

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 474 599**

51 Int. Cl.:

A61K 35/56 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2011 E 11815840 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2484369**

54 Título: **Método de fabricación de polvo de lombriz seco**

30 Prioridad:

11.04.2011 JP 2011087779

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.07.2014

73 Titular/es:

**WELL STONE CO. (100.0%)
6742-1 Tanocho-ko Miyazaki-shi
Miyazaki, JP**

72 Inventor/es:

ISHII, KAZUYUKI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 474 599 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de fabricación de polvo de lombriz seco

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un método para producir polvo de lombriz seco, más particularmente, a un método para producir polvo de lombriz seco por el que se puede producir polvo de lombriz seco que contiene enzimas en una concentración alta, eliminándose sustancias tóxicas contenidas en el cuerpo de la lombriz.

Técnica precedente

- 10 Los extractos de lombriz y los polvos de lombriz secos se han usado desde la antigüedad principalmente en países orientales como agentes profilácticos y agentes terapéuticos para diversas enfermedades, y ejemplos de sus usos conocidos hasta ahora incluyen usos como agentes reductores de los cálculos vesicales y agentes promotores de la excreción de los cálculos vesicales, agentes terapéuticos para la ictericia, oxitócicos, tónicos, agentes para el crecimiento capilar, afrodisíacos, antipiréticos, agentes terapéuticos para la convulsión, promotores de la circulación sanguínea, agentes terapéuticos para la hemiplejía, analgésicos indirectos, diuréticos, agentes terapéuticos para el asma bronquial y agentes terapéuticos para la hipertensión.

- 15 Sin embargo, las lombrices, que se mantienen y se reproducen en lechos de cría, contienen elementos tóxicos tales como mercurio, cadmio, plomo y arsénico y microorganismos patógenos aunque se les proporcionen a las lombrices alimentos cuidadosamente seleccionados. Si estas sustancias tóxicas son ingeridas por las lombrices y se acumulan en sus cuerpos durante la cría, el beber un agente terapéutico producido a partir de los cuerpos vivos de las lombrices puede afectar adversamente al cuerpo humano.

- 20 Por lo tanto, cuando se prepara un agente para administración oral usando cuerpos vivos de lombrices como materia prima, estas sustancias tóxicas deben ser eliminadas, y se han propuesto muchos métodos para esto. Ejemplos de los métodos propuestos hasta ahora incluyen métodos en los que los cuerpos vivos de las lombrices se embeben en una solución acuosa de una sal alcalina tal como una sal sódica o una sal potásica para provocar la excreción de excrementos del tracto digestivo, seguido por la trituración en húmedo de las lombrices y la liofilización a vacío de la suspensión resultante, para producir polvo de lombriz seco útil como un agente terapéutico para la diabetes mellitus, un agente antihiperlipémico o un agente para la regulación de la presión sanguínea (véanse los Documentos de Patente 1 a 4); y un método en el que se deja que los cuerpos vivos de las lombrices se mantengan en una solución acuosa de un ácido que permanece a de 6 a 26°C durante de 0,1 a 5 horas para eliminar excrementos del tracto digestivo, seguido por la trituración de las lombrices, la desgasificación del producto triturado resultante y a continuación el secado a vacío del producto desgasificado mientras se incrementa la temperatura de un modo escalonado, para producir un agente terapéutico para pacientes que sufren trombosis (véase el Documento de Patente 5).

- 35 Además, se ha propuesto un método en el que, a fin de retirar o reducir metales pesados y sustancias supresoras de la actividad fibrinolítica y precursores del factor activador de plaquetas, se elabora polvo de lombriz seco como una solución acuosa y los componentes turbios se retiran de la misma, para obtener una solución acuosa de lombriz que tiene una turbidez de no más de 1,5 por lo que se refiere a una absorbancia a una longitud de onda de 700 nm (véase el Documento de Patente 6).

Documentos de la técnica relacionada

Documentos de Patente

- 40 Documento de Patente 1: Publicación de Solicitud de Patente Japonesa No Examinada N° H147718
Documento de Patente 2: Publicación de Solicitud de Patente Japonesa No Examinada N° H1-47719
Documento de Patente 3: Publicación de Solicitud de Patente Japonesa No Examinada N° H1-47720
Documento de Patente 4: Publicación de Solicitud de Patente Japonesa No Examinada N° H1-268639
Documento de Patente 5: Publicación de Solicitud de Patente Japonesa No Examinada N° H3-72427
45 Documento de Patente 6: Publicación de Solicitud de Patente Japonesa No Examinada N° 2006-96673

Compendio de la invención

Problemas a ser resueltos por la invención

- 50 Sin embargo, la imbibición de un cuerpo vivo de una lombriz en agua fresca, una solución acuosa de sal alcalina o una solución acuosa ácida durante mucho tiempo puede provocar la extenuación física de la lombriz, dando como resultado la desnaturalización de proteínas contenidas en el cuerpo vivo y una disminución en las acciones

enzimáticas, conduciendo a un deterioro de los efectos farmacológicos del polvo de lombriz obtenido. Además, si una lombriz muere en presencia de agua, el cuerpo de la lombriz es rápidamente disuelto debido a las acciones de enzimas fibrinolíticas existentes en la lombriz, y se descompone. Por lo tanto, el procesamiento en una solución acuosa se necesita llevar a cabo en un tiempo limitado, lo que es problemático.

- 5 Así, la presente invención se dirige a proporcionar un método para producir polvo de lombriz seco, mediante el que se puede producir polvo de lombriz seco que contiene enzimas en altas concentraciones, eliminándose las sustancias tóxicas contenidas en el cuerpo de la lombriz.

Los presentes inventores estudiaron intensamente para resolver los problemas anteriores, y descubrieron que los problemas anteriores se pueden resolver poniendo en contacto una lombriz viva con un cloruro o cloruros de un metal o metales, seguido por poner en contacto la lombriz viva con un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos, completando de ese modo la presente invención.

Medios para resolver los problemas

Esto es, el método de la presente invención para producir polvo de lombriz seco comprende:

- 15 poner en contacto una lombriz viva con un cloruro o cloruros de al menos un metal seleccionado del grupo que consiste en potasio, sodio, magnesio y calcio; y

posteriormente poner en contacto la lombriz viva con polvo de un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos y diluir la mezcla resultante con agua para ajustar el pH hasta de 2 a 5, seguido por dejar que la lombriz viva se mantenga durante de 3 a 180 minutos, lavar la lombriz viva con agua, triturar la lombriz viva lavada y liofilizar el producto triturado obtenido.

