

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 110**

51 Int. Cl.:

A23L 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2011 PCT/JP2011/065207**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13005281**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2011 E 11740802 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2620492**

54 Título: **Activador de la producción del factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB, y activador de la producción de células madre mesenquimatosas, estabilizador de células madre y regenerador de la dermis comprendiendo cada uno el mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2017

73 Titular/es:

**SHISEIDO COMPANY, LTD. (100.0%)
5-5 Ginza 7-chome, Chuo-ku
Tokyo 104-8010, JP**

72 Inventor/es:

**SOMA, TSUTOMU;
IINO, MASATO y
YAMANISHI, HARUYO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 604 110 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

Activador de la producción del factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB, y activador de la producción de células madre mesenquimatosas, estabilizador de células madre y regenerador de la dermis comprendiendo cada uno el mismo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un activador de la producción del factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB), y a un acelerador de la producción de células madre mesenquimatosas, a un estabilizador de células madre y a un regenerador dérmico que comprende el activador de la producción de PDGF-BB.

Antecedentes de la técnica

10 Las células madre son células que tienen tanto la propiedad de pluripotencia, mediante la cual se producen células diferenciadas en diferentes células, y de autorreplicación, mediante la cual se producen células idénticas por división celular. Las células madre procedentes del embrión en las primeras etapas del desarrollo del óvulo fecundado se conocen como células madre embrionarias (células ES). Las células ES humanas son prometedoras para su uso en medicina regenerativa, pero los problemas éticos implicados en el uso de huevos fertilizados ha impedido la creación
15 de nuevas células ES humanas.

Recientemente, las células madre pluripotentes inducidas (células iPS) han sido también el centro de atención, como las células que tienen propiedades similares a las células ES. Sin embargo, en la creación de células iPS se han encontrado numerosos problemas, incluidas la cancerización celular y la eficiencia de creación. Por otro lado, las células madre somáticas, que tienen capacidad de diferenciarse en tejidos específicos, se obtienen de los tejidos del
20 propio cuerpo del paciente tales como la médula ósea, por ejemplo, y por lo tanto no implican los problemas éticos asociados a las células madre embrionarias.

Las células madre epidérmicas (documento no de patente 1) son bien conocidas por estar presentes en la capa epidérmica basal de la piel, y las células madre epiteliales foliculares (documento no de patente 2) o células madre melanocíticas (documento no de patente 3) se han descrito en una región conocida como la región de la protuberancia folicular. Por otra parte, los fibroblastos que tienen formas de husillo alargadas están presentes en componentes de la fibra en la dermis que se componen principalmente de colágeno, pero aún no se ha determinado si las células madre están presentes o no en los fibroblastos dérmicos. Asimismo, aunque se sabe que los
25 precursores procedentes de la piel (SKP) que se diferencian en múltiples estirpes celulares tales como de grasa, glía, cartílago y músculo están presentes en la piel (documento no de patente 4), la relación entre los fibroblastos dérmicos y SKP no se ha aclarado.
30

Las células madre mesenquimatosas que se han separado de la médula ósea como precursores de fibroblastos (documento no de patente 5) se diferencian en una variedad de células del mesénquima (células óseas, células musculares, condrocitos, células de tendones, adipocitos y similares), y por lo tanto su aplicación en medicina regenerativa para la reconstrucción de huesos, vasos sanguíneos y músculos es prometedora. Recientemente se ha
35 sugerido que pueden estar presentes en grandes cantidades en el tejido que contiene tejido mesenquimatoso, y las células madre mesenquimatosas se han aislado también de la grasa, el cordón umbilical y la placenta (documentos no de patente 6-8).

Descubrimientos recientes han demostrado que las células madre mesenquimatosas están presentes en los vasos sanguíneos generales como pericitos y funcionan para mantener la estabilización vascular y la homeostasis tisular
40 (documentos no de patente 9 y 10).

Cuando los vasos sanguíneos se destruyen en zonas de daño tisular o de su periferia, las células madre mesenquimatosas, o pericitos, se separan de los vasos sanguíneos y proliferan para suplir a las células perdidas (documentos no de patente 11-14), mientras que liberan factores bioactivos para proteger el tejido (documentos no de patente 15-19) y que funcionan para reparar y regenerar el tejido dañado. Se ha publicado de que la función de
45 estos factores segregados no sólo para angiogenia y antiapoptosis, sino también para inhibir fuertemente la inmunidad (documentos no de patente 21 y 22), y para suprimir la destrucción del tejido dañado por linfocitos T o linfocitos B (documentos no de patente 9 y 22).

