



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 381 835**

⑤1 Int. Cl.:
A61K 36/899 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **06767822 .7**

⑨6 Fecha de presentación : **04.07.2006**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1941895**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2008**

⑤4 Título: **Agente de proliferación celular o agente de reparación tisular derivado del arroz blanco.**

③0 Prioridad: **04.07.2005 JP 2005-195473**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2012

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2012

⑦3 Titular/es: **Takahito Tokuyama**
2212 Utazu-Cho
Ayauta-Gun, Kagawa 7690200, JP

⑦2 Inventor/es: **Tokuyama, Takahito**

⑦4 Agente/Representante:
Fúster Olaguibel, Gustavo Nicolás

ES 2 381 835 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

Agente de proliferación celular o agente de reparación tisular derivado del arroz blanco.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar agentes de proliferación celular y agentes de reparación tisular que contienen un principio derivado del arroz blanco como principio activo, útil, por ejemplo, en el campo de la regeneración tisular.

10

Antecedentes de la técnica

Actualmente, se requieren técnicas capaces de proliferar células, tales como células diferenciadas y células madre, a gran escala en un corto período de tiempo, especialmente en el campo de la medicina regeneradora. En la medicina regeneradora se adoptan procedimientos en los que las células autólogas (en particular, células madre), recogidas principalmente de pacientes, se cultivan, se proliferan y/o se diferencian extracorporalmente, y se transplantan los tejidos generados. Haciendo esto, con objeto de minimizar el agravamiento de las enfermedades de los pacientes, deben proliferarse *in vitro* o de otro modo diversas células tales como células diferenciadas y células madre, en grandes cantidades en un período corto de tiempo. Además, cuando los tejidos se lesionan, junto con la proliferación de las células implicadas en dichos tejidos en grandes cantidades en un corto período de tiempo, las actividades de migración de dichas células deben incrementarse con objeto de reparar eficientemente los tejidos.

20

Por otro lado, los presentes inventores, en vista de que la fauna y la flora se llevan bien entre sí, han realizado investigaciones centradas en el arroz blanco, que es nuestro principal comestible y tiene la mayor seguridad. Casualmente, durante dichas investigaciones, los inventores han encontrado que los extractos acuosos y similares del material tienen excelentes funciones de proliferación celular y de reparación tisular, y ya han depositado una solicitud de patente relativa al asunto en cuestión (Referencia de Patente 1).

25

Referencia de Patente 1: PCT/JP2005/000261.

30

Desvelación de la invención**Problemas que debe resolver la invención**

Es el objeto de la presente invención mejorar adicionalmente los extractos acuosos y similares derivados del arroz blanco descritos anteriormente para proporcionar agentes de proliferación celular y de reparación tisular más eficaces.

35

Medios para resolver los problemas

Como resultado de realizar modificaciones desde varias perspectivas a partir de materias primas y/o condiciones de procesos, los presentes inventores han averiguado que los extractos acuosos y similares derivados del arroz blanco descritos anteriormente contienen sustancias que inhiben las funciones de proliferación celular y de reparación tisular, y que dichas sustancias pueden eliminarse realizando un tratamiento predeterminado de los extractos acuosos y similares derivados del arroz blanco descritos anteriormente, para conseguir satisfactoriamente las invenciones (1) a (10), a continuación.

45

La presente invención (1) es un procedimiento para producir un agente de proliferación celular que contiene, como principio activo, una disolución interna producida mediante la diálisis de un producto tratado con agua de una materia prima de arroz que incluye esencialmente una fracción de arroz blanco con una membrana de diálisis de 8 K.

50

La presente invención (2) es un procedimiento para producir el agente de proliferación celular según la invención (1) en el que la materia prima de arroz es arroz blanco, arroz integral, arroz germinado, fibra blanca y una combinación de uno o más de los mismos.

La presente invención (3) es un procedimiento para producir el agente de proliferación celular según la invención (1) o (2) en el que el producto tratado con agua es un extracto acuoso de la materia prima de arroz.

55

La presente invención (4) es un procedimiento para producir el agente de proliferación celular según una cualquiera de las invenciones (1) a (3) en el que el producto tratado con agua es un producto sacarificado de la materia prima de arroz o del extracto acuoso.

60

La presente invención (5) es un procedimiento para producir el agente de proliferación celular según una cualquiera de las invenciones (1) a (4) en el que el producto tratado con agua es un producto fermentado con alcohol o un producto fermentado con un ácido orgánico de la materia prima de arroz, del extracto acuoso o del producto sacarificado.

65

La presente invención (6) es un procedimiento para producir un agente de reparación tisular que contiene, como principio activo, una disolución interna producida mediante la diálisis de un producto tratado con agua de una materia prima de arroz que incluye esencialmente una fracción de arroz blanco con una membrana de diálisis de 8 K.