- 20 Además, el método de la presente invención para producir polvo de lombriz seco comprende:

poner en contacto una lombriz viva con un cloruro o cloruros de un metal o metales seleccionados del grupo que consiste en potasio, sodio, magnesio y calcio; y

- 25 posteriormente embeber la lombriz viva en una solución acuosa de un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos cuyo pH estaba ajustado hasta de 2 a 5, seguido por dejar que la lombriz viva se mantenga durante de 3 a 180 minutos, lavar la lombriz viva con agua, triturar la lombriz viva lavada y liofilizar el producto triturado obtenido.

Preferiblemente, en el método de la presente invención para producir polvo de lombriz seco, la lombriz viva se mantiene en un lugar iluminado durante de 10 a 50 horas y la suciedad adherida a la superficie del cuerpo se despega, antes de poner en contacto con un cloruro o cloruros de un metal o metales.

- 30 Además, en el método de la presente invención para producir polvo de lombriz seco, la liofilización se lleva a cabo preferiblemente congelando el producto triturado a de -18°C a -35°C durante de 20 a 240 horas y a continuación liofilizando el producto resultante bajo vacío.

Además, en el método de la presente invención para producir polvo de lombriz seco, el cloruro de un metal es preferiblemente cloruro sódico.

- 35 Además, en el método de la presente invención para producir polvo de lombriz seco, el ácido o los ácidos hidroxicarboxílicos es/son al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, ácido málico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido malónico y ácido succínico.

Efecto de la invención

- 40 Mediante la presente invención, es posible proporcionar un método para producir polvo de lombriz seco, por el que se puede producir polvo de lombriz seco que contiene enzimas en altas concentraciones, eliminándose las sustancias tóxicas contenidas en el cuerpo de la lombriz.

Modos para llevar a cabo la invención

En el método de la presente invención para producir polvo de lombriz seco, una lombriz viva se pone en contacto con un cloruro o cloruros de al menos un metal seleccionado del grupo que consiste en potasio, sodio, magnesio y calcio, lo que está seguido por

- 45 poner en contacto la lombriz viva con polvo de un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos, diluir la mezcla resultante con agua para ajustar el pH hasta de 2 a 5 y dejar que la lombriz viva se mantenga durante de 3 a 180 minutos; o

embeber la lombriz viva en una solución acuosa de un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos cuyo pH estaba ajustado hasta de 2 a 5 y dejar que la lombriz viva se mantenga durante de 3 a 180 minutos;

lombriz que a continuación se lava con agua y se tritura, seguido por liofilizar el producto triturado obtenido.

Al poner en contacto la lombriz viva con el cloruro o los cloruros metálicos predeterminados y a continuación con el ácido o ácidos hidroxicarboxílicos antes de procesar la lombriz, se forma un hábitat incómodo para la lombriz, y, como resultado, la lombriz excreta materiales digeridos del tracto digestivo para adaptarse al ambiente y, al mismo tiempo, se excretan sustancias tóxicas tales como mercurio, cadmio y plomo contenidos en el cuerpo.

5 Se han conocido métodos en los que se forman ambientes incómodos para las lombrices para hacer que una lombriz vomite heces y similares que contienen sustancias tóxicas del cuerpo de la lombriz, seguido por triturar la lombriz. La presente invención se elaboró basándose en el descubrimiento de que combinar métodos específicos, entre los métodos anteriores, para formar ambientes incómodos y realizar estos métodos en un orden específico permite la producción de polvo de lombriz seco que tiene excelentes actividades enzimáticas. Esto es, lo que es importante es que un cloruro o cloruros metálicos (el estrés osmótico) y un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos (el estrés por pH) se proporcionen en ese orden.

10 Aunque el análisis biológico molecular no ha avanzado bien en las lombrices y de ahí que los mecanismos detallados no estén necesariamente claros, se sabe que el estrés osmótico activa la transcripción de diversos genes de respuesta al estrés tales como genes de proteína de choque térmico, en las investigaciones de otros organismos modélicos tales como levaduras, nematodos y plantas. Por lo tanto, una de las razones por las que se puede obtener el efecto de la presente invención puede ser, por ejemplo, que genes HSP y similares sean activados en primer lugar por el estrés osmótico y, posteriormente, la lombriz se someta adicionalmente a otro estrés, el estrés por pH, que provoca una activación adicional de las rutas de expresión de genes de respuesta al estrés, conduciendo a una mejora notable de las cantidades de producción de enzimas útiles.

15 En el método de la presente invención, se usa una lombriz viva. La lombriz viva no está restringida, y ejemplos de la misma incluyen *Lumbricus rubellus*, *Lumbricus terrestris*, *Eisenia foetida*, *Allolobophora caliginosa*, *Dendrobaena octaedra*, *Allolobophora japonica* Michaelsen, *Drawida hattamimizu* Hatai, *Pheretima divergens* Michaelsen, *Pheretima communissima*, *Pheretima agrestis*, *Pheretima sieboldi* Horst, *Pheretima hilgendorji*, *Pontodrilus matsushimensis* Iizuka, *Tubifex hattai* Nomura y *Limnodrilus gotoi* Hatai (=L. *Socialis* Stephenson).

20 En el método de la presente invención, antes del contacto de lombrices vivas con un cloruro o cloruros metálicos, las lombrices vivas se ponen preferiblemente en un recipiente plano tal como un recipiente para pan y se deja que se mantengan en un lugar iluminado durante de 10 a 50 horas, seguido por la retirada de la suciedad adherida a las superficies de los cuerpos. El espacio de tiempo durante el cual se deja que las lombrices se mantengan en un lugar iluminado es más preferiblemente de 12 a 24 horas. La cantidad de las lombrices es preferiblemente una cantidad con la que las lombrices estén apiladas hasta alcanzar un grosor de aproximadamente 30 a 60 mm, preferiblemente de aproximadamente 40 a 50 mm. Este recipiente plano está libre de sustancias extrañas tales como arena y lodo, y el interior del recipiente preferiblemente se mantiene iluminado por la noche mediante cría con luz o similares ya que las lombrices son nocturnas y su actividad diaria se activa en un lugar oscuro, conduciendo a la extenuación física. Mediante este procedimiento, las lombrices ejercen su instinto autoprotector y excretan materiales digeridos que permanecen en el tracto digestivo, con lo que sus cuerpos enteros se cubren para evitar la evaporación de agua y de ese modo mantener su ambiente vital. Por lo tanto, repitiendo el despegue de esta suciedad de cobertura, esto es, excremento, mediante un método apropiado, los materiales digeridos del tracto digestivo y la suciedad adherida a las superficies de los cuerpos se pueden retirar finalmente.