Además, se sabe que las células madre mesenquimatosas presentan acción antifibrinolítica (documentos no de patente 23 y 24) y los efectos contra la esclerosis múltiple y la diabetes (documento no de patente 9).

50 Por otro lado, cada vez está más claro que la inflamación crónica es una patología fundamental común a una variedad de enfermedades (por ejemplo, síndrome metabólico, enfermedad arteriosclerótica, cáncer, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades autoinmunitarias) (documento no de patente 25). Por ejemplo, se ha publicado que la disfunción de las células endoteliales y resistencia a la insulina son inducidas por la inflamación crónica, lo que lleva a diversas enfermedades tales como diabetes o la enfermedad arteriosclerótica (documento no de patente
55 26). Además, se ha descubierto que el propio tejido adiposo de los obesos conduce a cambios inflamatorios (documentos no de patente 27-29). El hecho de que la inflamación crónica se produce en las proximidades de los

vasos sanguíneos sugiere que la inflamación crónica también implica una falta de interacción entre las células madre mesenquimatosas, que son los pericitos, y los vasos sanguíneos.

5 Sobre la base de estos conocimientos, se cree que activar y estabilizar la producción de células madre mesenquimatosas, sería muy eficaz para una variedad de propósitos, incluidos la estabilización vascular, el mantenimiento de la homeostasis tisular, la reparación y regeneración de los tejidos dañados, la prevención de la fibrosis, la prevención y el tratamiento de enfermedades tales como la esclerosis múltiple y diabetes y la prevención y mejora de enfermedades asociadas a la inflamación crónica, tal como el síndrome metabólico.

10 Los presentes inventores ya han publicado que las células madre mesenquimatosas también están presentes en la dermis, y han creado un método para aislar eficazmente las células madre mesenquimatosas de la dermis (Solicitud de Patente Japonesa nº 2009-213291). Teniendo en cuenta la función de las células madre mesenquimatosas descritas anteriormente, se cree que la estabilización y la activación de la producción de células madre mesenquimatosas en la dermis también es eficaz para mejorar la enfermedad y la regenerar la dermis.

15 Además, los presentes inventores han aclarado con mayor detalle los lugares en los que las células madre mesenquimatosas están presentes en la dermis y la grasa subcutánea, y han descubierto que el que el factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) está implicado en la localización de células madre mesenquimatosas, aunque también la determinación de que la activación de la producción de PDGF-BB en las células endoteliales vasculares contribuye a un aumento de la producción y a la estabilización de las células madre mesenquimatosas (Solicitud de Patente japonesa nº 2010-209705).

20 El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es un factor de crecimiento involucrado en la regulación de la migración y proliferación de células madre mesenquimatosas incluidos los fibroblastos, células del músculo liso y células gliales, y que es producido por una variedad de células tales como las células epiteliales y las células endoteliales. Existen al menos 4 tipos de PDGF, PDGF-A, B, C y D, la cadena A y la cadena B que adoptan estructuras de homo o heterodímeros mediante la formación de enlaces disulfuro, para producir las 3 isoformas (PDGF-AA, AB, BB). PDGF es conocido por exhibir su acción fisiológica a través del receptor de PDGF (PDGFR), un receptor de tirosina cinasa. Se conoce el gen para PDGF-B y se ha clonado genéticamente (documento no de patente 30).

Cabe esperar que el descubrimiento de un componente eficaz para la activación de la producción de PDGF-BB sea útil para activar la producción de células madre mesenquimatosas y estabilizar las células madre, y por lo tanto sea eficaz para varios propósitos como se ha descrito anteriormente.

30 Lista de citas

Bibliografía no de patentes

Documento no de patente 1 Watt F. M., *J. Dermatol. Sci.*, 28:173-180, 2002

Documento no de patente 2 Cotsarelis G. *et al.*, *Cell*, 57:201-209, 1989

Documento no de patente 3 Nishimura E. K. *et al.*, *Nature*, 416:854-860, 2002

35 Documento no de patente 4 Wong C. E. *et al.*, *J. Cell Biol.*, 175:1005-1015, 2006

Documento no de patente 5 Pittenger M. F. *et al.*, *Science*, 284:143-147, 1999

Documento no de patente 6 Park K. W. *et al.*, *Cell Metab.*, 8:454-457, 2008

Documento no de patente 7 Flynn A. *et al.*, *Cytotherapy.*, 9:717-726, 2007

Documento no de patente 8 Igura K. *et al.*, *Cytotherapy.*, 6:543-553, 2004

40 Documento no de patente 9 da Silva Meirelles L. *et al.*, *Stem Cells* Sept. 2008; 26(9):2287-2299

Documento no de patente 10 da Silva Meirelles L. *et al.*, *J. Cell Sci.*, 2006; 119:2204-2213

