующие рост волос, афродизиатические средства, антидиуретики, терапевтические средства от судорог, средства, усиливающие кровообращение, терапевтические средства от гемиплегии, непрямые обезболивающие средства, диуретики, противоастматические средства и антигипертензивные средства.

40 Однако отсутствуют публикации по применению дождевых червей для профилактики и лечения таупатии, такой как болезнь Альцгеймера.

Документы предшествующего уровня техники

Патентный документ

Патентный документ 1: Публикация не прошедшей экспертизы патентной заявки

45 Японии (перевод заявки РСТ) № 2011-522782

Непатентные документы

Непатентный документ 1: Lee, G. Biochimica et Biophysica Acta (2005) 1739: 323-330

Непатентный документ 2: Reynolds, CH et al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL

CHEMISTRY (2008) 283: 18177-18186

Непатентный документ 3: Nemoto, T et al., Neurochemistry International (2011) 59: 880-888

Непатентный документ 4: Bramblett GT, et al., Neuron (1993) 10: 1089-1099

Непатентный документ 5: Yoshida H, et al., J Neurochem (1993) 61: 1183-86

5 СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**ПРОБЛЕМЫ, РЕШАЕМЫЕ ИЗОБРЕТЕНИЕМ**

Предполагается, что лечение таупатии, такой как болезнь Альцгеймера, включает в себя введение лекарственного средства в течение длительного времени; таким образом, существует особая потребность в лекарственном средстве, которое является безопасным

10 и обладает незначительными побочными эффектами, и, следовательно, существует потребность в природном профилактическом или терапевтическом средстве, которое компенсирует функции тау-белка, обычно не функционирующего вследствие фосфорилирования.

С учетом вышесказанного, целью настоящего изобретения является получение:

15 средства, стимулирующего продукцию тау-белка, содержащего природный продукт в качестве активного ингредиента; профилактического или терапевтического средства против заболеваний, вызванных дефицитом тау-белка; а также пищевой композиции и фармацевтической композиции для улучшения симптомов заболеваний, вызванных дефицитом тау-белка.

20 СПОСОБЫ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМ

Средство настоящего изобретения, стимулирующее продукцию тау-белка, отличается тем, что оно содержит в качестве активного ингредиента сухой порошок, продукт измельчения и/или экстракт дождевого червя.

25 Терапевтическое или профилактическое средство настоящего изобретения для лечения заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, отличается тем, что оно содержит указанное выше средство, стимулирующее продукцию тау-белка.

30 Терапевтическая или профилактическая пищевая композиция настоящего изобретения, предназначенная для лечения заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, отличается тем, что она содержит указанное выше средство, стимулирующее продукцию тау-белка.

Заболевание, вызванное дефицитом тау-белка, упоминающееся в термине "терапевтическое или профилактическое средство настоящего изобретения для лечения заболевания, вызванного дефицитом тау-белка", предпочтительно представляет собой болезнь Альцгеймера.

35 Заболевание, вызванное дефицитом тау-белка, упоминающееся в термине "терапевтическая или профилактическая пищевая композиция для лечения заболевания, вызванного дефицитом тау-белка настоящего изобретения, предпочтительно представляет собой болезнь Альцгеймера.

Способ получения средства настоящего изобретения, стимулирующего продукцию тау-белка, включает в себя применение сухого порошка, продукта измельчения или экстракта дождевого червя.

40 Способ получения терапевтического или профилактического средства настоящего изобретения для лечения заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, включает применение сухого порошка, продукта измельчения или экстракта дождевого червя.

45 Способ получения терапевтической или профилактической пищевой композиции настоящего изобретения для лечения заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, включает в себя применение сухого порошка, продукта измельчения или экстракта дождевого червя.

Способ стимуляции продукции тау-белка настоящего изобретения включает в себя применение сухого порошка, продукта измельчения и/или экстракта дождевого червя.

Сухой порошок, продукт измельчения или экстракт дождевого червя настоящего изобретения используют для лечения заболевания, вызванного дефицитом тау-белка.

Способ настоящего изобретения, предназначенный для лечения или профилактики заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, включает в себя введение сухого порошка, продукта измельчения и/или экстракта дождевого червя индивидууму в эффективной дозе.

ЭФФЕКТЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предлагает средство, стимулирующее продукцию тау-белка, содержащее природный продукт в качестве активного ингредиента, профилактическое или терапевтическое средство для лечения заболеваний, вызванных дефицитом тау-белка, а также пищевую композицию и фармацевтическую композицию для улучшения симптомов заболеваний, вызванных дефицитом тау-белка.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1 приведены фотографии, демонстрирующие результаты анализа методом вестерн-блоттинга, который проводят с целью определения изменения уровней тау-белка (Tau), Akt, GSK-3 β и β -актина, продуцируемых в нейронах гиппокампа крыс, в процессе культивирования в питательной среде, содержащей растворенный сухой порошок дождевого червя (48 часов, 37°C, концентрация растворенного сухого порошка дождевого червя: 100 нг/мл), а также изменения уровней фосфорилированных тау-белка (Tau), Akt и GSK-3 β (pTau, pAkt и pGSK-3 β , соответственно). В колонках, отмеченных символами "-" и "+", приведены результаты культивирования нейронов гиппокампа крыс в питательной среде NM5 и в питательной среде, полученной путем растворения сухого порошка дождевого червя в питательной среде NM5 (100 нг/мл), соответственно. Отмечено, что тау-белок, Akt и GSK-3 β анализируют, используя в качестве показателя фосфорилирования Ser396, Ser473 и Ser9, соответственно.

На фиг. 2 приведены графики, демонстрирующие концентрации тау-белка (Tau), Akt и GSK-3 β , а также концентрации фосфорилированных тау-белка (pTau), Akt (pAkt) и GSK-3 β (pGSK-3 β), определенные на основе результатов анализов методом вестерн-блоттинга, показанных на фиг. 1, с помощью программного обеспечения ImageJ64. На фиг. 2А слева показаны концентрации pTau и тау-белка по отношению к β -актину, а также отношение pTau к тау-белку; на фиг. 2В слева показаны концентрации pAkt и Akt по отношению к β -актину, а также отношение pAkt к Akt; и на фиг. 2С слева показаны концентрации pGSK-3 β и GSK-3 β по отношению к β -актину, а также отношение pGSK-3 β к GSK-3 β .

На фиг. 3А приведены фотографии, демонстрирующие результаты анализа методом вестерн-блоттинга, который проводят с целью определения изменения уровней (Tau) и β -актина, продуцируемых в нейронах гиппокампа крыс, в процессе культивирования в питательной среде, содержащей растворенный сухой порошок дождевого червя (48 часов, 37°C), в зависимости от изменения концентрации растворенного сухого порошка дождевого червя; а на фиг. 3В приведен график, демонстрирующий изменение концентрации тау-белка, на основе β -актина, которое количественно определяют с помощью программного обеспечения для анализа результатов визуализации ImageJ64.