25 La suciedad adherida a las superficies de los cuerpos de las lombrices se puede despegar, por ejemplo, cubriendo las lombrices vivas con una tela no tejida para permitir la adsorción de suciedad en la misma. Combinando este mantenimiento de las lombrices en un lugar iluminado seguido por la retirada de la suciedad adherida a las superficies de los cuerpos y la puesta en contacto de las lombrices con un cloruro o cloruros metálicos y un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos, se pueden esperar además la excreción y la retirada de sustancias tóxicas de los cuerpos de las lombrices.

30 El cloruro o los cloruros metálicos usados en la presente invención es/son un cloruro o cloruros de al menos un metal seleccionado del grupo que consiste en potasio, sodio, magnesio y calcio. Esto es, el cloruro o los cloruros metálicos es/son al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cloruro potásico, cloruro sódico, cloruro magnésico y cloruro cálcico. Además, el cloruro o los cloruros metálicos pueden ser bien su mezcla o bien una mezcla de estos y otros componentes inoocuos que se pueden añadir a un alimento. Ejemplos de tal mezcla incluyen sales dietéticas, sales de roca y sales marinas. El cloruro o los cloruros metálicos descritos anteriormente se pueden usar esparciendo su polvo sobre lombrices vivas, y esto provoca el contacto del cloruro o los cloruros metálicos con las lombrices.

35 Después de poner en contacto el cloruro o los cloruros metálicos con las lombrices vivas, las lombrices vivas se ponen en contacto con un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos. La puesta en contacto con el ácido o los ácidos hidroxicarboxílicos también se puede llevar a cabo esparciendo polvo del ácido o los ácidos hidroxicarboxílicos sobre las lombrices vivas. La puesta en contacto con el ácido o los ácidos hidroxicarboxílicos se lleva a cabo inmediatamente después de la puesta en contacto con el cloruro o los cloruros metálicos descritos anteriormente. Además, antes de poner en contacto las lombrices vivas con un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos, preferiblemente las lombrices se lavan con agua. Retirar el cloruro o los cloruros metálicos lavando con agua seguido por poner en contacto las lombrices vivas con un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos permite la producción de polvo de lombriz

seco que tiene actividades enzimáticas. En los casos en los que las lombrices se lavan con agua antes de ponerse en contacto con un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos, el lavado de las lombrices con agua se lleva a cabo preferiblemente en menos de 30 minutos, más preferiblemente en menos de 20 minutos, después del comienzo de la puesta en contacto con un cloruro o cloruros metálicos. El método de lavado con agua no está restringido, y se puede emplear un método conocido.

Si las lombrices vivas se mantienen en contacto con polvo de un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos durante un tiempo prolongado, sus funciones vitales se pierden, y los materiales digeridos del tracto digestivo no se excretan. Por lo tanto, el ácido o los ácidos hidroxicarboxílicos necesita o necesitan diluirse con agua tan pronto como sea posible, preferiblemente en menos de 30 segundos, más preferiblemente en menos de 20 segundos, para ajustar el pH hasta de 2 a 5.

Puesto que el ácido o los ácidos hidroxicarboxílicos forma o forman un ambiente vital incómodo para las lombrices, las lombrices vivas tratan de mejorar el ambiente vital mediante la excreción de sus fluidos corporales y excremento debido a su instinto autoprotector. Además, puesto que los ácidos hidroxicarboxílicos tienen propiedades bactericidas, se espera que representen un papel no solo en la promoción de la excreción de materiales digeridos del tracto digestivo según se describió anteriormente, sino también en la destrucción de bacterias adheridas a las lombrices.

El ácido hidroxicarboxílico cristalino usado en el método de la presente invención no está restringido por los números de sus grupos hidroxilo y grupos carboxilo, con tal de que estén en las formas de cuerpos cristalinos bajo las condiciones de uso. Esto es, el ácido hidroxicarboxílico cristalino puede ser cualquiera de ácido monocarboxílico monohidroxilado, ácido policarboxílico monohidroxilado, ácido monocarboxílico polihidroxilado y ácido policarboxílico polihidroxilado.

Ejemplos del ácido o los ácidos hidroxicarboxílicos usados en la presente invención incluyen ácido glicólico, ácido láctico, ácido acético, ácido β -hidroxipropiónico, ácido α -hidroxil-n-butírico, ácido β -hidroxil-n-butírico, ácido α -hidroxil-n-valérico, ácido β -hidroxil-n-valérico, ácido málico, ácido α -metilmálico, ácido α -hidroxiglutarico, ácido β -hidroxiglutarico, ácido cítrico, ácido malónico y ácido succínico. Entre estos, se prefieren el ácido láctico, el ácido acético, el ácido málico, el ácido cítrico, el ácido malónico y el ácido succínico en vista del hecho de que estos se pueden usar en alimentos y se pueden obtener fácilmente. Se puede usar individualmente un solo tipo de ácido hidroxicarboxílico, o se puede usar una mezcla de 2 o más tipos del mismo.

El agua supone un 65% de los componentes totales de los tejidos de una lombriz viva. Aunque las funciones protectoras de una lombriz viva son eficaces durante un cierto espacio de tiempo, la muerte de la lombriz viva permite que las enzimas actúen, de modo que el espacio de tiempo durante el cual la lombriz viva se pone bajo un ambiente incómodo se necesita controlar cuidadosamente. El espacio de tiempo varía dependiendo de las condiciones, y habitualmente está dentro del intervalo de 3 a 180 minutos.

En la presente invención, las lombrices vivas procesadas con un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos se lavan con agua y a continuación se trituran hasta un producto triturado en la forma de un líquido o una pasta. El lavado se lleva a cabo preferiblemente con agua pura. El método de lavado no está restringido, y se puede emplear un método conocido para lavar con agua. Además, el espacio de tiempo total empleado para las etapas anteriores a la trituración, esto es, el espacio de tiempo total empleado para las etapas desde el esparcimiento de un cloruro o cloruros metálicos sobre las lombrices vivas hasta acabar eliminando por lavado un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos con agua es preferiblemente no mayor de 240 minutos.

El método de trituración descrito anteriormente no está restringido y, por ejemplo, la trituración se lleva a cabo usando un homogeneizador, una batidora, un homomezclador, un triturador, una prensa francesa o similares, habitualmente a de 1 a 25°C. En vista de la supresión de la degradación de los componentes constitutivos de las lombrices, la trituración se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura baja, preferiblemente a una temperatura de 2 a 15°C.

