

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 471**

51 Int. Cl.:

A61K 31/718 (2006.01)
A61K 36/899 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
C08B 30/18 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61K 31/7004 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01)
C08B 30/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2013 PCT/EP2013/061461**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13182551**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2013 E 13733961 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2863926**

54 Título: **Fracción de sacárido a partir de trigo, procedimiento de aislamiento y campo de uso de la invención**

30 Prioridad:

04.06.2012 IT FI20120104

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2017

73 Titular/es:

**FARMACEUTICI DAMOR S.P.A.. (100.0%)
Via E. Scaglione 27
80145 Napoli, IT**

72 Inventor/es:

RICCIO, RODOLFO

74 Agente/Representante:

ÁLVAREZ LÓPEZ, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 604 471 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

Fracción de sacárido a partir de trigo, procedimiento de aislamiento y campo de uso de la invención

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de los extractos naturales, en concreto extractos de cereales, y a los procedimientos para su aislamiento.

10 Técnica anterior

El uso clínico y cosmético de macromoléculas de tipo proteína (tales como, p. ej., los factores de crecimiento) o de tipo glicina (tales como, p. ej., ácido hialurónico, almidón no tratado o almidón hidrolizado y fracciones del mismo, otros GAG, glicosaminoglicanos, etc.), así como los extractos químicamente no definidos obtenidos de diversas plantas (por ejemplo, Aloe vera, Centella asiática, etc.) se ha extendido actualmente, siendo estos productos usados ampliamente, por ejemplo, en enfermedades que implican al tejido epidérmico (por ejemplo, heridas o úlceras) o con fines cosméticos.

En el documento EP 743 323 (a nombre de los mismos solicitantes), por ejemplo, se describen fracciones de sacáridos obtenidas a partir de almidón.

En algunos estudios, véanse, por ejemplo, el documento de D'Agostino y col. "A fraction purified from Triticum vulgare has trophic effects on CaCO-2" [GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, vol. 104, n°4, Suppl, 1 January 1993, p. 819] y en el documento de Fiore y col. "Differential activities of Triticum vulgare extract and its fractions in mouse fibroblasts" [ACTA THERAPEUTICA Vol. 19, n° 2, 1993 páginas 151-162], se describen fracciones de sacáridos que se obtienen sin especificar el procedimiento usado para geminar y crecer las plantas y que también contienen una fracción de péptidos, hexosa y hexosamina.

Estos extractos se usan como agentes estimulantes de la fase de re-epitelización y, por tanto, de formación de cicatriz, tales como agentes calmantes en casos de irritación cutánea, por ejemplo emolientes, y genéricamente en todo tipo de problemas no infecciosos de la piel y mucosas.

La investigación todavía se centra en el aislamiento de nuevos compuestos del tipo mencionado anteriormente, tanto para ampliar la disponibilidad de productos usados con los fines anteriormente mencionados, y para aislar compuestos con mayor actividad, como para obtener productos sin costes excesivos tales como, por ejemplo, los factores de crecimiento y diversos de los materiales de glucosa anteriormente indicados.

Sin embargo, tal como ya se ha dicho, todos los extractos naturales anteriormente descritos (incluyendo extractos de trigo) están constituidos por un número indeterminado y elevado de sustancias de diversos tipos y/o por macromoléculas, la mayoría de las cuales no se han identificado; y aun así no siempre es posible atribuir la actividad a ninguno de los componentes identificados.

Este es otro motivo por el cual los medios para obtener material vegetal y las fracciones que se pueden opcionalmente purificar a partir del mismo todavía no se han descrito completamente de forma estandarizada.

Por el contrario, y sorprendentemente, la fracción de la cual trata la presente invención, además de ser identificada y químicamente caracterizada, exhibe todas las actividades del extracto total y representa, por tanto, la principal responsable de la acción del extracto total.

50 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa los cromatogramas obtenidos al analizar, respectivamente, un blanco de referencia (agua), la fracción según la invención (denominada en el dibujo como la fracción CP) y la fracción de la cual se separa la fracción obtenida en el párrafo (d) del procedimiento según la invención, designada TVE en el dibujo.