La presente invención (7) es un procedimiento para producir el agente de reparación tisular según la invención (6) en el que la materia prima de arroz es arroz blanco, arroz integral, arroz germinado, fibra blanca y una combinación de uno o más de los mismos.

La presente invención (8) es un procedimiento para producir el agente de reparación tisular según la invención (6) o (7) en el que el producto tratado con agua es un extracto acuoso de la materia prima de arroz.

La presente invención (9) es un procedimiento para producir el agente de reparación tisular según una cualquiera de las invenciones (6) a (8) en el que el producto tratado con agua es un producto sacarificado de la materia prima de arroz o del extracto acuoso.

La presente invención (10) es un procedimiento para producir el agente de reparación tisular según una cualquiera de las invenciones (6) a (9) en el que el producto tratado con agua es un producto fermentado con alcohol o un producto fermentado con un ácido orgánico de la materia prima de arroz, del extracto acuoso o del producto sacarificado.

Ahora se definirán los términos según se usan en este documento con respecto a sus significados. Por conveniencia, algunos de los términos se definirán con respecto a sus significados en Mejor modo de llevar a cabo la invención. En primer lugar, “celular” en “agente de proliferación celular” es un concepto que engloba tanto células diferenciadas como células madre. Aquí, “células diferenciadas” se refiere a células especializadas en función y morfología (por ejemplo, células musculares, células nerviosas y similares) que, al contrario que las células madre, tienen poca o ninguna multipotencialidad. Algunos ejemplos de células diferenciadas incluyen células epidérmicas, células parenquimatosas pancreáticas, células de los conductos pancreáticos, células hepáticas, células sanguíneas, células miocárdicas, células musculoesqueléticas, osteoblastos, hemocitoblastos musculoesqueléticos, células nerviosas, células endoteliales vasculares, cromocitos, células musculares lisas, adipocitos, células óseas y células cartilaginosas. “Células madre” se refiere a células que tienen la capacidad de replicarse de forma autónoma y son multipotenciales, que son capaces de regenerarse cuando se lesionan los tejidos, incluyendo tanto células madre embrionarias como células madre tisulares (células madre específicas tisulares y células madre somáticas). Aquí, “células madre embrionarias” se refiere a células madre pluripotenciales derivadas de embriones tempranos. También, “células madre tisulares” se refiere a células que, al contrario que las células madre embrionarias, están limitadas en la dirección de diferenciación. Se encuentran en ubicaciones específicas en los tejidos y tienen estructuras intracelulares no diferenciadas, y pueden clasificarse en células madre ectodérmicas (encontradas principalmente en el cerebro; células madre nerviosas), mesodérmicas (encontradas principalmente en la médula ósea; células madre vasculares, células madre hematopoyéticas y células madre mesenquimatosas) y endodérmicas (encontradas principalmente en los órganos internos; células madre hepáticas y células madre pancreáticas). Además, las células pueden proceder de cualquier organismo (por ejemplo, vertebrados e invertebrados). Sin embargo, son preferibles las células procedentes de vertebrados, son más preferibles las procedentes de mamíferos (por ejemplo, primates y roedores), particularmente preferibles son las procedentes de primates, y las más preferibles son las procedentes de seres humanos.

“Tisular” en “agente de reparación tisular” se refiere a un grupo de células con ciertas acciones similares dentro del grupo, algunos ejemplos de los cuales incluyen partes de órganos internos. Aquí, “órgano” se refiere a una estructura con una única morfología independiente en la que uno o más tejidos se combinan para proporcionar ciertas funciones. Por ejemplo, puede mencionarse el estómago, el hígado, los intestinos, el páncreas, los pulmones, la tráquea, la nariz, el corazón, las arterias, las venas, los nódulos linfáticos (sistema linfático), el timo, el ovario, los ojos, los oídos, la lengua y la piel. Además, los tejidos pueden proceder de cualquier organismo (por ejemplo, vertebrados e invertebrados). Sin embargo, son preferibles los tejidos procedentes de vertebrados, son más preferibles los procedentes de mamíferos (por ejemplo, primates y roedores), particularmente preferibles son los procedentes de primates, y los más preferibles son los procedentes de seres humanos.

“Producto tratado con agua” se refiere a un producto procesado hecho de materia prima de arroz usando agua, algunos ejemplos de los cuales incluyen extractos acuosos de materias primas de arroz, productos sacarificados en presencia de agua (por ejemplo, materias primas de arroz sacarificadas con la adición de agua y extractos acuosos sacarificados de materias primas de arroz), productos fermentados en presencia de agua (por ejemplo, materias primas de arroz fermentadas con la adición de agua, productos fermentados de extractos acuosos de materias primas de arroz y productos fermentados de extractos acuosos sacarificados de materias primas de arroz). Aquí, “agua” se refiere a un medio acuoso que comprende esencialmente agua e incluye agua y mezclas de agua y un alcohol.