El producto triturado obtenido triturando las lombrices se pone en una bandeja de acero inoxidable y se somete a liofilización. Aunque las enzimas contenidas en el cuerpo vivo de una lombriz no actúan sobre células vivas, actúan sobre células muertas instantáneamente.

Por lo tanto, en el procedimiento anterior, hay un riesgo de generación de gases sépticos. A fin de prevenir la generación de gases sépticos, el producto triturado preferiblemente se somete momentáneamente a congelación mediante enfriamiento rápido hasta de -18°C a -35°C para suprimir las acciones de las enzimas, seguido por liofilización.

Así, la pulverización de las lombrices sin pérdida de acciones farmacológicas necesita una congelación rápida, pero, por otra parte, no se prefiere una congelación demasiado rápida, ya que, en los casos en los que las lombrices se congelan demasiado rápidamente, las impurezas existentes junto con las proteínas, que son componentes principales de la pasta de lombrices, pueden formar puntos no congelados y no se pueden separar. Por lo tanto, la congelación se lleva a cabo a una temperatura baja de -18°C a -35°C, preferiblemente durante de 20 a 240 horas, más preferiblemente de 50 a 170 horas.

Es importante para la liofilización seleccionar las condiciones bajo las que se pueden retirar las impurezas sin permanecer junto con agua. Por lo tanto, la liofilización se lleva a cabo preferiblemente bajo control a una presión de no más de 50 Pa a una temperatura de -60°C a +90°C mientras se incrementa la temperatura de un modo escalonado durante de 10 a 60 horas.

- 5 Ejemplos del método de liofilización incluyen un método en el que el producto triturado se congela como se describió anteriormente a una temperatura de -18°C a -35°C durante de 20 a 240 horas, y la temperatura se incrementa a continuación en varias etapas dentro del intervalo de -60°C a +90°C y la presión se disminuye en varias etapas dentro del intervalo de 25 a 40 Pa, mientras se liofiliza el producto bajo vacío durante de 10 a 60 horas, obteniendo de ese modo un polvo de lombriz seco amarillo claro estéril. El polvo de lombriz seco así obtenido contiene, en 100 g del polvo, de 70 a 120 mg de arginina, de 110 a 150 mg de lisina, de 35 a 60 mg de histidina, de 55 a 80 mg de fenilalanina, de 50 a 75 mg de tirosina, de 100 a 150 mg de leucina, de 60 a 90 mg de isoleucina, de 25 a 40 mg de metionina, de 70 a 105 mg de valina, de 85 a 135 mg de alanina, de 75 a 105 mg de glicina, de 60 a 85 mg de prolina, de 210 a 300 mg de ácido glutámico, de 80 a 110 mg de serina, de 75 a 110 mg de treonina, de 150 a 220 mg de ácido aspártico, de 15 a 30 mg de triptófano y de 20 a 35 mg de cistina, aunque sus contenidos varían dependiendo del tipo de las lombrices y el lugar y el momento de la recogida de las lombrices.

Ejemplos

La presente invención se describirá ahora con más detalle. La presente invención no se restringe a los Ejemplos posteriores.

Preparación de polvo de lombriz seco

20 Ejemplo 1

Se dejó que 30 kg de *Lumbricus rubellus* vivas se mantuvieran durante 24 horas en un lugar iluminado, y la suciedad adherida a las superficies de los cuerpos se despegó, seguido por esparcir las lombrices sobre un plato plano en un grosor de aproximadamente 5 cm y esparcir 250 g de cloruro sódico uniformemente sobre las mismas. 20 minutos más tarde, las lombrices se lavaron con agua.

- 25 Posteriormente, 250 g de ácido cítrico se esparcieron sobre las lombrices de un modo similar, y lo resultante se diluyó en 15 segundos después de esto añadiendo 30 litros de agua pura. En este momento, el pH inmediatamente después de la adición de agua era 2,25, y el pH después de la dilución completa era 2,74.

Cuando se esparcía el polvo de ácido cítrico, las lombrices liberaban un fluido corporal amarillo de una vez. Después de la dilución con agua, se dejaba que las lombrices se mantuvieran en este estado durante 20 minutos.

- 30 Posteriormente, las lombrices vivas se retiraron de la solución acuosa de ácido cítrico sucia y se lavaron con agua, seguido por ser trituradas usando un homogeneizador a 10°C, para preparar una pasta de lombrices. A continuación, esta pasta de lombrices se desgasificó mediante aspiración para retirar gases contenidos en la misma, y se transfirió a una bandeja de acero inoxidable, seguido por ser enfriada momentáneamente y rápidamente hasta -35°C, temperatura a la cual la pasta de lombrices se mantenía durante 50 horas para permitir la congelación lenta.

- 35 La pasta de lombrices congelada se mantuvo a -35°C a una presión de 0 Pa durante 2 horas, y la temperatura se incrementó a continuación hasta 25°C, seguido por liofilización bajo vacío a 40 Pa durante 10 horas; a 40°C a una presión de 35 Pa durante 14 horas; a 65°C a una presión de 35 Pa durante 12 horas; y finalmente a una temperatura de 80°C a una presión de 25 Pa durante 6 horas. Mediante este tratamiento, se obtuvo un polvo de lombriz seco amarillo claro que tenía un contenido de humedad de 8% en masa.

40 Ejemplo comparativo 1

Se dejó que 30 kg de *Lumbricus rubellus* vivas se mantuvieran durante 24 horas en un lugar iluminado, y la suciedad adherida a las superficies de los cuerpos se despegó, seguido por esparcir las lombrices sobre un plato plano en un grosor de aproximadamente 5 cm y añadir 30 litros de agua a las mismas. A continuación, las lombrices se mantuvieron en este estado durante 20 minutos.

- 45 Posteriormente, las lombrices vivas se retiraron del agua y se lavaron con agua, seguido por ser trituradas usando un homogeneizador a 10°C, para preparar una pasta de lombrices. A continuación, esta pasta de lombrices se desgasificó mediante aspiración para retirar gases contenidos en la misma, y se transfirió a una bandeja de acero inoxidable, seguido por ser enfriada momentáneamente y rápidamente hasta -35°C, temperatura a la cual la pasta de lombrices se mantenía durante 50 horas para permitir la congelación lenta.