На фиг. 4А приведены фотографии, демонстрирующие результаты анализа методом вестерн-блоттинга, который проводят с целью определения изменения уровней (Tau) и β -актина, продуцируемых в нейронах гиппокампа крыс, в процессе культивирования в питательной среде, содержащей растворенный сухой порошок дождевого червя (37°C,

концентрация растворенного сухого порошка дождевого червя: 100 нг/мл) в зависимости от изменения времени культивирования; а на фиг. 4В приведен график, демонстрирующий изменение концентрации тау-белка, на основе β -актина, которое количественно определяют с помощью программного обеспечения для анализа результатов визуализации ImageJ64.

На фиг. 5 показаны результаты визуализации иммуноокрашивания флуоресцентной меткой тау-белка (Tau) и pTau в нейронах гиппокампа крыс, которые культивируют при 37°C в течение 48 часов в питательной среде NM5, или в питательной среде, полученной путем растворения сухого порошка дождевого червя в питательной среде NM5 (100 нг/мл). В верхнем ряду (None) показаны изображения, демонстрирующие флуоресценцию в нейронах гиппокампа крыс, культивированных в питательной среде, а в нижнем ряду (RW) показаны изображения, демонстрирующие флуоресценцию в нейронах гиппокампа крыс, культивированных в питательной среде, содержащей растворенный сухой порошок дождевого червя. В левой колонке показаны флуоресцентные изображения тау-белка; в центральной колонке показаны флуоресцентные изображения pTau; и в правой колонке показаны флуоресцентные изображения тау-белка и pTau.

СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В способе настоящего изобретения вид дождевого червя, используемого в качестве

сырьевого материала, специально не ограничивается, и подходящие для применения примеры дождевых червей включают в себя *Lumbricus rubellus*, *Lumbricus terrestris*, *Eisenia fetida*, *Allolobophora caliginosa*, *Dendrobaena octaedra*, *Allolobophora japonica* Michaelsen, *Drawida hattamimizu* Hatai, *Pheretima divergens* Michaelsen, *Pheretima communissima*, *Pheretima agrestis*, *Pheretima sieboldi* Horst, *Pheretima hilgendorfi*, *Pontodrilus matsushimensis* Iizuka, *Tubifex hattai* Nomura и *Limnodrilus gotoi* Hatai (= *L. Socialis* Stephenson).

В настоящем изобретении термин "сухой порошок" дождевого червя обозначает порошок, полученный путем высушивания продукта измельчения или экстракта необработанного или предварительно обработанного дождевого червя. Термин "продукт измельчения" дождевого червя относится к необработанному или предварительно обработанному дождевому черви, размолотому до жидкого или пастообразного состояния. Термин "экстракт" дождевого червя относится к экстракту, полученному путем растворения необработанного или предварительно обработанного дождевого червя или продукта его измельчения в воде или органическом растворителе с последующим удалением или отделением нерастворимых фракций. Способ предварительной обработки специально не ограничивается и его примеры включают в себя описанные ниже способы обработки, проводимые с целью удаления грязи и т.п. Кроме того, сухой порошок, продукт измельчения и экстракт дождевого червя можно подвергнуть последующей обработке, примеры которой включают в себя гранулирование, фильтрацию, очистку, концентрирование, разбавление и корректировку рН.

Метод размалывания, используемый для получения продукта измельчения дождевого червя, специально не ограничивается и может включать в себя, например, размалывание с помощью гомогенизатора, блендера, смесителя-гомогенизатора, мельницы или устройства для разрушения клеток при высоком давлении.

Способ экстракции, используемый для получения экстракта дождевого червя, специально не ограничивается и включает в себя, например, растворение сухого порошка или продукта измельчения дождевого червя в растворителе для экстракции (экстрагенте) с последующим удалением или отделением нерастворимых фракций. Примеры

экстрагента включают в себя воду, водные растворы и органические растворители, такие как этанол, ацетон и этилацетат, причем указанные растворители для экстракции можно использовать по отдельности, или в сочетании, содержащем два или более из указанных растворителей. Среди них особенно предпочтительными являются вода, 5 этанол и водный раствор этанола.

Метод сушки, используемый для получения высушенного препарата дождевого червя, специально не ограничивается и включает в себя, например, сушку из замороженного состояния, термическую сушку или сушку распылением. Среди данных методов сушка из замороженного состояния является предпочтительным методом по 10 указанным ниже причинам.

В настоящем изобретении сухой порошок, продукт измельчения или экстракт дождевого червя можно использовать в эффективном количестве, в зависимости от 15 цели применения. Соответствующее количество зависит от ряда факторов, таких как предполагаемая цель применения, способ и режим введения, способ получения сухого порошка дождевого червя и т.п.; однако при применении для профилактики заболеваний, вызванных дефицитом тау-белка, или для лечения легкого заболевания, эффективное количество предпочтительно составляет от 1 до 15000 мг/день, более предпочтительно от 12 до 1800 мг/день, еще более предпочтительно от 120 до 180 мг/день, в пересчете 20 на сухой порошок дождевого червя, полученный после удаления переваренных веществ, оставшихся в пищеварительном тракте дождевого червя, а также грязи и подобных веществ, прилипающих к коже дождевого червя, как описано ниже, путем размалывания дождевого червя и лиофилизации полученного продукта измельчения. При лечении 25 тяжелого заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, эффективное количество предпочтительно составляет от 1 до 15000 мг/день, более предпочтительно от 18 до 3600 мг/день, еще более предпочтительно от 180 до 360 мг/день.

Формы средства, стимулирующего продукцию тау-белка, терапевтического средства, профилактического средства и пищевой композиции настоящего изобретения специально не ограничиваются и могут включать в себя любые твердые формы, порошкообразные формы, полутвердые формы и жидкие формы.

30 В настоящем изобретении сухой порошок, продукт измельчения или экстракт дождевого червя можно использовать как есть. Альтернативно, в частности, средство, стимулирующее продукцию тау-белка, терапевтическое средство и профилактическое средство настоящего изобретения могут содержать фармацевтически приемлемый носитель, причем их можно вводить перорально или парентерально (например, путем 35 внутривенного введения или непосредственного введения в пораженный участок) в виде таблеток, гранул, порошков, капсул, мягких капсул, жидкостей, инъекционных средств, свечей, средств с замедленным высвобождением и т.п. В качестве фармацевтически приемлемого носителя можно использовать, например, наполнитель, связующее средство, дезинтегрирующее средство, ожикающее средство, скользящее 40 средство, покрывающее средство, суспендирующее средство, краситель, подслащающее средство или поверхности-активное вещество, и полученную смесь можно использовать для изготовления традиционной фармацевтической композиции с помощью известного метода. В состав такой композиции также могут входить другие терапевтические и профилактические компоненты и фармацевтически приемлемые 45 вспомогательные вещества.