“Extracto acuoso” se refiere a un tratamiento físico (por ejemplo, exprimir o presionar y calentar), a un tratamiento químico (por ejemplo, un tratamiento con ácidos y álcalis) y a un tratamiento biológico (bioquímico) (por ejemplo, moho koji, tratamiento microbiano y tratamiento enzimático) llevado a cabo solo o en combinación. Por ejemplo, pueden mencionarse las materias primas de arroz con agua añadida, las materias primas de arroz tratadas con un ácido o un álcali, las materias primas de arroz con agua añadida tratadas con una enzima o moho koji (antes o junto con la extracción), aquellas realizadas mediante dichos tratamientos con o sin calentamiento. Según se describió anteriormente, dado que el “extracto acuoso” engloba aquellos tratados con una enzima sacarificante o con moho koji, incluye productos sacarificados. Dichos productos sacarificados son, sin embargo, un concepto diferente al de los “productos sacarificados” descritos anteriormente.

“Que contiene, como principio activo” significa que contiene un principio relevante hasta tal punto que pueden proporcionarse efectos de proliferación celular o de reparación tisular, incluyendo no sólo el caso en el que el principio

forma parte de un agente de proliferación celular o de reparación tisular, sino también el caso en el que el principio forma el agente de proliferación celular o de reparación tisular en su totalidad.

5 “Membrana de diálisis de 8 K” en “una disolución interna producida mediante diálisis con una membrana de diálisis de 8 K” se refiere a la membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por. La presente invención no está limitada a las formas de realización en las que se usa la mencionada membrana de diálisis, e incluye otras formas de realización en las que se usan otras membranas de diálisis o se usan otros procedimientos para el tratamiento en lugar de la diálisis, siempre que esté contenido el principio activo que se obtiene cuando se usa la mencionada membrana de diálisis. Los pesos moleculares de este documento se basan en el tamaño de poro de las
10 membranas de diálisis.

“Fermentación ácida orgánica” se refiere a la fermentación con ácido acético y a la fermentación con ácido láctico, por ejemplo.

15 Efecto de la invención

Según la presente invención, dado que las sustancias que inhiben la proliferación celular y la reparación tisular son eliminadas en su mayoría, los efectos de proliferación celular y de reparación tisular son bastante mayores (véanse los Ejemplos) en comparación con los que pueden proporcionar los extractos acuosos convencionales y similares procedentes del arroz. Además, dado que el arroz blanco, como comestible principal, es la materia prima, la bioseguridad es extremadamente elevada. Por lo tanto, no sólo son posibles aplicaciones *in vitro* en las que las células se cultivan y se devuelven al cuerpo, sino que también son posibles aplicaciones *in vivo* en las que la administración se realiza directamente en un cuerpo (por ejemplo, mediante administración por vía oral o transcutánea). Además, es extremadamente significativo que se haya encontrado un nuevo uso para el arroz y que se espere un aumento en su consumo por la mejora de la imagen del arroz, en el momento actual en el que hay superproducción de arroz.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

30 “Materia prima de arroz que incluye esencialmente una fracción de arroz blanco” según la presente invención no está limitada particularmente, siempre que contenga al menos una fracción de arroz blanco (fracción de fibra blanca) y sea un concepto que englobe no sólo al arroz blanco, al arroz integral y al arroz germinado, sino también a la fibra blanca sola y a una mezcla de fibra blanca y fibra roja. Aquí, arroz blanco y arroz integral se refieren al arroz integral y al arroz blanco de arroz no glutinoso, al arroz glutinoso (*mochigome*) y similares, independientemente de la variedad, tal como japónica o indica. También, fibra blanca se refiere a la fracción de fibra blanca del arroz producida a o por
35 debajo del 92% de blanqueo, y puede usarse cualquier fracción dentro de este intervalo como materia prima (por ejemplo, toda la fibra blanca producida a o por debajo del 92% de blanqueo, la fibra blanca producida sólo a entre el 92 y el 80%, la fibra blanca producida a o por debajo del 60%). La fibra roja se refiere a una fracción de arroz producida a o por debajo del 92% de blanqueo. Dado que el principio activo es estable frente al calor y la luz, la materia prima descrita anteriormente puede someterse a un tratamiento, tal como inmersión, vaporización, tostado (de cualquier tipo, tal como tostado con arena, tostado en rejilla y tostado con aire caliente), tostado al vapor, modificaciones superficiales tales como liofilización, modificaciones ópticas tales como irradiación con radiación ultravioleta, tostado presurizado tal como arroz salteado así como fritura.