- 50 La pasta de lombrices congelada se mantuvo a -35°C a una presión de 0 Pa durante 2 horas, y la temperatura se incrementó entonces hasta 25°C, seguido por liofilización bajo vacío a 40 Pa durante 10 horas; a 40°C a una presión de 35 Pa durante 14 horas; a 65°C a una presión de 35 Pa durante 12 horas; y finalmente a una temperatura de 80°C a una presión de 25 Pa durante 6 horas. Mediante este tratamiento, se obtuvo un polvo de lombriz seco amarillo claro que tenía un contenido de humedad de 8% en masa.

Ejemplo comparativo 2

5 Se dejó que 30 kg de *Lumbricus rubellus* vivas se mantuvieran durante 24 horas en un lugar iluminado, y la suciedad adherida a las superficies de los cuerpos se despegó, seguido por esparcir las lombrices sobre un plato plano en un grosor de aproximadamente 5 cm y esparcir 250 g de ácido cítrico sobre las mismas. 15 segundos más tarde, 30 litros de agua pura se añadían a lo resultante para dilución.

Cuando se esparcía el polvo de ácido cítrico, las lombrices liberaban un fluido corporal amarillo de una vez. Después de la dilución con agua, se dejaba que las lombrices se mantuvieran en este estado durante 20 minutos.

10 Posteriormente, las lombrices vivas se retiraron de la solución acuosa de ácido cítrico sucia y se lavaron con agua, seguido por ser trituradas usando un homogeneizador a 10°C, para preparar una pasta de lombrices. A continuación, esta pasta de lombrices se desgasificó mediante aspiración para retirar gases contenidos en la misma, y se transfirió a una bandeja de acero inoxidable, seguido por ser enfriada momentáneamente y rápidamente hasta -35°C, temperatura a la cual la pasta de lombrices se mantenía durante 50 horas para permitir la congelación lenta.

15 La pasta de lombrices congelada se mantuvo a -35°C a una presión de 0 Pa durante 2 horas, y la temperatura se incrementó entonces hasta 25°C, seguido por liofilización bajo vacío a 40 Pa durante 10 horas; a 40°C a una presión de 35 Pa durante 14 horas; a 65°C a una presión de 35 Pa durante 12 horas; y finalmente a una temperatura de 80°C a una presión de 25 Pa durante 6 horas. Mediante este tratamiento, se obtuvo un polvo de lombriz seco amarillo claro que tenía un contenido de humedad de 8% en masa.

Ejemplo comparativo 3

20 Se dejó que 30 kg de *Lumbricus rubellus* vivas se mantuvieran durante 24 horas en un lugar iluminado, y la suciedad adherida a las superficies de los cuerpos se despegó, seguido por esparcir las lombrices sobre un plato plano en un grosor de aproximadamente 5 cm y esparcir 250 g de ácido cítrico sobre las mismas. A continuación, se añadieron 30 litros de agua pura a lo resultante para dilución. Cuando se esparcía el polvo de ácido cítrico, las lombrices liberaban un fluido corporal amarillo de una vez. Después de la dilución con agua, se dejaba que las lombrices se mantuvieran en este estado durante 20 minutos. Posteriormente, las lombrices vivas se retiraron de la solución acuosa de ácido cítrico sucia y se lavaron con agua, seguido por esparcirlas 250 g de cloruro sódico y mantenerlas en este estado durante 20 minutos.

25 Posteriormente, las lombrices vivas se lavaron con agua y se trituraron usando un homogeneizador a 10°C, para preparar una pasta de lombrices. A continuación, esta pasta de lombrices se desgasificó mediante aspiración para retirar gases contenidos en la misma, y se transfirió a una bandeja de acero inoxidable, seguido por ser enfriada momentáneamente y rápidamente hasta -35°C, temperatura a la cual la pasta de lombrices se mantenía durante 50 horas para permitir la congelación lenta.

30 La pasta de lombrices congelada se mantuvo a -35°C a una presión de 0 Pa durante 2 horas, y la temperatura se incrementó entonces hasta 25°C, seguido por liofilización bajo vacío a 40 Pa durante 10 horas; a 40°C a una presión de 35 Pa durante 14 horas; a 65°C a una presión de 35 Pa durante 12 horas; y finalmente a una temperatura de 80°C a una presión de 25 Pa durante 6 horas. Mediante este tratamiento, se obtuvo un polvo de lombriz seco amarillo claro que tenía un contenido de humedad de 8% en masa.

Ejemplo comparativo 4

40 Se dejó que 30 kg de *Lumbricus rubellus* vivas se mantuvieran durante 24 horas en un lugar iluminado, y la suciedad adherida a las superficies de los cuerpos se despegó, seguido por esparcir las lombrices sobre un plato plano en un grosor de aproximadamente 5 cm, mezclar 250 g de ácido cítrico con 250 g de cloruro sódico y esparcir la mezcla resultante uniformemente sobre las lombrices. 15 segundos más tarde, se añadieron 30 litros de agua a lo resultante para dilución.

45 Cuando se esparcían el polvo de ácido cítrico y el cloruro sódico, las lombrices liberaban un fluido corporal amarillo de una vez. Después de la dilución con agua, se dejaba que las lombrices se mantuvieran en este estado durante 20 minutos.

50 Posteriormente, las lombrices vivas se retiraron de la solución acuosa de ácido cítrico sucia y se lavaron con agua, seguido por ser trituradas usando un homogeneizador a 10°C, para preparar una pasta de lombrices. A continuación, esta pasta de lombrices se desgasificó mediante aspiración para retirar gases contenidos en la misma, y se transfirió a una bandeja de acero inoxidable, seguido por ser enfriada momentáneamente y rápidamente hasta -35°C, temperatura a la cual la pasta de lombrices se mantenía durante 50 horas para permitir la congelación lenta.

55 La pasta de lombrices congelada se mantuvo a -35°C a una presión de 0 Pa durante 2 horas, y la temperatura se incrementó entonces hasta 25°C, seguido por liofilización bajo vacío a 40 Pa durante 10 horas; a 40°C a una presión de 35 Pa durante 14 horas; a 65°C a una presión de 35 Pa durante 12 horas; y finalmente a una temperatura de 80°C a una presión de 25 Pa durante 6 horas. Mediante este tratamiento, se obtuvo un polvo de lombriz seco amarillo claro que tenía un contenido de humedad de 8% en masa.

Valoración de polvo de lombriz seco

Preparación de la muestra de medida

5 Se añadieron 20 ml de solución a 1 g de cada polvo de lombriz seco obtenido según se describió anteriormente, la mezcla resultante se removió a 1.500 rpm durante 1 hora. Entonces, la mezcla se centrifugó a 10.000 x g a 4°C durante 15 minutos, y el sobrenadante resultante se usó como una muestra de medida.