В соответствии с настоящим изобретением, в частности, в состав средства, стимулирующего продукцию тау-белка и пищевой композиции настоящего изобретения может входить вспомогательное вещество (вспомогательные вещества), обычно

используемое для получения пищевых продуктов. Примеры подходящих для применения вспомогательных веществ включают в себя наполнитель, связующее средство, дезинтегрирующее средство, ожигающее средство, скользящее средство, покрывающее средство, супендирующее средство, краситель, подслащающее средство или

5 поверхностно-активное вещество, и полученную смесь можно использовать для изготовления традиционной фармацевтической композиции с помощью известного метода. В состав такой композиции также могут входить другие пищевые продукты или их компоненты.

В соответствии с настоящим изобретением, из сухого порошка, продукта измельчения

10 и экстракта дождевого червя, с точки зрения стабильности при хранении в процессе получения предпочтительным является сухой порошок дождевого червя. Сухой порошок дождевого червя можно предварительно растворить и/или диспергировать в жидкости, такой как вода, и затем полученный препарат можно смешать с другим компонентом (другими компонентами), примеры которых включают в себя традиционные носители 15 и вспомогательные средства, которые используют для получения фармацевтических и/или пищевых продуктов.

В соответствии с настоящим изобретением, заболевание, вызванное дефицитом тау-белка, специально не ограничивается; однако предпочтительно оно представляет собой таупатию, более предпочтительно, заболевание, выбранное из группы, включающей

20 в себя болезнь Альцгеймера, болезнь Пика, кортикоизменение дегенерацию, прогрессирующий надъядерный паралич, хроническую травматическую энцефалопатию, лобно-височную деменцию и паркинсонизм, связанный с хромосомой 17, комплекс Гуам паркинсонизм-деменция, сенильную деменцию с преобладанием 25 нейрофибрillaryных клубков, связанную с образованием нейрофибрillaryных клубков, подобных присутствующим при болезни Альцгеймера с отсутствием амилоидных бляшек, ганглиоглиому, ганглиоцитому, подострый склерозирующий панэнцефалит, туберозный склероз, болезнь Галлервортена-Шпатца, лобно-височную деменцию и лобно-височную лобарную дегенерацию. Заболевание, вызванное дефицитом тау-белка, предпочтительно представляет собой болезнь Альцгеймера.

30 При применении дождевого червя в качестве сырьевого материала для получения перорального препарата, предпочтительно удалить переваренные вещества, остающиеся в пищеварительном тракте дождевого червя, грязь, прилипшую к коже, и т. п. В настоящем изобретении, способ удаления таких веществ специально не ограничивается и включает в себя любые известные способы. Например, можно использовать способ, 35 заключающийся в том, чтобы заставить живого дождевого червя экскретировать желтую почву, содержащуюся в пищеварительном тракте, путем погружения дождевого червя в водный раствор соли щелочного металла, такой как соль натрия или соль калия (способ, описанный в публикациях не прошедших экспертизу патентных заявок Японии №№ H1-47718, H1-47719, H1-47720 и H1-268639), или способ, заключающийся в удалении 40 переваренной массы из пищеварительного тракта живого дождевого червя путем выдерживания живого дождевого червя в водном растворе кислоты при 6-26°C в течение 0,1-5 часов (способ, описанный в публикации не прошедшей экспертизу патентной заявки Японии № H3-72427).

45 Способ удаления, используемый в настоящем изобретении, предпочтительно включает в себя приведение дождевого червя в контакт с описанными ниже хлоридом металла или гидроксиарбоновой кислотой.

Хлорид металла представляет собой хлорид, по меньшей мере, одного металла, выбранного из группы, включающей в себя калий, натрий, магний и кальций. То есть,

хлорид металла представляет собой, по меньшей мере, одно соединение, выбранное из группы, включающей в себя хлорид калия, хлорид натрия, хлорид магния и хлорид кальция. Кроме того, хлорид металла может представлять собой смесь указанных хлоридов металлов, или смесь одного или нескольких из указанных хлоридов металлов

5 и другого безвредного компонента (компонентов), который можно добавлять к пищевым продуктам. Примеры таких смесей включают в себя пищевые соли, каменные соли и морские соли. Дождевого червя можно привести в контакт с хлоридом металла путем посыпания живого дождевого червя порошкообразным хлоридом металла.

После приведения хлорида металла в контакт с живым дождевым червем

10 предпочтительно привести дождевого червя в контакт с гидроксикарбоновой кислотой по описанному ниже способу. Альтернативно дождевого червя можно привести в контакт с гидроксикарбоновой кислотой по описанному ниже способу без предварительного контактирования с хлоридом металла.

Контакт с гидроксикарбоновой кислотой также можно осуществить путем посыпания

15 живого дождевого червя гидроксикарбоновой кислотой в порошкообразном виде.

Альтернативно живого дождевого червя можно погрузить в водный раствор гидроксикарбоновой кислоты, который имеет pH от 2 до 5. Если контакт с гидроксикарбоновой кислотой осуществляют после контакта с хлоридом металла, предпочтительно, чтобы контакт с гидроксикарбоновой кислотой был осуществлен

20 сразу после контакта с хлоридом металла. Также предпочтительно промыть дождевого червя водой перед приведением в контакт с гидроксикарбоновой кислотой. После удаления хлорида металла путем промывания водой и приведения дождевого червя в контакт с гидроксикарбоновой кислотой, можно получить сухой порошок дождевого червя с высокой ферментативной активностью. Если дождевого червя промывают

25 водой перед приведением в контакт с гидроксикарбоновой кислотой, промывание дождевого червя водой проводят предпочтительно в течение 30 минут, более предпочтительно в течение 20 минут, после начала контакта с хлоридом металла.

Способ промывания дождевого червя водой специально не ограничивается и включает в себя любой известный способ.

30 Если живых дождевых червей держать в контакте с порошкообразной гидроксикарбоновой кислотой в течение длительного периода времени, они утратят жизненные функции в результате гибели и переваренные вещества в пищеварительном тракте больше не будут экскретироваться. Следовательно, предпочтительно разбавить гидроксикарбоновую кислоту водой как можно скорее, предпочтительно, в течение 30 35 секунд, более предпочтительно, в течение 20 секунд, так, чтобы достичь значения pH в диапазоне от 2 до 5.

Поскольку гидроксикарбоновая кислота создает условия обитания, неприятные для дождевых червей, живые дождевые черви, следуя инстинкту самосохранения, пытаются улучшить условия обитания путем выделения физиологических жидкостей и экскреции.