55 Resumen de la invención

Se describen fracciones extraídas de gémnes de trigo macerados en agua, fracciones las cuales tienen un peso molecular dentro del intervalo de 3 a 30 kDalton.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere a una fracción de un extracto obtenido a partir de gémenes de trigo macerados en agua que tienen diversas características biológicas típicas de factores de crecimiento, excepto porque obviamente tiene un origen tanto vegetal como animal, y tiene la estructura química de un polisacárido, no de una proteína; dichas completamente inesperadas características hacen que esta fracción sea especialmente interesante para la preparación de fármacos y de productos útiles para el tratamiento de heridas y úlceras.

10 Más concretamente, la presente invención se refiere a una fracción obtenida a partir de semillas de trigo geminado, en condiciones habitualmente usadas para obtener extractos análogos que ya se conocen, como se ha descrito anteriormente en lo que se dice sobre la técnica anterior, que tienen un peso molecular dentro del intervalo de 3 a 30 kDalton.

15 Se debe tener en cuenta que la fracción según la invención está ausente en semillas no geminadas y que solo - o principalmente - esta fracción (es decir, la que está en el intervalo de 3-30 kDalton) tiene las propiedades anteriormente descritas.

Según la presente invención, el procedimiento prevé la preparación de un extracto crudo obtenido a partir de trigo geminado según métodos conocidos y la posterior purificación de la fracción activa.

El procedimiento anteriormente mencionado comprende las etapas siguientes:

25 a) germinación de semillas de trigo, en cualesquiera condiciones de luz (preferiblemente en oscuridad), humedad (preferiblemente con una humedad superior al 60%), temperatura (preferiblemente a 5-20°C), produciendo brotes preferiblemente crecidos hasta 3-15 cm de altura, en agua y/o en soportes de crecimiento inertes naturales o artificiales.

b) calentamiento del material vegetal obtenido (opcionalmente de forma preventiva triturado hasta un tamaño pequeño y con agua añadida) a una temperatura dentro del intervalo de 85-125°C, opcionalmente con la adición de agua, para preparar la siguiente etapa y para evitar crecimiento microbiano;

30 c) maceración del material obtenido, que se coloca en agua (preferiblemente a pH 2-4) y opcionalmente se deja macerar a temperaturas bajas (máximo 10°C);

d) eliminación del residuo sólido mediante filtración, prensado o prensado, o mediante otros sistemas equivalentes tales como extractores, para obtener una primera disolución clara (conocida como extracto crudo) que se puede esterilizar;

35 e) purificación de la fracción con peso molecular entre 3000 y 30000 dáltones de la disolución anteriormente mencionada, para dar, por tanto, una segunda disolución que tiene un contenido en porcentaje elevado de fracción activa

f) aislamiento de la fracción activa purificada, caracterizada por un peso molecular dentro del intervalo de 3000 a 30000, a partir de la segunda disolución anteriormente mencionada

40 si es necesario, las semillas se pueden humedecer con agua purificada antes de la etapa a).

La etapa b) y la esterilización mencionada en la etapa d) se llevan a cabo según técnicas convencionales, preferiblemente en un autoclave.

45 La etapa c) se lleva a cabo a un pH de entre 2 y 4, preferiblemente durante 1-72 horas.

La etapa c) y la eliminación del residuo sólido de la etapa d) se pueden llevar a cabo mediante un procedimiento de centrifugación. En este caso se añade la disolución obtenida en la etapa d) en vez del agua de la etapa c) a los nuevos plantones geminados según la etapa b) y se repiten las etapas c-d. De esta forma es posible obtener rendimientos más elevados.

La eliminación de las fracciones con peso molecular inferior a 3000 y superior a 30000 (etapa e) se puede llevar a cabo mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo por medio de 55 filtración en gel o ultrafiltración.

Por analogía, la fracción de interés se aísla por medio de las técnicas anteriormente mencionadas.

Los pesos moleculares mencionados hasta ahora pretenden referirse a las membranas de ultrafiltración usadas para

purificar la fracción de la cual trata la presente invención: tales valores se refieren a proteínas globulares y, por tanto, se deben considerar meramente indicativos del verdadero peso molecular de las fracciones separadas de la misma: razón de más para seleccionar la fracción objeto de discusión, que es del tipo sacárido y tiene una estructura lineal y ramificada, por tanto de cualquier tipo menos globular.

5

En su forma final, la fracción de la cual trata la presente invención se puede secar o liofilizar usando procedimientos convencionales o, preferiblemente, dejar en disolución acuosa con una concentración conocida y pre-establecida; opcionalmente con adición de un conservante y/o esterilizada.