Método de cuantificación de proteínas

En cuanto a la cuantificación de proteínas, el cálculo se llevó a cabo según el método de Bradford (M. Bradford, Anal. Biochem., 72: 248-254, 1976).

10 Se preparó una muestra para medida de la masa proteínica para la muestra de medida anterior usando un estuche de ensayo de proteínas (Bio-Rad Laboratories, Inc.), y se midió la absorbancia a 595 nm. Usando una curva de calibración preparada separadamente usando albúmina de suero bovino (Bovine, Sigma-Aldrich Co.), el valor medido se convirtió en la masa proteínica.

Tabla 1

	Ejemplo 1	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo comparativo 4
1ª Medida	1,9	12,6	6,2	6,1	3,2
2ª Medida	2,0	11,1	6,1	5,6	2,9
3ª Medida	1,1	11,8	5,8	5,9	3,2
Media	1,7	11,8	6,0	5,9	3,1

15 Método de degradación de un sustrato de amida sintético

Según el método descrito en un documento no perteneciente a la bibliografía de patentes (Sumi, H., Okamoto, T. e Ishii, Y., Titration Method for Lumbrokinase (Lombriz Enzyme) - Fibrinolytic and Synthetic Amidolytic Activities -, Clinical Pharmacology and Therapy, 20: 347-351, 2010), se midió la actividad de degradación de un sustrato de amida sintético.

20 El sustrato de amida sintético se preparó disolviendo piroGlu-Gly-Arg-pNA (BIOPHEN CS-61(44), COSMO BIO Co., Ltd.), que es un sustrato sintético para urocinasa, en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración de 5×10^{-3} M.

25 Se añadieron 0,8 ml de tampón de solución salina de borato (BSB, por sus siglas en inglés) a 0,1 ml de la muestra de medida obtenida como se describió anteriormente, y la solución resultante se incubó durante 2 minutos, seguido por añadir 0,1 ml del sustrato de amida sintético a la solución y permitir que la reacción avanzara a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia a 405 nm y se calculó la cantidad de pNA liberada basándose en la pendiente máxima (velocidad inicial) por minuto, con un coeficiente de absorción $10,79 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2 posterior.

Además, la actividad de degradación del sustrato de amida sintético se dividió por la cantidad de proteína total para obtener la actividad específica, que se muestra en la Tabla 3 posteriormente.

30

Tabla 2

	Ejemplo 1	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo comparativo 4
1ª Medida	59,2	56,3	72,8	54,9	59,9
2ª Medida	59,5	53,6	79,2	56,0	60,5
3ª Medida	59,5	54,2	77,7	55,6	61,7
4ª Medida	63,0	56,5	82,5	65,8	66,0
5ª Medida	62,1	54,7	80,6	65,8	65,5
6ª Medida	64,9	53,8	79,7	63,0	66,3
Media	61,4	54,9	78,8	60,2	63,3

Tabla 3

	Actividad de degradación de amida sintética (nmol/ml/min)	Cantidad de proteína (mg/ml)	Actividad específica (nmol/ml/min/mg)
Ejemplo 1	61,4	1,7	36,1
Ejemplo comparativo 1	54,9	11,8	4,7
Ejemplo comparativo 2	78,8	6,0	13,1
Ejemplo comparativo 3	60,2	5,9	10,2
Ejemplo comparativo 4	63,3	3,1	20,4

5 Método de la placa de fibrina

Según el método descrito en un documento no perteneciente a la bibliografía de patentes (T. Astrup & S. Mullertz, The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity, Arch. Biochem. Biophys., 40: 346-351, 1952), se preparó una placa de fibrina, y se llevó a cabo una comparación de la actividad de disolución mediante el método de la placa de fibrina.

- 10 Se disolvió fibrinógeno (Bovine Fraction I-S, Sigma-Aldrich Co.) en tampón de solución salina de borato (pH 7,8: BSB) hasta una concentración final de 0,5%. Se añadieron 0,5 ml de trombina (para uso clínico, Fuji Pharma Co., Ltd.) a 10 ml de esta solución, para preparar una placa de fibrina.

- 15 La medida del área de disolución se llevó a cabo poniendo 30 μ l de cada muestra de medida sobre la placa y midiendo el área de la zona disuelta que aparecía después de 4 horas de incubación a 37°C. Además, se preparó una curva de calibración para tripsina (Bovine, Sigma-Aldrich Co.), que es una proteasa, y se llevó a cabo una conversión de unidades para determinar la actividad específica basándose en la cantidad de proteína en cada muestra de medida. Los resultados se muestran en la Tabla 4 posteriormente.

Tabla 4

	Área disuelta (mm ²)	Actividad en unidades de tripsina (U/ml)	Cantidad de proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
Ejemplo 1	223,3	287,2	1,7	168,9
Ejemplo comparativo 1	211,3	256,5	11,8	21,7
Ejemplo comparativo 2	272,5	462,8	6,0	77,1
Ejemplo comparativo 3	259,7	414,2	5,9	70,2
Ejemplo comparativo 4	171,6	156,0	3,1	50,3

Mediante el método de la presente invención, se puede obtener un polvo de lombriz seco de alta calidad del que se retiraban sustancias tóxicas. Además, como es evidente a partir del Ejemplo 1, el polvo de lombriz seco producido mediante el método de producción de la presente invención contiene enzimas con alta concentración.

- 5 Por otra parte, como es evidente a partir de los Ejemplos comparativos 1 y 2, la actividad enzimática en el caso en el sólo se realizaba el tratamiento con ácido cítrico era sólo de 2 a 4 veces superior que en el caso en el que el tratamiento se realizaba con agua. Además, como es evidente a partir de los resultados de los Ejemplos comparativos 2 y 3, en el caso en el que se llevaba a cabo en primer lugar el tratamiento con ácido cítrico y a continuación se llevaba a cabo el tratamiento con cloruro metálico, la actividad enzimática era casi la misma que en el caso en el que sólo se realizaba el tratamiento con ácido cítrico.

Ejemplo 2

- 15 Se dejó que 30 kg de *Lumbricus rubellus* vivas se mantuvieran durante 24 horas en un lugar iluminado, y la suciedad adherida a las superficies de los cuerpos se despegó, seguido por esparcir las lombrices sobre un plato plano en un grosor de aproximadamente 5 cm y esparcir 250 g de cloruro magnésico uniformemente sobre las mismas. 20 minutos más tarde, las lombrices se lavaron con agua.