45 Cuando se produce arroz germinado, se sumerge el arroz con los botones embrionarios en agua o se pulveriza con agua para germinarlos. Las temperaturas de germinación son entre 5 y 70°C. Sin embargo, una vez terminados, la temperatura o la duración no importa. Si el agua supone un peligro de putrefacción durante la germinación, debería sustituirse preferiblemente el agua o tomarse algunas medidas antisépticas, con objeto de prevenir dicha acción séptica. Aquí, la germinación se refiere al proceso completo desde inmediatamente antes de la germinación hasta la finalización de la germinación. El arroz germinado se lava meticulosamente antes de su uso. Al mismo tiempo puede secarse.

50 Para el tratamiento con agua (por ejemplo, la extracción con agua), la materia prima de arroz debería ser preferiblemente granular o pulverulenta. Si no es granular o pulverulenta, el tiempo de tratamiento debería ser mayor. Las formas de realización del tratamiento con agua se describirán a continuación.

55 En primer lugar, se describirá con detalle la extracción con agua. Cuando se extrae con agua la materia prima de arroz, la extracción puede realizarse eficientemente a elevadas temperaturas, pero también puede realizarse a temperaturas lo suficientemente bajas. Cuando las temperaturas descienden a 40°C o por debajo, es deseable, sin embargo, que el pH se vuelva ácido o alcalino, o que se añada un conservante o alcohol, de forma que no se pudra la materia prima de arroz. La duración de la extracción puede ser mayor o menor siempre que pueda extraerse el principio activo, y puede determinarse dependiendo de la temperatura de extracción. También, la extracción con agua puede llevarse a cabo bajo presión o a presión normal, o puede llevarse a cabo a presión reducida. Para la extracción con agua, la principal preocupación es la gelatinización. Una vez que se produce la gelatinización, no solo se deteriora la eficacia de la extracción, sino que las operaciones prácticas serán asimismo extremadamente dificultosas. Con objeto de evitar que ocurra puede añadirse amilasa para la reacción o ácido clorhídrico o similares para la acidificación para degradar el almidón. Con estas medidas el problema puede resolverse bien, sin ningún problema práctico.

Dado que los principios activos del extracto acuoso pueden ser estables en ácidos y álcalis, también puede llevarse a cabo eficazmente la extracción por descomposición ácida o la extracción por descomposición alcalina. En ese caso,

se llevan a cabo, según sea necesario, una neutralización y una desalinización. Además, la materia prima de arroz puede degradarse enzimáticamente o utilizarse moho koji. La degradación enzimática, según se usa aquí, se refiere a utilizar una o más enzimas que actúan sobre el arroz, tal como enzimas de degradación del almidón (enzimas licuefactantes y enzimas sacarificantes), enzimas de degradación de proteínas, enzimas de degradación de grasas, enzimas de degradación de fibra, enzimas de degradación de lignina y enzimas de degradación de pectinas. Por ejemplo, pueden utilizarse enzimas de degradación de almidón (enzimas licuefactantes y/o enzimas sacarificantes) o moho koji durante la extracción para la sacarificación. Tampoco importa el tipo de moho koji o la variedad de arroz. Para la extracción, dichas enzimas y el moho koji pueden utilizarse antes o simultáneamente con la extracción.

A continuación se describirán los productos sacarificados. Los productos sacarificados se elaboran mediante el uso de enzimas de degradación del almidón o de moho koji con materias primas de arroz en presencia de agua, o usando las enzimas de degradación del almidón o el moho koji en el extracto. Aquí, las enzimas de degradación del almidón se refiere a enzimas licuefactantes y/o enzimas sacarificantes. De nuevo, no importa el tipo de moho koji o la variedad de arroz. También, el uso de enzimas de degradación del almidón en el extracto incluye uno en el que el propio extracto ya está sacarificado en parte (por ejemplo, cuando se usa una enzima licuefactante durante la etapa de extracción) y esto significa que dicho producto parcialmente sacarificado está sacarificado adicionalmente.

A continuación se describirán con detalle productos fermentados. Los productos fermentados se elaboran fermentando materias primas de arroz en presencia de agua, fermentando el extracto acuoso o fermentando el producto sacarificado. Aquí, la fermentación se refiere a una fermentación alcohólica o a una fermentación con un ácido orgánico (tal como una fermentación con ácido láctico). La fermentación puede llevarse a cabo no sólo después del tratamiento descrito anteriormente (tratamiento de extracción acuosa y tratamiento de sacarificación), sino también simultáneamente con dicho tratamiento. La fermentación simultánea con el tratamiento de extracción se corresponde con "fermentar una materia prima de arroz en presencia de agua", y la fermentación simultánea con la sacarificación se corresponde con "fermentar el extracto acuoso". Aquí, para que la fermentación alcohólica proporcione mayores efectos de proliferación celular o de reparación tisular, es más preferible una sacarificación y fermentación secuencial a una sacarificación y fermentación simultánea, como un proceso para producir sake. También puede eliminarse el azúcar aireando la fermentación usando levaduras, precipitación con alcohol o similares. Además, cuando se lleva a cabo una fermentación con un ácido orgánico, los efectos de proliferación celular o de reparación tisular se incrementarán adicionalmente. En particular, es preferible la fermentación con ácido láctico.