10 El procedimiento genéricamente descrito anteriormente se ilustrará más claramente mediante el siguiente ejemplo específico:

EJEMPLO

15 1. Germinación

Se distribuyen 5 kg de celulosa de madera húmeda en una serie de tanques de acero adecuados; sobre esto se distribuyen, a continuación, 2,4 kg de semillas de trigo previamente mojadas con agua; las semillas se dejan germinar en oscuridad durante unos días (4-10 días) en una cámara con aire acondicionado hasta que se obtienen
20 plantones de 5-15 cm de altura. Durante el crecimiento, el soporte se humedece diariamente añadiendo una cantidad suficiente de agua.

La temperatura de la cámara se mantiene dentro del intervalo de 5-20°C; y la humedad relativa es $\geq 60\%$.

25 2. Calentamiento

El contenido de los tanques se coloca en recipientes adecuados herméticamente cerrados y, a continuación, se trata en autoclave durante 1 hora a 1 atmósfera ($\approx 121^\circ\text{C}$).

30 3. Maceración y extracción

El material se transfiere entonces a un recipiente de acero de capacidad adecuada y se añaden 100 l de agua purificada que contiene 120 ml de ácido sulfúrico al 10% v/v y 60 ml de ácido clorhídrico al 10% v/v. La maceración se puede llevar a cabo durante 1-72 horas. A continuación se extrae la fase acuosa a una presión de 300 atmósferas
35 y se elimina la fase sólida agotada.

El líquido así obtenido (definido como "1^{er} prensado") se suplementa con 120 ml de ácido sulfúrico al 10% v/v y 60 ml de ácido clorhídrico al 10% v/v y se mezcla con el contenido de un número equivalente adicional de otros tanques. A continuación se repite el procedimiento descrito como "1^{er} prensado", obteniendo por tanto el "2^o
40 prensado".

Se repiten las mismas operaciones de nuevo, obteniendo por tanto el "3^{er} prensado" y el "4^o prensado".

Cuando se pone en contacto con el material vegetal para obtener la extracción, la fase líquida se mezcla
45 enérgicamente y, a continuación, se mantiene en un lugar frío (5-9°C) durante aproximadamente 24-72 horas.

El líquido final también se puede mantener en un lugar frío (5-9°C) durante aproximadamente de 24 a 72 horas.

4. Filtración y esterilización

50

El líquido del 4^o prensado se filtra mediante procedimientos convencionales; a continuación, en recipientes adecuados, se trata en autoclave mediante la aplicación de un ciclo equivalente a 1 hora a 1 atmósfera.

5. Ultrafiltración

55

Usando instrumentación de ultrafiltración adecuada con cartuchos que tengan un límite nominal de 3 kdaltones, el líquido obtenido anteriormente se ultrafiltra hasta el máximo permitido por la instrumentación; se añade agua al líquido retenido y se repite la ultrafiltración 2-3 veces para descartar los pesos moleculares inferiores contenidos en la fase eluida.

5 A continuación, usado el mismo procedimiento pero sustituyendo los cartuchos por otros que tengan un límite nominal de 30 kdáltones, se ultrafiltra adicionalmente el residuo que contiene los pesos moleculares superiores a 3000 dáltones: sin embargo, en este caso el residuo retenido representa los pesos moleculares mayores a 30000 k dáltones y se desecha, mientras que la fase eluida contiene la fracción activa que tiene pesos moleculares dentro del intervalo de 3000 a 30000 dáltones.

10 La disolución que contiene la fracción activa se liofiliza (o deseca) a continuación tal como está o sobre un soporte adecuado; o se esteriliza (tal como está, con la adición de un conservante, por ejemplo fenoxietanol al 2% v/v).

A. DATOS QUÍMICOS RELATIVOS A LA FRACCIÓN ACTIVA

1. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LA FRACCIÓN

15 Se seleccionó un sistema cromatográfico HPAE (de intercambio aniónico de alta presión) acoplado a un detector PAD (detector de pulso amperométrico), especialmente indicado para el análisis de carbohidratos.