40 Кроме того, поскольку гидроксикарбоновые кислоты обладают дезинфицирующими свойствами, предполагают, что они не только участвуют в стимуляции экскреции переваренных веществ и т.п., остающихся в пищеварительном тракте, как описано выше, но и способны уничтожать бактерии, прилипающие к дождевым червям.

В указанном выше способе можно использовать любую кристаллическую

45 гидроксикарбоновую кислоту, независимо от числа гидроксильных или карбоксильных групп, которая может находиться в виде кристаллической формы в условиях применения. То есть, кристаллическая гидроксикарбоновая кислота может представлять собой моногидроксимонокарбоновую кислоту, моногидроксиполикарбоновую кислоту,

полигидроксимонокарбоновую кислоту и полигидроксиполикарбоновую кислоту.

Примерами гидроксикарбоновой кислоты, подходящей для применения в настоящем изобретении, являются гликолевая кислота, молочная кислота, уксусная кислота, β -гидроксипропионовая кислота, α -гидрокси-*n*-масляная кислота, β -гидрокси-*n*-масляная кислота, α -гидрокси-*n*-валериановая кислота, β -гидрокси-*n*-валериановая кислота, яблочная кислота, α -метиляблочная кислота, α -гидроксиглутаровая кислота, β -гидроксиглутаровая кислота, лимонная кислота, малоновая кислота и янтарная кислота. Среди них предпочтительными являются молочная кислота, уксусная кислота, яблочная кислота, лимонная кислота, малоновая кислота и янтарная кислота, поскольку их можно легко получить и использовать в составе пищевых продуктов. Указанные выше гидроксикарбоновые кислоты можно использовать по отдельности, или в виде сочетаний из двух или более кислот.

Ткани живого дождевого червя на 65% состоят из воды. Хотя функции самосохранения живого дождевого червя остаются эффективными в течение некоторого времени, гибель живого дождевого червя приводит к появлению ферментативной активности; следовательно, требуется тщательно контролировать период пребывания живого дождевого червя в раздражающих условиях окружающей среды. Продолжительность данного периода варьирует в зависимости от условий; однако обычно она находится в диапазоне от 3 до 180 минут.

Предпочтительно живых дождевых червей, обработанных таким способом гидроксикарбоновой кислотой, промывают водой и затем размалывают с получением жидкого или пастообразного продукта измельчения. Предпочтительно червей промывают чистой водой. Способ промывания специально не ограничивается и включает в себя известные способы промывания водой. Общее время процесса обработки перед размалыванием, то есть, продолжительность периода от посыпания живых дождевых червей хлоридом металла ил завершения удаления гидроксикарбоновой кислоты путем промывания водой, предпочтительно не превышает 240 минут.

Способ размалывания специально не ограничивается, например, размалывание обычно проводят при температуре от 1 до 25°C с помощью гомогенизатора, блендера, смесителя-гомогенизатора, мельницы или устройства для разрушения клеток при высоком давлении. В целях ингибирования деградации компонентов дождевого червя, размалывание предпочтительно проводить при низкой температуре, более предпочтительно, при температуре от 2 до 15°C.

Продукт измельчения, полученный путем размалывания дождевого червя, помещают на поддон из нержавеющей стали, или подобное приспособление, и подвергают лиофилизации. В данном процессе может образовываться газ разложения, поскольку ферменты, содержащиеся в живом организме дождевого червя являются неактивными в живых клетках, но начинают действовать сразу после гибели клеток. Чтобы ингибировать образование газа разложения, перед лиофилизацией продукт измельчения предпочтительно быстро охладить и заморозить при температуре от -18°C до -35°C чтобы подавить действие ферментов.

В данном способе, чтобы не утратить при получении порошка дождевого червя фармакологическую активность, присущую дождевому черви, предпочтительно быстро заморозить размолотого дождевого червя. С другой стороны, следует избегать слишком быстрого замораживания дождевого червя, поскольку при этом примеси, присутствующие наряду с белками, которые являются основными компонентами пасты дождевого червя, могут образовывать не замороженные включения и, следовательно,

могут не отделиться. Таким образом, замораживание можно проводить при низкой температуре от -18°C до -35°C в течение периода, предпочтительно составляющего от 20 до 240 часов, более предпочтительно, от 50 до 170 часов.

Важно выбрать условия проведения лиофилизации, которые позволяют удалить

5 воду и примеси без остатка. Соответственно, лиофилизацию предпочтительно проводить при давлении 50 Па или менее и при постадийном повышении температуры от -60°C до +90°C в течение периода от 10 до 60 часов.

10 С помощью метода лиофилизации, например, описанного выше, после замораживания продукта измельчения при температуре от -18°C до -35°C в течение периода от 20 до 10 60 часов и вакуумной сушки из замороженного состояния в течение периода от 10 до 60 часов при повышении температуры в несколько стадий от -60°C до +90°C и уменьшении давления в несколько стадий от 25 до 40 Па, можно получить стерильный бледно-желтый порошок дождевого червя.

15 Кроме того, в указанный способ предпочтительно включить стадии растворения лиофилизированного продукта измельчения в воде или водном растворе этанола; и

удаления или отделения нерастворимых фракций. Стадия удаления или отделения нерастворимых фракций, которую можно проводить по описанному выше способу, включает в себя осаждение, протекающее при стоянии полученного раствора, центрифугирование, фильтрацию и т. п. Стадию растворения лиофилизированного 20 продукта измельчения в воде или водном растворе этанола предпочтительно проводят при перемешивании или встряхивании. Время, необходимое для растворения лиофилизированного продукта измельчения в воде предпочтительно составляет от 1 до 120 минут, более предпочтительно, от 5 до 80 минут. Концентрация этанола в водном растворе специально не ограничивается; однако предпочтительно она составляет от 25 10 до 70% (об/об), более предпочтительно от 30 до 60%.

25 В качестве средства, стимулирующего продукцию тау-белка, терапевтического средства, профилактического средства и пищевой композиции настоящего изобретения можно использовать супернатант, полученный из описанного выше раствора лиофилизированного размолотого дождевого червя в воде или водном растворе этанола, 30 как есть, в виде водного раствора, или в виде концентрата, полученного после упаривания воды из раствора. Супернатант также можно высушить и использовать в виде порошка, или порошок, полученный путем высушивания супернатанта, можно растворить в воде для последующего применения. Кроме того, порошок, полученный путем лиофилизации пасты дождевого червя, можно использовать как есть, не растворяя 35 его в воде или водном растворе этанола.