El extracto acuoso obtenido según se describió anteriormente se trata con una membrana de diálisis de 8 K. La disolución interna contiene principios de proliferación celular y de reparación tisular de 8 K o más, mientras que la disolución externa contiene principios de bloqueo de la proliferación celular y la reparación tisular a o por debajo de ese peso molecular. Los principios de proliferación celular y de reparación tisular tienen un peso molecular de preferiblemente 10 K o más, más preferiblemente de 12 K o más.

Los agentes de proliferación celular y de reparación tisular preparados según la presente invención se administran a sujetos (células, tejidos, órganos internos como individuos) tal y como están, concentrados o diluidos o en una mezcla con otros ingredientes. Aquí, cuando se extraen las células de un cuerpo humano y se proliferan antes de devolverlas al cuerpo humano, dichas células pueden ser singénicas (autólogas), alogénicas (no autólogas) o xenogénicas. Cuando se presupone rechazo, se prefieren las células autólogas.

Ejemplos

Ejemplo de producción 1

Se molió arroz blanco en un molino para obtener 1 kg de arroz blanco molido. Al molido se añadieron 5 g de una enzima licuefactante y 3 L de agua, que se dejó reposar a 60°C durante cuatro horas. Subsiguientemente, se calentó a una elevada temperatura, y después de enfriar se llevó a cabo una separación sólido-líquido usando un filtro para obtener 2,5 L de filtrado. El filtrado se calentó a 85°C durante 30 minutos, y después de enfriar se dializaron 3 ml del filtrado a 4°C durante 12 horas, con 2 L de tampón PBS (pH 7,5) como disolución externa, usando una membrana de diálisis (membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por). La disolución interna dializada se concentró entonces hasta la concentración original para obtener el producto de este ejemplo.

Ejemplo de producción 2

Se molió arroz blanco en un molino para obtener 1 kg de arroz blanco molido. Al molido se añadieron 250 g de moho koji y 3 L de agua, que se dejó reposar a 55°C durante 16 horas. Subsiguientemente, se llevó a cabo una separación sólido-líquido usando un filtro para obtener 2,6 L de filtrado. El filtrado se calentó a 85°C durante 30 minutos, y después de enfriar se dializaron 3 ml del filtrado a 4°C durante 12 horas, con 2 L de tampón PBS (pH 7,5) como disolución externa, usando una membrana de diálisis (membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por). La disolución interna dializada se concentró entonces hasta la concentración original para obtener el producto de este ejemplo.

ES 2 381 835 T3

Ejemplo de producción 3

Se molió arroz blanco en un molino para obtener 1 kg de arroz blanco molido. Al molido se añadieron 5 g de una enzima de degradación del almidón y 3 L de agua, que se dejó reposar a 55°C durante 16 horas. Subsiguientemente, se llevó a cabo una separación sólido-líquido usando un filtro para obtener 2,5 L de filtrado. El filtrado se calentó a 85°C durante 30 minutos, y después de enfriar se dializaron 3 ml del filtrado a 4°C durante 12 horas, con 2 L de tampón PBS (pH 7,5) como disolución externa, usando una membrana de diálisis (membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por). La disolución interna dializada se concentró entonces hasta la concentración original para obtener el producto de este ejemplo.

Ejemplo de producción 4

Se molió arroz blanco en un molino para obtener 1 kg de arroz blanco molido. Al molido se añadieron 5 g de una enzima de degradación de enzimas y 3 L de agua, que se dejó reposar a 50°C durante 16 horas. Subsiguientemente, se llevó a cabo una separación sólido-líquido usando un filtro para obtener 2,2 L de filtrado. El filtrado se calentó a 85°C durante 30 minutos, y después de enfriar se dializaron 3 ml del filtrado a 4°C durante 12 horas, con 2 L de tampón PBS (pH 7,5) como disolución externa, usando una membrana de diálisis (membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por). La disolución interna dializada se concentró entonces hasta la concentración original para obtener el producto de este ejemplo.

Ejemplo de producción 5

Se molió arroz blanco en un molino para obtener 1 kg de arroz blanco molido. Al molido se añadieron 5 g de una enzima de degradación de degradación de grasas y 3 L de agua, que se dejó reposar a 50°C durante 16 horas. Subsiguientemente, se llevó a cabo una separación sólido-líquido usando un filtro para obtener 2,1 L de filtrado. El filtrado se calentó a 85°C durante 30 minutos, y después de enfriar se dializaron 3 ml del filtrado a 4°C durante 12 horas, con 2 L de tampón PBS (pH 7,5) como disolución externa, usando una membrana de diálisis (membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por). La disolución interna dializada se concentró entonces hasta la concentración original para obtener el producto de este ejemplo.