El sistema cromatográfico tiene las siguientes características:

20 - Sistema de bombas con elución lineal que tiene un gradiente binario

Eluyente 1: NaOH 0,5 M

Eluyente 2: acetato de sodio 1 M en NaOH 0,5 M

25 El gradiente se impone mediante el siguiente programa lineal (con flujo constante igual a 1,0 ml/min), donde % 2 indica el porcentaje de eluyente de la bomba 2 respecto a la mezcla total:

PROGRAMA DE GRADIENTE		
ETAPA	TIEMPO	% eluyente 2
0	0,0	5
1	0,1	5
2	5,0	5
3	15,0	15
4	30,0	15
5	30,1	20
6	40,1	20
7	40,2	30
8	50,2	30
9	50,3	35
10	60,3	35
11	75,0	100
12	76,0	5
13	85,0	5

30 - Columna cromatográfica

Carbopac PA1 (4x250 mm) con pre-columna Carbopac PA1 Guard (10-32) o equivalente, mantenida a una temperatura de 35°C

35 - Detector PAD provisto de un electrodo de oro, con las siguientes condiciones de funcionamiento:

Programa de detección indicativo	
Tiempo (seg)	E (volt)
0,00	+0,10
0,20	+0,10 comienzo de la integración
0,40	+0,10 fin de la integración
0,41	-2,00
0,42	-2,00

0,43	+0,60
0,44	-0,10
0,50	-0,10

*Preparación de la disolución estándar

5 Se prepara una serie de disoluciones de fracción activa con concentraciones dentro del intervalo de 4 a 12 mg en 100 ml de agua desionizada a partir de una disolución de fracción ACTIVA pura, que se considerará el estándar de referencia; o, alternativamente, usando un estándar de trabajo calibrado frente a un estándar de referencia.

*Procedimiento

10 Se inyectan 100 µl como el blanco, verificando que el cromatograma relacionado sea planar con la exclusión de unos cuantos picos debidos a los saltos de gradiente del sistema de eluyente.

A continuación se inyectan 100 µl de cada una de las disoluciones de ensayo.

15 El cromatograma de la muestra de fracción activa purificada tiene un único pico para R_t 44 minutos, que corresponde en concreto a la fracción activa (véase Fig. 1, muestra denominada "fracción CP").

El cromatograma de la muestra de extracto purificado o parcialmente purificado muestra una trayectoria con una serie de picos, entre los cuales el pico para R_t ≈44 minutos es el correspondiente a la fracción activa.

20

2. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LA FRACCIÓN DESPUÉS DE HIDRÓLISIS

Esta comprobación de control se realiza para verificar la naturaleza de los monosacáridos individuales que constituyen la estructura del oligosacárido de la fracción de ensayo. Se usa cromatografía HPA (de intercambio iónico de alto rendimiento) sobre una muestra hidrolizada.

25

El tipo de instrumentación es equivalente al mencionado anteriormente para la comprobación la fracción intacta, es decir, no hidrolizada.

30 Procedimiento

La hidrólisis se realiza añadiendo HCl al 0,35% (v/v) a la fracción e hidrolizando a 100°, durante 20 horas, sobre una muestra con una concentración de fracción activa dentro del intervalo de 5-75 mg/100 ml.

35 Las condiciones analíticas de la HPA son las siguientes:

Carbopack PA1, columna de 4 x 250 mm
Eluyente isocrático NaOH 0,017 N
Flujo constante de 1 ml/min

40 Detección PED

Volumen de inyección: 75 µl de la disolución de muestra hidrolizada, diluida 1 a 100 con agua.

Se realiza un análisis equivalente usando los monosacáridos más habituales como estándar.

45

La muestra que se investiga demostró tener una presencia masiva y predominante de glucosa, en la cual otros picos (correspondientes a otros monosacáridos o similares: manosa, galactosa, glucosamina, pentosa, etc.) están ausentes o presentes solo como trazas.

50 Un análisis idéntico realizado antes de la hidrólisis conduce análogamente a la ausencia de cualquier monosacárido, demostrando que la fracción está constituida por una estructura de oligosacáridos.

B. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA FRACCIÓN

55 La fracción según la presente invención ha demostrado presentar una actividad in vivo re-epitelizante y curativa pronunciada de heridas y/o úlceras de cualquier tipo, similar a la de los factores de crecimiento de origen animal, y,

por tanto, se puede usar en la producción de productos medicinales para el tratamiento de heridas y úlceras.

También muestra, in vitro, una considerable activación del crecimiento celular en fibroblastos y de la actividad de la ODC.

5

También se ha demostrado la activación del mecanismo de hidrólisis de fosfolípidos con inositol, que es típica de factores de crecimiento.