40 В способе удаления настоящего изобретения, перед обработкой, включающей в себя помещение живых дождевых червей в неприятные условия обитания, то есть, перед приведением живых дождевых червей в контакт с хлоридом металла, или гидроксиарбоновой кислотой, как описано выше, предпочтительно перенести живых дождевых червей в плоский ящик, такой как хлебница, и оставить стоять в течение 10-50 часов на свету, после чего удалить грязь, прилипшую к коже дождевого червя. Более предпочтительно, живых дождевых червей оставляют стоять на свету в течение 12-24 часов. В данном способе предпочтительно использовать такое количество дождевых червей, чтобы толщина их слоя составляла от 30 до 60 мм, предпочтительно от 40 до 45 50 мм. Следует следить, чтобы в ящик не попадали посторонние вещества, такие как песок или глиняная масса, и, поскольку дождевые черви являются ночных животными и, следовательно, проявляют жизненную активность в темноте, что может привести к их физическому истощению, предпочтительно использовать ночью метод

культивирования или т.п. на свету, освещая плоский ящик. Такая обработка заставляет живых дождевых червей проявлять инстинкт самосохранения и пытаться сохранить условия, подходящие для жизнедеятельности, путем экскреции переваренных веществ, оставшихся в пищеварительном тракте, в результате чего тела червей покрываются

5 экскрементами, что предотвращает испарение воды. Таким образом, путем повторного удаления наружной грязи, а именно экскрементов, с помощью подходящих способов, в конечном итоге можно удалить переваренные вещества из пищеварительного тракта дождевых червей и грязь, прилипшую к их коже.

Грязь, прилипшую к коже дождевых червей, можно удалить, например, путем

10 покрывания дождевых червей нетканной тканью так, чтобы грязь адсорбировалась на ткани. С помощью описанного способа, включающего в себя оставление дождевых червей на свету и удаление грязи, прилипшей к их коже, в сочетании с указанным выше способом приведения дождевых червей в контакт с хлоридом металла и/или гидроксикарбоновой кислотой, можно достичь дополнительной экскреции и удаления

15 токсичных веществ, содержащихся в организме дождевых червей.

В соответствии с настоящим изобретением, в качестве способа получения сухого порошка дождевого червя, предпочтительно использовать описанные ниже способы, особенно с точки зрения стабильности при хранении полученного сухого порошка.

(А-1) Способ получения сухого порошка дождевого червя, включающий в себя

20 следующие стадии:

приведение живого дождевого червя в контакт с хлоридом по меньшей мере, одного металла, выбранного из группы, включающей в себя калий, натрий, магний и кальций; и

25 последующее приведение живого дождевого червя в контакт с порошкообразной гидроксикарбоновой кислотой, затем разведение водой с достижением pH от 2 до 5, выдерживание дождевого червя в полученном разведении в течении 3-180 минут, промывание живого дождевого червя водой, размалывание живого дождевого червя и лиофилизация полученного таким образом продукта измельчения.

(А-2) Способ получения сухого порошка дождевого червя, включающий в себя

30 следующие стадии:

приведение живого дождевого червя в контакт с хлоридом, по меньшей мере, одного металла, выбранного из группы, включающей в себя калий, натрий, магний и кальция; и

35 последующее погружение живого дождевого червя в водный раствор гидроксикарбоновой кислоты, имеющий pH от 2 до 5, выдерживание в таком растворе в течение 3-180 минут, промывание живого дождевого червя водой, размалывание живого дождевого червя и лиофилизация полученного таким образом продукта измельчения.

(А-3) Способ получения сухого порошка дождевого червя по указанным выше

40 пунктам (А-1) или (А-2), дополнительно включающий в себя следующие стадии:

растворение указанного лиофилизированного продукта измельчения в воде или водном растворе этанола; удаление или отделение нерастворимых фракций; и затем дополнительная лиофилизация полученного продукта.

Кроме того, после лиофилизации продукта измельчения, полученного путем

45 размалывания живого дождевого червя, с целью стерилизации полученный сухой

продукт предпочтительно подвергают тепловой обработке при температуре 110°C или выше, но ниже 130°C. Если температура тепловой обработки ниже 110°C, стерилизация сухого продукта может быть недостаточной, а если температура тепловой обработки

составляет 130°C или выше, ферменты, содержащиеся в сухом препарate дождевого червя, инактивируются и, следовательно, их активность снижается, что является нежелательным. Более предпочтительно, температура тепловой обработки составляет от 115 до 125°C. Способ тепловой обработки специально не ограничивается и включает в себя, например, продувание горячим воздухом; применение нагревательной рубашки; нагревание продукта на поддоне или т.п. с использованием нагревательного элемента; и применение а инкубатора с терморегулятором. Время тепловой обработки предпочтительно составляет от 30 секунд до 130 минут, более предпочтительно, от 30 минут до 90 минут, еще более предпочтительно, от 60 минут до 90 минут. Слишком короткое время тепловой обработки может приводить к недостаточной стерилизации, а слишком длительное время тепловой обработки может приводить к утрате ферментативной активности, и то, и другое является нежелательным. Если указанной выше тепловой обработке подвергают ферменты, содержащиеся в жидкости, активность ферментов утрачивается; следовательно, в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно использовать сухой порошок дождевого червя.

В настоящем изобретении в качестве способа получения продукта измельчения дождевого червя предпочтительно используют нижеследующие способы.

(В-1) Способ получения продукта измельчения дождевого червя, включающий в себя следующие стадии:

- 20 приведение живого дождевого червя в контакт с хлоридом, по меньшей мере, одного металла, выбранного из группы, включающей в себя калий, натрий, магний и кальций; и
- последующее приведение живого дождевого червя в контакт с порошкообразной гидроксикарбоновой кислотой, разведение водой с достижением pH от 2 до 5,
- 25 выдерживание дождевого червя в полученном разведении в течение 3-180 минут, промывание живого дождевого червя водой, и затем размалывание живого дождевого червя.

(В-2) Способ получения продукта измельчения дождевого червя, включающий в себя следующие стадии:

- 30 приведение живого дождевого червя в контакт с хлоридом (хлоридами) металла (металлов), выбранного из группы, включающей в себя калий, натрий, магний и кальций; и
- последующее погружение живого дождевого червя в водный раствор гидроксикарбоновой кислоты, имеющий pH от 2 до 5, выдерживание в таком растворе
- 35 в течение 3-180 минут, промывание живого дождевого червя водой и затем размалывание живого дождевого червя.

В настоящем изобретении в качестве способа получения экстракта дождевого червя предпочтительно используют нижеследующие способы.

(С-1) Способ получения экстракта дождевого червя, включающий в себя следующие

- 40 стадии:
- приведение живого дождевого червя в контакт с хлоридом, по меньшей мере, одного металла, выбранного из группы, включающей в себя калий, натрий, магний и кальций; и
- последующее приведение живого дождевого червя в контакт с порошкообразной
- 45 гидроксикарбоновой кислотой, разведение водой с достижением pH от 2 до 5, выдерживание дождевого червя в полученном разведении в течении 3-180 минут, промывание живого дождевого червя водой, размалывание живого дождевого червя, лиофилизация полученного продукта измельчения, растворение полученного

лиофилизированного продукта в воде или водном растворе этанола и затем удаление или отделение нерастворимых фракций.