Posteriormente, 250 ml de ácido láctico se esparcieron del mismo modo, y a continuación lo resultante se diluyó en 15 segundos añadiendo 30 litros de agua pura. Cuando se esparcía ácido láctico, las lombrices liberaban un fluido corporal amarillo de una vez. Después de la dilución con agua, se dejaba que las lombrices se mantuvieran en este estado durante 20 minutos.

- 20 Posteriormente, las lombrices vivas se retiraron de la solución acuosa de ácido láctico sucia y se lavaron con agua, seguido por ser trituradas usando un homogeneizador a 10°C, para preparar una pasta de lombrices. A continuación, esta pasta de lombrices se desgasificó mediante aspiración para retirar gases contenidos en la misma, y se transfirió a una bandeja de acero inoxidable, seguido por ser enfriada momentáneamente y rápidamente hasta -35°C, temperatura a la cual la pasta de lombrices se mantenía durante 50 horas para permitir la congelación lenta.

- 25 La pasta de lombrices congelada se mantuvo a -35°C a una presión de 0 Pa durante 2 horas, y la temperatura se incrementó entonces hasta 25°C, seguido por liofilización bajo vacío a 40 Pa durante 10 horas; a 40°C a una presión de 35 Pa durante 14 horas; a 65°C a una presión de 35 Pa durante 12 horas; y finalmente a una temperatura de 80°C a una presión de 25 Pa durante 6 horas. Mediante este tratamiento, se obtuvo un polvo de lombriz seco amarillo claro que tenía un contenido de humedad de 8% en masa.

30 Ejemplo comparativo 5

- 35 Se dejó que 30 kg de *Lumbricus rubellus* vivas se mantuvieran durante 24 horas en un lugar iluminado, y la suciedad adherida a las superficies de los cuerpos se despegó, seguido por esparcir las lombrices sobre un plato plano en un grosor de aproximadamente 5 cm, esparcir 250 ml de ácido láctico sobre las mismas del mismo modo, y a continuación diluir lo resultante en 15 segundos añadiendo 30 litros de agua pura. Cuando se esparcía ácido láctico, las lombrices liberaban un fluido corporal amarillo de una vez. Después de la dilución con agua, se dejaba que las lombrices se mantuvieran en este estado durante 20 minutos.

Posteriormente, las lombrices vivas se retiraron y se lavaron con agua, seguido por esparcir 250 g de cloruro magnésico uniformemente sobre las mismas y dejar que las lombrices se mantuvieran en este estado durante 20 minutos.

- 40 Posteriormente, las lombrices vivas se retiraron y se lavaron con agua, seguido por ser trituradas usando un homogeneizador a 10°C, para preparar una pasta de lombrices. A continuación, esta pasta de lombrices se desgasificó mediante aspiración para retirar gases contenidos en la misma, y se transfirió a una bandeja de acero inoxidable, seguido por ser enfriada momentáneamente y rápidamente hasta -35°C, temperatura a la cual la pasta de lombrices se mantenía durante 50 horas para permitir la congelación lenta.

5 La pasta de lombrices congelada se mantuvo a -35°C a una presión de 0 Pa durante 2 horas, y la temperatura se incrementó entonces hasta 25°C , seguido por liofilización bajo vacío a 40 Pa durante 10 horas; a 40°C a una presión de 35 Pa durante 14 horas; a 65°C a una presión de 35 Pa durante 12 horas; y finalmente a una temperatura de 80°C a una presión de 25 Pa durante 6 horas. Mediante este tratamiento, se obtuvo un polvo de lombriz seco amarillo claro que tenía un contenido de humedad de 8% en masa.

Valoración de polvo de lombriz seco

Preparación de la muestra de medida

10 Se añadieron 20 ml de solución salina fisiológica a 1 g de cada uno de los polvos de lombriz secos obtenidos como se describió anteriormente en el Ejemplo 2 y el Ejemplo comparativo 5, y la mezcla resultante se removió a 1.500 rpm durante 1 hora. Entonces, la mezcla se centrifugó a $10.000 \times g$ a 4°C durante 15 minutos, y el sobrenadante resultante se usó como una muestra de medida.

Método de cuantificación de proteínas

En cuanto a la cuantificación de proteínas, el cálculo se llevó a cabo según el método de Bradford (M. Bradford, Anal. Biochem., 72: 248-254, 1976).

15 Se preparó una muestra para medida de la masa proteínica para la muestra de medida anterior usando un estuche de ensayo de proteínas (Bio-Rad Laboratories, Inc.), y se midió la absorbancia a 595 nm. Usando una curva de calibración preparada separadamente usando albúmina de suero bovino (Bovine, Sigma-Aldrich Co.), el valor medido se convirtió en la masa proteínica.

Tabla 5

	Ejemplo 2	Ejemplo comparativo 5
1ª Medida	6,6	7,1
2ª Medida	7,0	7,8
3ª Medida	7,0	7,0
Media	6,9	7,3

20

Método de degradación de un sustrato de amida sintético

25 Según el método descrito en un documento no perteneciente a la bibliografía de patentes (Sumi, H., Okamoto, T. e Ishii, Y., Titration Method for Lumbrokinase (Lombriz Enzyme) - Fibrinolytic and Synthetic Amidolytic Activities -, Clinical Pharmacology and Therapy, 20: 347-351, 2010), se midió la actividad de degradación de un sustrato de amida sintético.

El sustrato de amida sintético se preparó disolviendo piroGlu-Gly-Arg-pNA (BIOPHEN CS-61(44), COSMO BIO Co., Ltd.), que es un sustrato sintético para urocinasa, en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración de 5×10^{-3} M.

30 Se añadieron 0,8 ml de tampón de solución salina de borato (BSB) a 0,1 ml de la muestra de medida obtenida como se describió anteriormente, y la solución resultante se incubó durante 2 minutos, seguido por añadir 0,1 ml del sustrato de amida sintético a la solución y permitir que la reacción avanzara a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia a 405 nm y se calculó la cantidad de pNA liberada basándose en la pendiente máxima (velocidad inicial) por minuto, con un coeficiente de absorción $10,79 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6 posterior.

35 Además, la actividad de degradación del sustrato de amida sintético se dividió por la cantidad de proteína total para obtener la actividad específica, que se muestra en la Tabla 7 posteriormente.

Además, la actividad de degradación del sustrato de amida sintético se dividió por la cantidad de proteína total para obtener la actividad específica, que se muestra en la Tabla 7 posteriormente.