La actividad terapéutica se ilustra a continuación mediante diversos estudios farmacológicos.

10

1. ENSAYO DE ESTIMULACIÓN DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS FIBROBLASTOS

Los fibroblastos son células que juegan un papel fundamental en el mecanismo de reparación tisular. El ensayo, por tanto, se realiza para verificar si el efecto curativo del producto se observa como resultado de un mecanismo de estimulación de crecimiento celular de estos organismos.

15

Procedimiento

Se mantienen cultivos de fibroblastos 3T3 de ratón en un medio DMV suplementado con suero bovino (CS) al 10% v/v, penicilina (10 U/ml). Estos cultivos se cultivan en frascos Falcon de 25 ml a 37°C en una atmósfera húmeda que contiene un 5% de CO₂ y se subcultivan cada 4-6 días. Los cultivos confluentes, por tanto, se lavan con 3 ml de PBS y se tripsinan con tripsina al 0,25% a 37° C. Para desactivar la tripsina se añaden 2 ml de DME y el gránulo celular obtenido tras la centrifugación se diluye con medio de cultivo fresco hasta que se alcanza una densidad adecuada para la diseminación. El efecto estimulante del palato se ensaya en fibroblastos que se han dejado en un estado quiescente en un medio que contiene bajas concentraciones de CS. Las células se siembran con una densidad de aproximadamente 2000-4000 células por placa en DME suplementado con CS al 5%. El medio se renueva después de 18 horas y se sustituye por medio fresco que contiene CS al 0,6% y las células se dejan crecer durante otras 48 horas antes de cada ensayo de actividad sucesivo. Para el ensayo en cuestión, el producto (diluido en agua con una concentración de 20 mg/100 ml) se añade cada día con concentraciones crecientes entre el 2 y el 20% v/v a lo largo del período de crecimiento. Al final del quinto día, las diversas células se estimulan tripsinando los cultivos y haciendo un recuento celular en un contador Coulter.

20

25

30

Resultados

La adición del producto en la dilución indicada produce una estimulación marcada dependiente de la dosis del crecimiento celular. El efecto comienza a ser significativo para un porcentaje del 5% del producto (diluido tal como se indicó anteriormente) y es máximo entre el 10 y el 20%, en una cantidad ligeramente inferior a la exhibida por el CS para igual concentración, pero al menos cuatro veces mayor que la del control, en el punto máximo.

35

40

2. ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE LA ODC (ORNITINA DESCARBOXILASA)

La ornitina descarboxilasa es la enzima clave en la síntesis de espermidina-poliamina, catalizando la conversión del amino ácido ornitina en putrescina. Estas poliaminas están co-implicadas en el control de los procesos de multiplicación celular. El ensayo se lleva a cabo verificando si la acción de estimulación del crecimiento de fibroblastos producida está correlacionada con un aumento en la actividad de la ODC.

45

Procedimiento

La actividad de la ODC se ensaya en células 3T3 crecidas en un medio que contiene CS (suero bovino) al 0,6% y se prepara como se ha descrito anteriormente en el ensayo de estimulación de crecimiento de fibroblastos.

50

La actividad de la ODC se mide usando el procedimiento descrito por Russell [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 601420 (1968)], 6 horas después de la adición del producto (diluido en agua con una concentración de 20 mg/100 ml), en cantidades crecientes del 1% al 10% v/v.

55

Resultados

Para las concentraciones y en las condiciones de ensayo el producto muestra - 6 horas después de la adición y dependientemente de la dosis - una notable estimulación de la ODC aproximadamente 4 veces superior a la del

control y similar a la del CS para igual concentración.

3. ENSAYO DE LA ESTIMULACIÓN DE LA HIDRÓLISIS DE FOSFOLÍPIDOS CON INOSITOL

5 Está ampliamente documentado que uno de los principales mecanismos bioquímicos por los cuales una sustancia es capaz de activar los procesos responsables de la activación y de la multiplicación celular consiste en la estimulación específica de la hidrólisis de los fosfolípidos con inositol de la membrana, lo cual a su vez produce un aumento de mensajeros secundarios, inositol trifosfato (InsP3) y diacilglicerol. Este mecanismo está íntimamente relacionado con, entre otros, otro sistema de transducción de señales, la activación de la tirosina quinasa responsable, por ejemplo, de la acción del EGF (factor de crecimiento epidémico), de la insulina y de los factores tipo-insulina.