(С-2) Способ получения экстракта дождевого червя, включающий в себя следующие стадии:

- 5 приведение живого дождевого червя в контакт с хлоридом (хлоридами) металла (металлов), выбранного из группы, включающей в себя калий, натрий, магний и кальций; и
- 10 последующее погружение живого дождевого червя в водный раствор гидроксикарбоновой кислоты, имеющий pH от 2 до 5, выдерживание в таком растворе в течение 3-180 минут, промывание живого дождевого червя водой, размалывание живого дождевого червя, лиофилизация полученного продукта измельчения, растворение указанного лиофилизированного продукта в воде или водном растворе этанола, и затем удаление или отделение нерастворимых фракций.

ПРИМЕРЫ

15 Настоящее изобретение далее описывается более подробно посредством примеров. Однако настоящее изобретение никаким образом не ограничивается нижеследующими примерами. Следует отметить, что, если не указано иначе, все "%" рассчитываются по массе.

[Получение сухого порошка дождевого червя]

- 20 30 кг живых красных дождевых червей (*Lumbricus rubellus*) оставляют стоять на свету в течение 24 часов и затем удаляют грязь, прилипшую к их коже, после чего живых красных дождевых червей помещают на плоскую чашку слоем толщиной примерно 5 см и равномерно посыпают их 250 г хлорида натрия. Через 20 минут дождевых червей промывают водой. Затем дождевых червей таким же образом посыпают 250 г лимонной кислоты и через 15 секунд разводят путем добавления 30 л чистой воды. В данном способе pH полученного раствора составляет 2,25 сразу после добавления воды и 2,74 после завершения разведения. После посыпания порошкообразной лимонной кислотой дождевые черви сразу экскретируют желтую жидкость. После разбавления водой дождевых червей выдерживают в таком состоянии в течение 20 минут. Затем живых дождевых червей вынимают из полученного грязного водного раствора лимонной кислоты, промывают водой и размалывают при 10°C с помощью гомогенизатора, получая пасту дождевого червя. Полученную пасту дождевого червя подвергают вакуумной дегазации, чтобы удалить содержащиеся в ней газы, после чего пасту дождевого червя переносят в поддон из нержавеющей стали, где пасту дождевого червя сразу и быстро охлаждают до -35°C и держат при этой температуре в течение 50 часов, чтобы осуществить медленное замораживание. Замороженную таким образом пасту дождевого червя держат при температуре -35°C и давлении 0 Па в течении 2 часов. Затем пасту дождевого червя нагревают и сушат при температуре 25°C и давлении 40 Па в течение 10 часов, при температуре 40°C и давлении 35 Па в течение 14 часов, затем 40 при температуре 65°C и давлении 35 Па в течение 12 часов, и наконец полученный препарат держат при температуре 80°C и давлении 25 Па в течение 6 часов, завершая таким образом лиофилизацию пасты дождевого червя. В результате указанной обработки получают бледно-желтый сухой порошок дождевого червя с содержанием воды 8% по массе.
- 45 Полученный таким образом сухой порошок дождевого червя подвергают тепловой обработке с помощью нагревательного аппарата RM-50D (производимого Okawara MFG. CO., Ltd.). Условия тепловой обработки включают в себя нагревание сухого порошка дождевого червя до 120°C в течение 90 минут, выдерживание при 120°C в

течение 20 минут и охлаждение до 40°C в течение 240 минут. Затем сухой порошок дождевого червя вынимают.

После указанной тепловой обработки сухой порошок дождевого червя растворяют в 50% водном растворе этанола так, чтобы обеспечить отношение этанол:

- 5 лиофилизованный порошок 20:1 (об/масс), и затем полученный раствор встряхивают в течение 1 часа при 1500 об/мин при комнатной температуре (25°C). По завершении встряхивания раствор центрифугируют в течение 15 минут при 4°C и 10000 g, полученный супернатант отделяют и концентрируют в вакууме при 75°C в течение 15 минут. Затем супернатант переносят в поддон из нержавеющей стали, на котором супернатант сразу 10 и быстро охлаждают до -35°C и выдерживают при данной температуре в течение 50 часов, чтобы осуществить медленной замораживание. Замороженную пасту дождевого червя держат при температуре -35°C и давлении 0 Па в течение 2 часов. Затем пасту дождевого червя нагревают и сушат при температуре 25°C и давлении 40 Па в течение 10 часов, при температуре 40°C и давлении 35 Па в течение 14 часов, при температуре 15 65°C и давлении 35 Па в течение 12 часов и, наконец, при температуре 80°C и давлении 25 Па в течение 6 часов, завершая таким образом лиофилизацию пасты дождевого червя с получением сухого порошка дождевого червя А-1.

[Культура нейронов гиппокампа крысы]

Нервные клетки (нейроны), выделенные из участка гиппокампа эмбриона крысы на 20 18 день беременности, культивируют при 37°C в течение 7 дней.

[Количественное определение тау-белка и фосфорилированного тау-белка]

После указанного культивирования нейроны гиппокампа крыс культивируют при 37°C в 1 мл культуральной среды, содержащей лиофилизованный порошок дождевого червя, полученной путем растворения полученного по описанному выше способу сухого 25 порошка дождевого червя А-1 в питательной среде Neural Media 5 (NM5) с достижением концентрации 0, 1, 10, 100 или 1000 нг/мл (число клеток: 1×10^6 /12-луночную чашку).

Состав питательной среде NM5:

230 мл Neurobasal (Gibco 21103-049)

30 12,5 мл лошадиной сыворотки (Sigma H1270)

2,5 мл пенициллина/трептомицина (Gibco 15140122)

5 мл Glutamax 1 (Gibco 35050-061)

2% добавки B27 (Gibco 17504044)

По истечению произвольного периода времени нейроны гиппокампа крыс извлекают, промывают дважды раствором PBS(-), добавляют буфер для образцов и методом 35 вестерн-блоттинга определяют количество тау-белка и фосфорилированного тау-белка. Количество белка и фосфорилированного белка определяют, используя программное обеспечение для анализа изображений, ImageJ64, на основании результатов вестерн-блоттинга. Таким же способом определяют количество белка и фосфорилированного белка для Akt и GSK-3β, располагающихся в сигнальном пути выше тау-белка.