Ejemplo de producción 6

Se molió arroz blanco en un molino para obtener 1 kg de arroz blanco molido. Al molido se añadieron 5 g de una enzima licuefactante y 3 L de agua, que se dejó reposar a 60°C durante cuatro horas. Subsiguientemente, se calentó a una elevada temperatura, y después de enfriar se añadieron 5 g de una enzima de degradación del almidón, seguido de reposo a 55°C durante cuatro horas. Subsiguientemente, se llevó a cabo una separación sólido-líquido usando un filtro para obtener 2,6 L de filtrado. El filtrado se calentó a 85°C durante 30 minutos, y después de enfriar se dializaron 3 ml del filtrado a 4°C durante 12 horas, con 2 L de tampón PBS (pH 7,5) como disolución externa, usando una membrana de diálisis (membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por). La disolución interna dializada se concentró entonces hasta la concentración original para obtener el producto de este ejemplo.

Ejemplo de producción 7

Se molió arroz blanco en un molino para obtener 1 kg de arroz blanco molido. Al molido se añadieron 5 g de una enzima licuefactante y 3 L de agua, que se dejó reposar a 60°C durante cuatro horas. Subsiguientemente, se calentó a una elevada temperatura, y después de enfriar se añadieron 5 g de una enzima de degradación de grasas, seguido de reposo a 55°C durante cuatro horas. Subsiguientemente, se llevó a cabo una separación sólido-líquido usando un filtro para obtener 2,5 L de filtrado. El filtrado se calentó a 85°C durante 30 minutos, y después de enfriar se dializaron 3 ml del filtrado a 4°C durante 12 horas, con 2 L de tampón PBS (pH 7,5) como disolución externa, usando una membrana de diálisis (membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por). La disolución interna dializada se concentró entonces hasta la concentración original para obtener el producto de este ejemplo.

Ejemplo de producción 8

Se molió arroz blanco en un molino para obtener 1 kg de arroz blanco molido. Al molido se añadieron 5 g de una enzima licuefactante y 3 L de agua, que se dejó reposar a 60°C durante cuatro horas. Subsiguientemente, se calentó a una elevada temperatura, y después de enfriar se añadieron 5 g de una enzima de degradación de fibra, seguido de reposo a 55°C durante cuatro horas. Subsiguientemente, se llevó a cabo una separación sólido-líquido usando un filtro para obtener 2,5 L de filtrado. El filtrado se calentó a 85°C durante 30 minutos, y después de enfriar se dializaron 3 ml del filtrado a 4°C durante 12 horas, con 2 L de tampón PBS (pH 7,5) como disolución externa, usando una membrana de diálisis (membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por). La disolución interna dializada se concentró entonces hasta la concentración original para obtener el producto de este ejemplo.

ES 2 381 835 T3

Ejemplo de producción 9

Se molió arroz blanco en un molino para obtener 1 kg de arroz blanco molido. Al molido se añadieron 3 L de ácido clorhídrico 1/10 N, que se agitó cuidadosamente y se dejó reposar durante 24 horas. Subsiguientemente, se llevó a cabo una separación sólido-líquido usando un filtro, y después se llevó a cabo una neutralización con sosa cáustica para obtener 2,3 L de un extracto el líquido. El extracto se calentó a 85°C durante 30 minutos, y después de enfriar se dializaron 3 ml del filtrado a 4°C durante 12 horas, con 2 L de tampón PBS (pH 7,5) como disolución externa, usando una membrana de diálisis (membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por). La disolución interna dializada se concentró entonces hasta la concentración original para obtener el producto de este ejemplo.

Ejemplo de producción 10

Se molió arroz blanco en un molino para obtener 1 kg de arroz blanco molido. Al molido se añadieron 3 L de etanol al 95%, que se agitó cuidadosamente y se dejó reposar durante cuatro días. Subsiguientemente, se llevó a cabo una separación sólido-líquido usando un filtro, para obtener 2 L de un extracto el líquido. Se añadieron 4 L de agua al filtrado y el etanol se destiló en un evaporador rotatorio hasta 2 L. Se calentó a 85°C durante 30 minutos, y después de enfriar se dializaron 3 ml del filtrado a 4°C durante 12 horas, con 2 L de tampón PBS (pH 7,5) como disolución externa, usando una membrana de diálisis (membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por). La disolución interna dializada se concentró entonces hasta la concentración original para obtener el producto de este ejemplo.