15 Por tanto se considera ventajoso evaluar el efecto del producto sobre la acumulación de inositol fosfato (como un índice específico de la hidrólisis de fosfolípidos) en células 3T3, tanto en condiciones de referencia como tras la estimulación con suero CS, que es conocido por ser un activador del metabolismo de fosfolípidos en fibroblastos.

Procedimiento

20 La hidrólisis de fosfolípidos con inositol se ensaya en células 3T3 crecidas en un medio que contiene CS (suero bovino) al 0,6% y se prepara como se ha descrito anteriormente en el ensayo de estimulación de crecimiento de fibroblastos.

25 Una vez que se logra la quiescencia, las células se lavan con medio Ham F-10 (con baja concentración de inositol) e incuban a 37°C durante 24 horas con la adición de CS al 0,6% y 0,6 µmol de 2-[3H]-mioinositol durante 24 horas, para marcar los fosfolípidos con inositol de la membrana. Al final de esta incubación las células se lavan con disolución tampón Krebs-Henseleit que contiene 10 mmol de LiCl y BSA al 0,1%. A continuación las células se incuban durante 24 horas con cantidades crecientes desde 0 al 20% (v/v) del producto (en disolución acuosa con una concentración de 4 mg/100 ml), con y sin un CS al 10%.

30 A continuación, los fosfatos con inositol se cuantifican usando la técnica: el medio de incubación se aspira y se extraen las células con cloroformo/metanol/agua 1/1/1 (v/v), tras una centrifugación, se toma la fase acuosa y se carga en columnas con 1 ml de Dowex-1 en forma de formiato, las columnas se lavan con 24 ml de agua para eliminar el inositol marcado que no se ha incorporado; los fosfatos con inositol se eluyen entonces mediante un lavado con formiato de amonio 0,2 M y ácido fórmico 0,1 M. La radioactividad se determina entonces mediante espectrometría de centelleo.

Resultados

40 Para las concentraciones y en las condiciones de ensayo el producto muestra una estimulación marcada y dependiente de la dosis de la hidrólisis de los fosfolípidos con inositol, aproximadamente 4 veces superior a la del control, y similar a la del equivalente en concentración de CS. Se debe señalar que la presencia simultánea del producto y de CS conduce a una mayor activación que la de sólo CS (y con sólo el producto), lo que sugiere que hay un ventajoso efecto sinérgico entre los dos componentes.

45 4. ENSAYO DE CURACIÓN IN VIVO SOBRE HERIDAS EXPERIMENTALES

El ensayo de curación in vivo, realizado en animales mediante aplicación tópica, demuestra la eficacia del producto en el tratamiento de heridas.

50 Procedimiento

El ensayo se realiza en ratas macho de la cepa Wistar con un peso dentro del intervalo de 220 a 250 g. Durante una semana antes del ensayo los animales se mantienen en condiciones controladas de temperatura, humedad y luz, con libre acceso a comida y agua. Los animales se subdividen en grupos experimentales homogéneos que comprenden 10 animales cada uno; un grupo se usa como el de control y se trata con un placebo, el otro grupo se trata con el producto.

La mañana del primer día de ensayo todos los animales se someten a un procedimiento quirúrgico para producir una herida estándar, obtenida de la siguiente manera: tras una anestesia suave (etil uretano al 10% en una dosis de 10

ml/kg), la región dorso lumbar de cada animal se afeita cuidadosamente, tras ser desinfectada, la piel se corta en torno al borde de un disco de metal de 2,5 cm de diámetro, 8,5 en caso de un tratamiento tópico, y a continuación se retira la piel y el tejido subcutáneo usando fórceps curvados. Se obtienen heridas sustancialmente idénticas en todos los animales. Después de cada día de tratamiento la herida se cubre adecuadamente y los animales se mantienen en jaulas individuales.

La extensión de la herida se mide con un planímetro (dibujando la herida en una hoja de papel transparente) cada día durante 9 días (5 días en caso de tratamiento tópico).

10 Tratamiento diario usando aplicación tópica

Las heridas de los animales del grupo de control se tratan con gasa estéril impregnada con placebo, constituido por una solución fisiológica (NaCl al 0,9%). Las heridas de los animales del otro grupo se tratan con gasa estéril impregnada con el producto, disuelto en agua con una concentración de 20 mg/100 ml.