40 Обнаружено, что в нейронах гиппокампа крыс, культивированных в питательной среде, содержащей растворенный сухой порошок дождевого червя, значительное увеличение количества белков Akt и GSK-3β отсутствует (фиг. 1, 2В и 2С); а количество тау-белка увеличивается более чем в два раза по сравнению с контролем ("-"; культивирование в питательной среде NM5) (фиг. 1 и 2А). Следует добавить, что

45 максимальное увеличение количества тау-белка, обусловленное применением питательной среды, содержащей растворенный сухой порошок дождевого червя, наблюдается при концентрации сухого порошка дождевого червя 100 нг/мл и времени культивирования 48 часов (фиг. 3 и 4).

[Внутриклеточная локализация тау-белка и фосфорилированного тау-белка]

Культивированные по описанному выше способу нейроны гиппокампа крыс культивируют при 37°C в 2 мл раствора сухого порошка дождевого червя, полученного по способу А-1, в питательной среде NM5 в концентрации 100 нг/мл (число клеток:

⁵ 2×10⁵/6-луночную чашку (с дном из покровного стекла)).

Через 48 часов нейроны гиппокампа крыс извлекают, фиксируют 4% раствором параформальдегида и методом иммуноокрашивания определяют внутриклеточную локализацию тау-белка и фосфорилированного тау-белка.

В нейритах контроля ("None"; культивирование в питательной среде NM5) отчетливо ¹⁰ наблюдается фосфорилирование тау-белка; однако в нейритах нейронов гиппокампа, культивированных в питательной среде, содержащей растворенный сухой порошок дождевого червя, отчетливое изображение фосфорилирования отсутствует (фиг 5).

Приведенные выше результаты демонстрируют, что сухой порошок дождевого червя ¹⁵ не только значительно увеличивает количество тау-белка, но и уменьшает уровень фосфорилирования, особенно, в нейритах.

(57) Формула изобретения

1. Способ получения средства, стимулирующего продукцию тау-белка, содержащего сухой порошок экстракта дождевого червя, включающий стадии:

²⁰ приведение в контакт живого дождевого червя с хлоридом по меньшей мере одного металла, выбранного из группы, состоящей из калия, натрия, магния и кальция;

последующее приведение в контакт живого дождевого червя с гидроксикарбоновой кислотой в порошкообразном виде, разведение полученного с водой для доведения pH от 2 до 5, поддерживание полученного разведения в течение от 3 до 180 минут или

²⁵ погружение и выдерживание живого червя в течение от 3 до 180 минут в водном растворе гидроксикарбоновой кислоты, имеющей доведенный pH от 2 до 5; и

промывание живого червя водой, измельчение живого червя и затем лиофилизация полученного измельченного продукта;

³⁰ растворение лиофилизированного продукта в воде или в водном растворе этанола и затем удаление или отделение нерастворимых фракций;

лиофилизация полученного супернатанта для получения сухого порошка указанного экстракта дождевого червя,

где дождевой червь является красным дождевым червем *Lumbricus rubellus*.

2. Способ получения терапевтического или профилактического средства для лечения ³⁵ или профилактики заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, содержащего сухой порошок экстракта дождевого червя, где указанный способ включает стадии:

приведение в контакт живого дождевого червя с хлоридом по меньшей мере одного металла, выбранного из группы, состоящей из калия, натрия, магния и кальция;

⁴⁰ последующее приведение в контакт живого дождевого червя с гидроксикарбоновой кислотой в порошкообразном виде, разведение полученного водой для доведения pH от 2 до 5, поддерживание полученного разведения в течение от 3 до 180 минут или погружение и выдерживание живого червя в течение от 3 до 180 минут в водном растворе гидроксикарбоновой кислоты, имеющей доведенный pH от 2 до 5; и

промывание живого червя водой, измельчение живого червя и затем лиофилизация ⁴⁵ полученного измельченного продукта;

растворение лиофилизированного продукта в воде или в водном растворе этанола и затем удаление или отделение нерастворимых фракций;

лиофилизация полученного супернатанта для получения сухого порошка указанного

экстракта дождевого червя,

где дождевой червь является красным дождевым червем *Lumbricus rubellus*.

3. Способ получения терапевтической или профилактической композиции для лечения или профилактики заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, содержащей сухой порошок экстракта дождевого червя, где указанный способ включает стадии:

приведение в контакт живого дождевого червя с хлоридом по меньшей мере одного металла, выбранного из группы, состоящей из калия, натрия, магния и кальция;

последующее приведение в контакт живого дождевого червя с гидроксикарбоновой кислотой в порошкообразном виде, разведение полученного водой для доведения pH

10 от 2 до 5, поддерживание полученного разведения в течение от 3 до 180 минут или погружение и выдерживание живого червя в течение от 3 до 180 минут в водном растворе гидроксикарбоновой кислоты, имеющей доведенный pH от 2 до 5; и

промывание живого червя водой, измельчение живого червя и затем лиофилизация полученного измельченного продукта;

15 растворение лиофилизированного продукта в воде или в водном растворе этанола и затем удаление или отделение нерастворимых фракций;

лиофилизация полученного супернатанта для получения сухого порошка указанного экстракта дождевого червя,

где дождевой червь является красным дождевым червем *Lumbricus rubellus*.

20 4. Терапевтическое или профилактическое средство для лечения или профилактики заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, полученное способом по п.2.

5. Терапевтическая или профилактическая композиция для лечения или профилактики заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, полученная способом по п.3.

6. Терапевтическое или профилактическое средство по п.4, где заболеванием,

25 вызванным дефицитом тау-белка, является болезнь Альцгеймера.

7. Терапевтическая или профилактическая композиция по п.5, где указанное заболевание, вызванное дефицитом тау-белка, представляет собой болезнь Альцгеймера.

8. Способ стимуляции продукции тау-белка в клетке, включающий применение средства, стимулирующего продукцию тау-белка, полученного способом по п.1.

30 9. Применение сухого порошка экстракта красного дождевого червя *Lumbricus rubellus* для лечения заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, где указанный сухой порошок экстракта дождевого червя получен способом, включающим стадии:

приведение в контакт живого дождевого червя с хлоридом по меньшей мере одного металла, выбранного из группы, состоящей из калия, натрия, магния и кальция;

35 последующее приведение в контакт живого дождевого червя с гидроксикарбоновой кислотой в порошкообразном виде, разведение полученного водой для доведения pH от 2 до 5, поддерживание полученного разведения в течение от 3 до 180 минут или погружение и выдерживание живого червя в течение от 3 до 180 минут в водном растворе гидроксикарбоновой кислоты, имеющей доведенный pH от 2 до 5; и

40 промывание живого червя водой, измельчение живого червя и затем лиофилизация полученного измельченного продукта;

растворение лиофилизированного продукта в воде или в водном растворе этанола и затем удаление или отделение нерастворимых фракций; лиофилизация полученного супернатанта для получения сухого порошка указанного экстракта дождевого червя.