Ejemplo de producción 11

Se molió arroz blanco en un molino para obtener 1 kg de arroz blanco molido. Al molido se añadieron 5 g de una enzima licuefactante y 3 L de agua, que se dejó reposar a 60°C durante cuatro horas. Subsiguientemente, se calentó a una elevada temperatura, y después de enfriar se añadieron 5 g de una enzima de degradación de almidón, seguido de reposo a 55°C durante cuatro horas. Después de enfriar, se añadió levadura y se llevó a cabo una fermentación durante 15 días. Subsiguientemente, se llevó a cabo una separación sólido-líquido usando un filtro para obtener 2,5 L de filtrado. El filtrado se calentó a 85°C durante 30 minutos, y después de enfriar se dializaron 3 ml del filtrado a 4°C durante 12 horas, con 2 L de tampón PBS (pH 7,5) como disolución externa, usando una membrana de diálisis (membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por). La disolución interna dializada se concentró entonces hasta la concentración original para obtener el producto de este ejemplo.

Ejemplo de producción 12

Se molió arroz blanco en un molino para obtener 1 kg de arroz blanco molido. Al molido se añadieron 5 g de una enzima licuefactante y 3 L de agua, que se dejó reposar a 60°C durante cuatro horas. Subsiguientemente, se calentó a una elevada temperatura, y después de enfriar se añadieron 5 g de una enzima de degradación de almidón, seguido de reposo a 55°C durante cuatro horas. Después de enfriar se llevó a cabo una esterilización térmica, y después de enfriar se añadieron bacterias productoras de ácido láctico, seguido de una fermentación a 37°C durante dos días. Subsiguientemente, se llevó a cabo una separación sólido-líquido usando un filtro para obtener 2,3 L de filtrado. El filtrado se calentó a 85°C durante 30 minutos, y después de enfriar se dializaron 3 ml del filtrado a 4°C durante 12 horas, con 2 L de tampón PBS (pH 7,5) como disolución externa, usando una membrana de diálisis (membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por). La disolución interna dializada se concentró entonces hasta la concentración original para obtener el producto de este ejemplo.

Ejemplo de producción 13

Se molió arroz blanco en un molino para obtener 1 kg de arroz blanco molido. Al molido se añadieron 5 g de una enzima licuefactante y 3 L de agua, que se dejó reposar a 60°C durante cuatro horas. Subsiguientemente, se calentó a una elevada temperatura, y después de enfriar se añadieron 5 g de una enzima de degradación de almidón, seguido de reposo a 55°C durante cuatro horas. Subsiguientemente, se añadieron 150 ml de etanol al 95% y bacterias productoras de ácido acético, y se llevó a cabo una fermentación durante 15 días. Subsiguientemente, se llevó a cabo una separación sólido-líquido usando un filtro para obtener 2,4 L de filtrado. El filtrado se calentó a 85°C durante 30 minutos, y después de enfriar se dializaron 3 ml del filtrado a 4°C durante 12 horas, con 2 L de tampón PBS (pH 7,5) como disolución externa, usando una membrana de diálisis (membrana Spectra Biotech/Por 2.1, MWCO 8000, 00016 mm, elaborada por Spectra/Por). La disolución interna dializada se concentró entonces hasta la concentración original para obtener el producto de este ejemplo.

ES 2 381 835 T3

Ejemplo de prueba 1

Prueba de proliferación de osteoblastos

Células usadas: osteoblastos (osteoblastos de ratón MC3T3-E1).

Medio usado: DMEM.

Muestra usada: Ejemplo de producción 12.

Se sembraron osteoblastos en una microplaca de 12 pocillos a una concentración del 10% y se llevó a cabo un precultivo a 37°C con un 5% de CO₂ hasta que las células se adhirieron. Tras confirmar la adhesión de las células, se añadió una muestra al medio a una concentración predeterminada, y se llevó a cabo el cultivo a 37°C con un 5% de CO₂. A continuación se contó el número de células con el tiempo con un micrómetro ocular (ocular x10, objetivo x4, 1 mm x 1 mm) usando un microscopio invertido. Las mediciones se realizaron en tres puntos en un pocillo y se promediaron para proporcionar un valor de medición. Para comparar, también se tomaron medidas en una muestra antes de la diálisis. Los resultados se muestran en la Fig. 1 (antes de la diálisis) y en la Fig. 2 (después de la diálisis). Aunque no se especifica, se obtuvieron resultados similares para otros Ejemplos de producción.

Ejemplo de prueba 2

Prueba de reparación de daño inducido por etanol

Células usadas: células epiteliales de mucosa gástrica de rata (RGM1).

Medio usado: (DMEM:Ham F12 = 1:1) + 20% de FBS.

Muestra usada: Ejemplo de producción 12.