15

Resultados

En los animales tratados con el producto se observa una aceleración del proceso de reparación, manifestada mediante una notable reducción de las áreas con herida en comparación con el grupo de control, de media aproximadamente el 20-30% al final del tratamiento.

20

PREPARACIÓN DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y/O COSMÉTICOS

La fracción activa de la cual trata la presente invención se puede usar para preparar productos que tienen actividad farmacéutica o cosmética.

25

La dosis puede variar según la patología y el tipo de tejido que se va a tratar, el grado de extensión, los parámetros del paciente (edad, sexo, peso) y el tipo de composición farmacéutica o cosmética. La dosificación de fracción activa puede variar también en función del grado de purificación de la fracción usada.

30

La fracción de la cual trata la presente invención se puede administrar en forma de composiciones que contienen una cantidad eficaz de dicha fracción mezclada con excipientes y sustancias vehículo convencionales conocidas por los expertos en la materia.

35 Las composiciones de la presente invención se pueden preparar usando procedimientos conocidos y técnicas convencionales.

Pueden estar presentes en la preparación final otros componentes activos.

40 A modo de ejemplo de composiciones farmacéuticas y cosméticas hay viales, lociones, cremas, pomadas, geles, disoluciones, medicaciones, supositorios, óvulos, jabones, espumas, comprimidos, polvos, leches.

REVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar una fracción obtenida a partir de semillas de trigo germinadas que tiene un peso molecular dentro del intervalo de 3000 a 30000 dáltones, que prevé:
- 5 a) la germinación de semillas de trigo en agua o en un soporte natural o artificial, hasta que se obtienen plantones;
b) el tratamiento térmico de los plantones;
c) la maceración del material obtenido en disolución acuosa;
d) la eliminación del residuo sólido hasta que se obtiene una primera disolución clara, que se esteriliza;
- 10 e) la eliminación de las fracciones con pesos moleculares inferiores a 3000 dáltones y superiores a 30000 dáltones, logrando la purificación de la fracción con peso molecular dentro del intervalo de 3000 a 30000.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la fase a) se lleva a cabo en oscuridad, humedad superior al 60% H.R., temperatura de 5-20°C, produciendo plantones de hasta una altura de 3-15 cm, en agua o en un soporte de crecimiento artificial inerte.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1-2, **caracterizado porque** la fase b) se lleva a cabo a temperaturas elevadas (85-150°C), opcionalmente con la adición de agua, y durante 25-120 minutos; así como porque esta fase se lleva a cabo con material vegetal tal como se obtiene o triturado hasta tamaños de dimensiones reducidas.
- 20 4. Procedimiento según las reivindicaciones 1-3, **caracterizado porque** la fase c) se lleva a cabo a un pH de entre 2 y 7 y a baja temperatura (2-10°C).
- 25 5. Procedimiento según las reivindicaciones 1-4, **caracterizado porque** la fase d) se lleva a cabo usando una membrana sintética, un filtro de papel, una prensa o un extractor líquido-sólido.
6. Fracción de sacarosa que se puede obtener mediante el procedimiento según las reivindicaciones 1-5, con cualquier grado de purificación.
- 30 7. Fracción obtenida según la reivindicación 5, como un principio activo o en cualquier proporción como un componente para uso en el tratamiento de úlceras, heridas, sobre piel o sobre mucosas, o problemas de la piel.
8. Uso de la fracción obtenida según la reivindicación 5, como un componente para la preparación de cosméticos en cualquier proporción para tratar problemas de la piel.
- 35 9. Composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz de la disolución de la reivindicación 5 y/o de la fracción de la reivindicación 6 mezcladas con excipientes y sustancias vehículo convencionales.
- 40 10. Composiciones según la reivindicación 9, en forma de viales, lociones, cremas, pomadas, geles, disoluciones, medicaciones, supositorios, óvulos, jabones, espumas, comprimidos, polvos, leches.
11. Composiciones cosméticas que contienen una cantidad eficaz del extracto total de la reivindicación 5 y/o de la fracción de la reivindicación 6 mezcladas con excipientes y sustancias vehículo convencionales.
- 45 12. Composiciones según la reivindicación 11 en forma de viales, lociones, cremas, pomadas, geles, disoluciones, medicaciones, supositorios, óvulos, jabones, espumas, comprimidos, polvos, leches.