45 10. Способ лечения или профилактики заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, включающий введение терапевтического или профилактического средства для лечения или профилактики заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, полученного способом по п.2, или терапевтической или профилактической композиции для лечения

или профилактики заболевания, вызванного дефицитом тау-белка, полученной способом по п.3, субъекту в эффективной дозе.

5

10

15

20

25

30

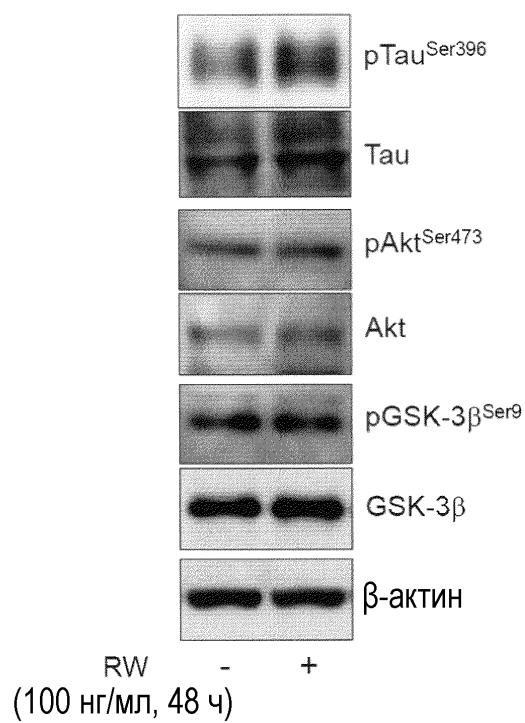
35

40

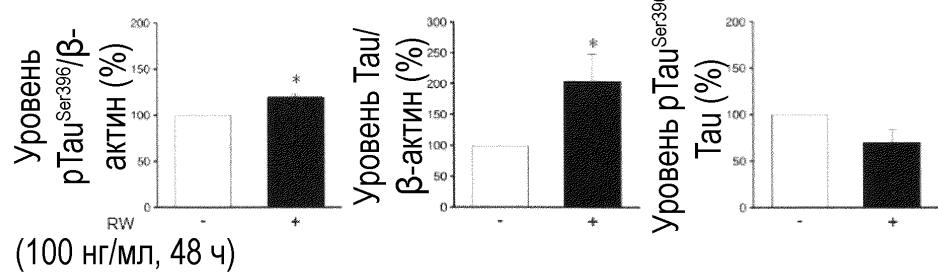
45

1/4

ФИГ. 1

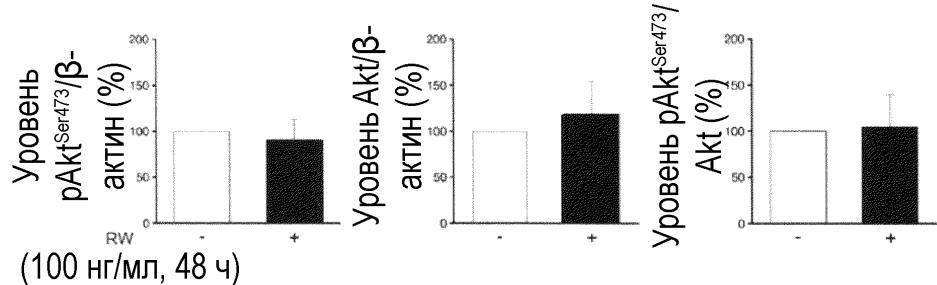


ФИГ. 2А

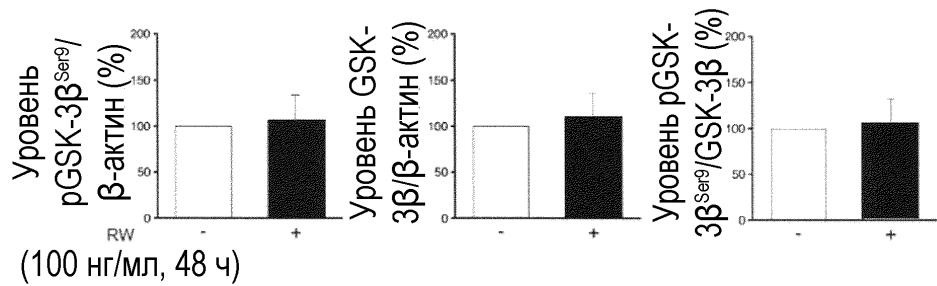


2/4

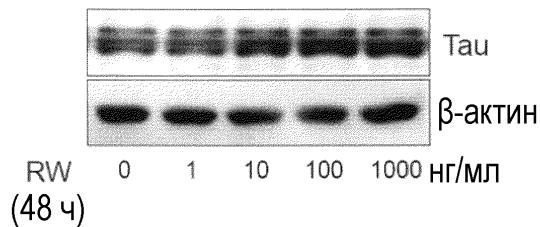
ФИГ. 2В



ФИГ. 2С

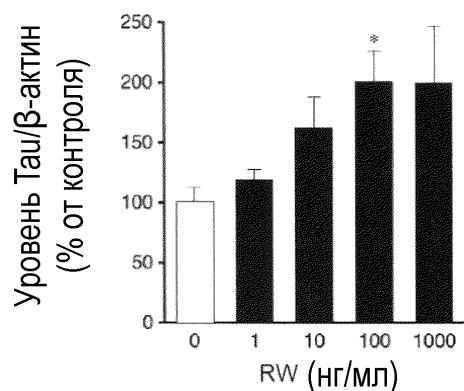


ФИГ. 3А

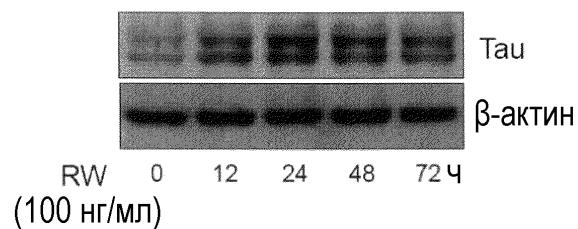


3/4

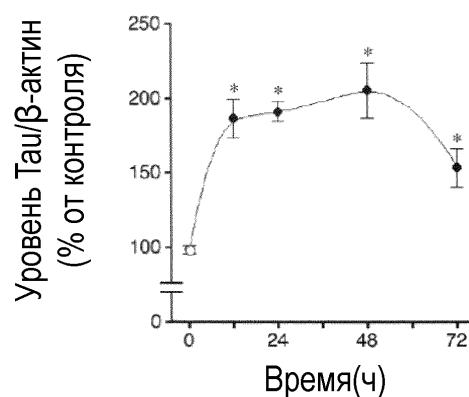
ФИГ. 3В



ФИГ. 4А



ФИГ. 4В



4/4

ФИГ. 5