Se sembraron células epiteliales de la mucosa gástrica en una microplaca de 12 pocillos a una concentración del 10% y se llevó a cabo un precultivo a 37°C con CO₂ hasta que se alcanzó subconfluencia. Usando un raspador celular, se raspó linealmente parte de las células y el medio se sustituyó por un medio con un 3% de etanol, y se añadió una concentración predeterminada de muestra. El cultivo se llevó a cabo a 37°C con un 5% de CO₂ durante 60 horas, y se registró la ubicación de las células en primer plano que rellenaban la parte raspada. Para comparar se realizaron pruebas similares para un caso en el que sólo se añadió etanol al 3% y un caso en el que sólo se añadió agua. Los resultados se muestran en la Fig. 3. Aunque no se especifica, se obtuvieron resultados similares para otros Ejemplos de producción.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los resultados del experimento de proliferación celular usando muestras prediálisis (Ejemplo de prueba 1);

La Fig. 2 muestra los resultados del experimento de proliferación celular usando muestras postdiálisis (Ejemplo de prueba 1); y

La Fig. 3 muestra los resultados del experimento de reparación de daño inducido por etanol (Ejemplo de prueba 2).

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un agente para promover la proliferación celular o la reparación tisular que comprende las etapas de:

(i) extraer una materia prima de arroz blanco granular o pulverulenta con agua, y

(ii) someter el extracto acuoso resultante a una diálisis usando una membrana para eliminar componentes con un peso molecular de 8 K o inferior que bloquean la proliferación celular y la reparación tisular.

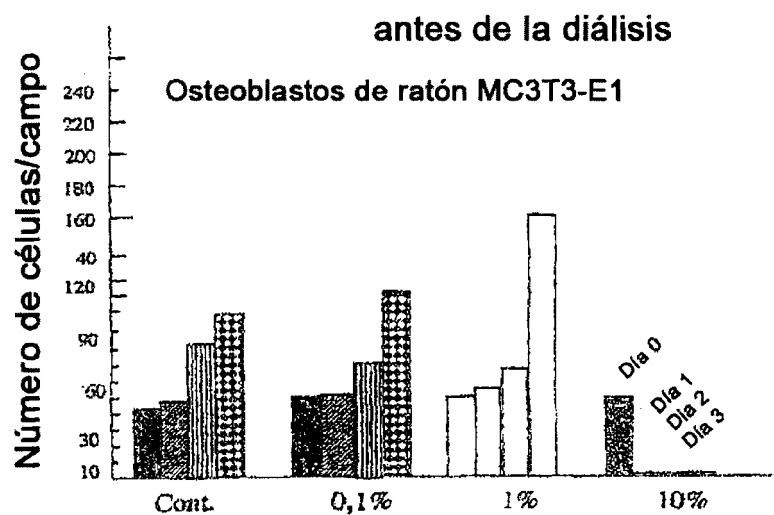
2. Un proceso según la Reivindicación 1, en el que la materia prima de arroz comprende adicionalmente arroz integral o arroz germinado.

3. Un proceso según la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, que comprende adicionalmente la sacarificación de la materia prima de arroz o del extracto acuoso.

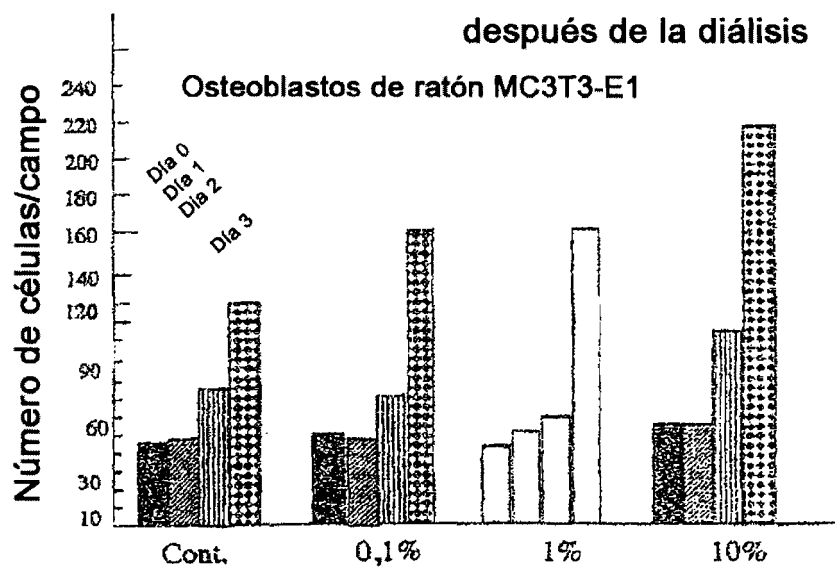
4. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente someter el extracto acuoso a una fermentación con alcohol o a una fermentación con un ácido orgánico.

5. Un proceso según cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en el que la materia prima de arroz o el producto sacarificado es un producto fermentado con alcohol o un producto fermentado con un ácido orgánico.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]