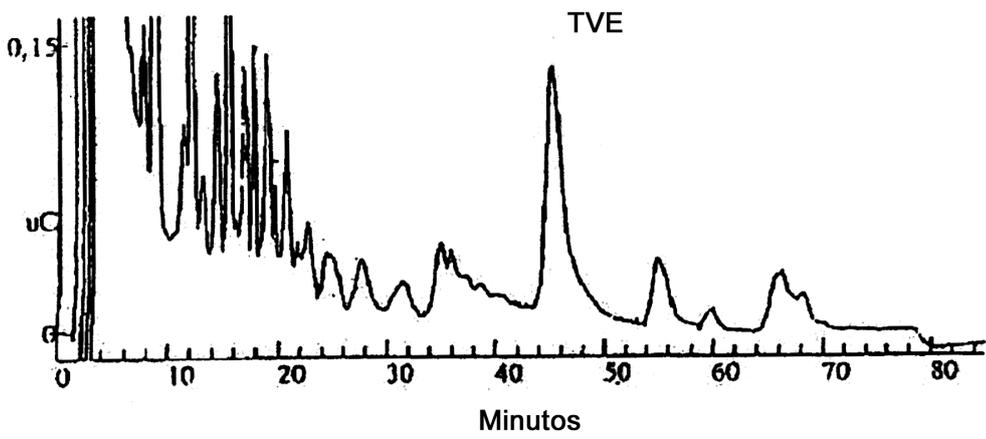
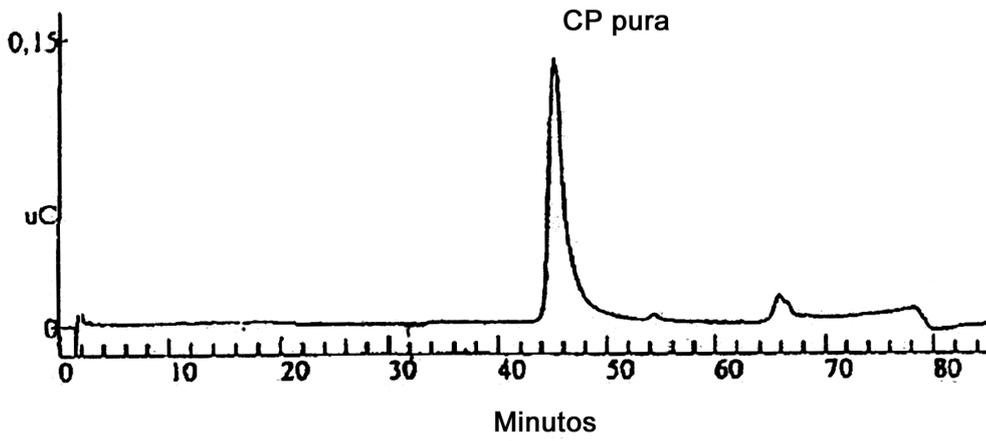
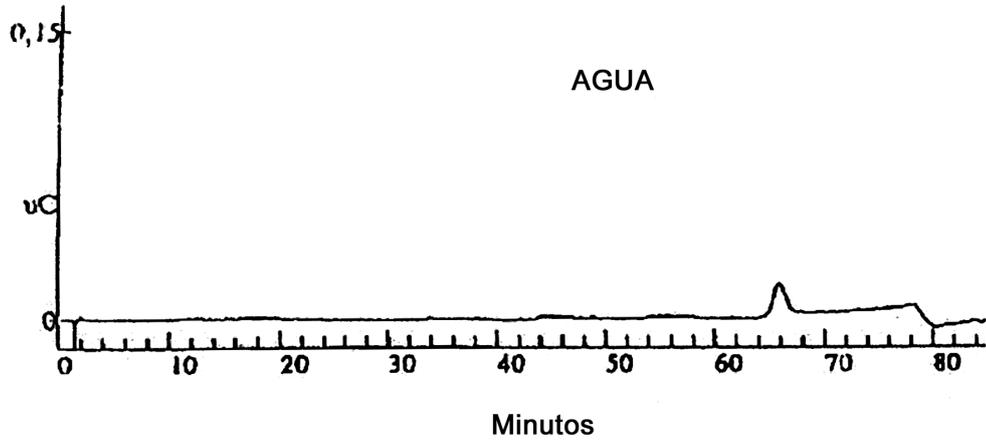


FIG. 1