Tabla 6

	Ejemplo 2	Ejemplo comparativo 5
1ª Medida	71,1	41,5
2ª Medida	73,7	41,4
3ª Medida	72,0	42,3
4ª Medida	73,6	44,4
5ª Medida	73,7	43,8
6ª Medida	70,6	41,6
Media	72,5	42,5

Tabla 7

	Actividad de degradación de amida sintética (nmol/ml/min)	Cantidad de proteína (mg/ml)	Actividad específica (nmol/ml/min/mg)
Ejemplo 2	72,5	6,9	10,5
Ejemplo Comparativo 5	42,5	7,3	5,8

5 Método de la placa de fibrina

Según el método descrito en un documento no perteneciente a la bibliografía de patentes (T. Astrup & S. Mullertz, The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity, Arch. Biochem. Biophys., 40: 346-351, 1952), se preparó una placa de fibrina, y se llevó a cabo una comparación de la actividad de disolución mediante el método de la placa de fibrina.

- 10 Se disolvió fibrinógeno (Bovine Fraction I-S, Sigma-Aldrich Co.) en tampón de solución salina de borato (pH 7,8: BSB) hasta una concentración final de 0,5%. Se añadieron 0,5 ml de trombina (para uso clínico, Fuji Pharma Co., Ltd.) a 10 ml de esta solución, para preparar una placa de fibrina.

- 15 La medida del área de disolución se llevó a cabo poniendo 30 µl de cada muestra de medida sobre la placa y midiendo el área de la zona disuelta que aparecía después de 4 horas de incubación a 37°C. Además, se preparó una curva de calibración para tripsina (Bovine, Sigma-Aldrich Co.), que es una proteasa, y se llevó a cabo una conversión de unidades para determinar la actividad específica basándose en la cantidad de proteína en cada muestra de medida. Los resultados se muestran en la Tabla 8 posteriormente.

Tabla 8

	Área disuelta (mm ²)	Actividad en unidades de tripsina (U/ml)	Cantidad de proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
Ejemplo 2	243,4	351,7	6,9	51,0
Ejemplo comparativo 5	207,4	246,6	7,3	33,8

- 20 Como es evidente a partir de la Tabla 7 y la Tabla 8 anteriores, tanto en el método de degradación del sustrato de amida sintético como en el método de la placa de fibrina, la actividad específica de la enzima era aproximadamente dos veces superior en los casos en los que se formaba el ambiente incómodo para las lombrices mediante la adición de cloruro magnésico (cloruro metálico) y ácido láctico (ácido hidroxycarboxílico) en ese orden, en comparación con los casos en los que estos se añadían en el orden inverso. Así, se podría confirmar que, incluso en casos en los que se usan un cloruro o cloruros metálicos distintos al cloruro sódico y un ácido o ácidos hidroxycarboxílicos distintos al ácido cítrico, se puede obtener un polvo de lombriz que tiene una alta actividad enzimática añadiendo el cloruro o los cloruros metálicos y el ácido o los ácidos hidroxycarboxílicos en ese orden.
- 25

Aplicabilidad industrial

5 Un polvo de lombriz seco producido mediante el método de la presente invención es útil como un agente para la regulación de la presión sanguínea, un agente antihiperlipémico, un agente terapéutico para la diabetes mellitus, un agente trombolítico y/o similares, de forma parecida a polvos de lombriz secos producidos por medios convencionales. Además, extrayendo este polvo con agua pura, un alcohol o similares y centrifugando la solución resultante, seguido por fraccionar el sobrenadante según el peso molecular, el producto resultante se puede usar como un componente eficaz de un producto farmacéutico, un cosmético o un suplemento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir polvo de lombriz seco, que comprende:

poner en contacto una lombriz viva con un cloruro o cloruros de al menos un metal seleccionado del grupo que consiste en potasio, sodio, magnesio y calcio; y

5 posteriormente poner en contacto dicha lombriz viva con polvo de un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos y diluir la mezcla resultante con agua para ajustar el pH hasta de 2 a 5, seguido por dejar que dicha lombriz viva se mantenga durante de 3 a 180 minutos, lavar dicha lombriz viva con agua, triturar la lombriz viva lavada y liofilizar el producto triturado obtenido.

2. Un método para producir polvo de lombriz seco, que comprende:

10 poner en contacto una lombriz viva con un cloruro o cloruros de un metal o metales seleccionados del grupo que consiste en potasio, sodio, magnesio y calcio; y

posteriormente embeber dicha lombriz viva en una solución acuosa de un ácido o ácidos hidroxicarboxílicos cuyo pH está ajustado hasta de 2 a 5, seguido por dejar que dicha lombriz viva se mantenga durante de 3 a 180 minutos, lavar dicha lombriz viva con agua, triturar la lombriz viva lavada y liofilizar el producto triturado obtenido.

15 3. El método para producir polvo de lombriz seco según la reivindicación 1, en el que se deja que dicha lombriz viva se mantenga en un lugar iluminado durante de 10 a 50 horas y la suciedad adherida a la superficie del cuerpo se despega, antes de poner en contacto con dicho cloruro o cloruros de un metal o metales.

20 4. El método para producir polvo de lombriz seco según la reivindicación 2, en el que se deja que dicha lombriz viva se mantenga en un lugar iluminado durante de 10 a 50 horas y la suciedad adherida a la superficie del cuerpo se despega, antes de poner en contacto con dicho cloruro o cloruros de un metal o metales.

5. El método para producir polvo de lombriz seco según la reivindicación 1, en el que dicha liofilización se lleva a cabo congelando dicho producto triturado a de -18°C a -35°C durante de 20 a 240 horas y a continuación liofilizando el producto resultante bajo vacío.

25 6. El método para producir polvo de lombriz seco según la reivindicación 2, en el que dicha liofilización se lleva a cabo congelando dicho producto triturado a de -18°C a -35°C durante de 20 a 240 horas y a continuación liofilizando el producto resultante bajo vacío.

7. El método para producir polvo de lombriz seco según la reivindicación 1, en el que dicho cloruro de un metal es cloruro sódico.

30 8. El método para producir polvo de lombriz seco según la reivindicación 2, en el que dicho cloruro de un metal es cloruro sódico.

9. El método para producir polvo de lombriz seco según la reivindicación 1, en el que dicho ácido o ácidos hidroxicarboxílicos es/son al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, ácido málico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido malónico y ácido succínico.

35 10. El método para producir polvo de lombriz seco según la reivindicación 2, en el que dicho ácido o ácidos hidroxicarboxílicos es/son al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, ácido málico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido malónico y ácido succínico.