Documento no de patente 11 Dai W. D. *et al.*, *Circulation*, 2005; 112:214-223

Documento no de patente 12 Fazel S. *et al.*, *J. Thorac. Cardiovascular Surg.*, 2005; 130:1310-18

Documento no de patente 13 Noiseux N. *et al.*, *Mol. Ther.*, 2006; 14:840-850

45 Documento no de patente 14 Zhao L. R. *et al.*, *Exp. Neurol.*, 2002; 174:11-20

Documento no de patente 15 Gneocchi M. *et al.*, *Nat. Med.*, 2005; 11:367-368

Documento no de patente 16 Kinnaird T. *et al.*, *Circ. Res.*, 2004; 94:678-685

Documento no de patente 17 Kinnaird T. *et al.*, *Circulation*, 2004; 109:1543-1549

Documento no de patente 18 Tang Y. L. *et al.*, *Ann. Surg. Thorac.*, 2005; 80:229-237

Documento no de patente 19 Zhang M. *et al.*, *FASEB J.*, 2007; 21:3197-3207

Documento no de patente 20 Le Blanc K. *et al.*, *J. Intern. Med.*, 2007; 262:509-525

5 Documento no de patente 21 Uccelli A. *et al.*, *Trends Immunol.*, 2007; 28:219-226

Documento no de patente 22 Caplan A. I. *et al.*, *J. Cell Biochem.*, 2006; 98:1076-1084

Documento no de patente 23 Fang B. J. *et al.*, *Transplantation*, 2004; 78:83-88

Documento no de patente 24 Ortiz L. A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100:8407-841

Documento no de patente 25 Ogawa, Y., *Jikken Igaku*, 28:1680-1687, 2010

10 Documento no de patente 26 Medzhitov R., *Nature*, 454:428-35, 2008

Documento no de patente 27 Hotamisligil G. S., *Nature*, 444 (7121):860-7, 2006

Documento no de patente 28 Wellen K. E. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 115 (5):1111-9, 2005

Documento no de patente 29 Sugami, T. *et al.*, *Jikken Igaku.*, 28:1717-1723, 2010

Documento no de patente 30 Dalla-Favera R. *et al.*, *Nature*, 292:31-35, 1981

15 Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

La presente invención se ha realizado a la luz de los antecedentes descritos anteriormente, y su objeto es proporcionar un agente eficaz para activar la producción de PDGF-BB, así como para proporcionar un agente eficaz para activar la producción y/o la estabilización de las células madre mesenquimatosas utilizando el mismo.

20 Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han llevado a cabo muchas investigaciones sobre una gran variedad de materiales y, como resultado de la detección de fármacos que activan la producción de PDGF-BB, han completado esta invención al descubrir que los derivados de plantas de arándano rojo, mangostino y raíz de escutelaría, así como inositol y fosfato de inositol, todos presentan notables efectos de la activación de la producción de PDGF-BB.

25 Así pues, la presente memoria descriptiva describe las siguientes invenciones.

[1] Un activador de producción del factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) que comprende uno o más componentes seleccionados de entre los derivados del arándano, derivados de mangostino, derivados de la raíz de escutelaría, inositol y fosfato de inositol, como principio activo.

30 [2] Un activador de la producción de PDGF-BB según [1], que comprende inositol y comprende además un extracto de levadura.

[3] Un activador de la producción de PDGF-BB según [1] o [2], en donde el inositol es fosfato de inositol obtenido del salvado de arroz.

[4] Un acelerador de la producción de células madre mesenquimatosas que comprende un activador de la producción de PDGF-BB según uno cualquiera de [1] a [3].

35 [5] Un estabilizador de células madre que comprende un activador de la producción de PDGF-BB según uno cualquiera de [1] a [3].

[6] Un regenerador dérmico que comprende un activador de la producción de PDGF-BB según uno cualquiera de [1] a [3].

La presente solicitud abarca por lo tanto las invenciones siguientes.

40 [1] La utilización de una composición cosmética que comprende uno o más principios activos seleccionados del grupo que consiste en un extracto de arándanos, extracto de mangostino, extracto de raíz de escutelaría, inositol y ácido fítico para activar la producción y/o estabilizar las células madre mesenquimatosas en la dermis, activando la producción de PDGF-BB.

[2] La utilización según la reivindicación [1], en donde la composición cosmética comprende inositol y ácido fítico, y

comprende además un extracto de levadura.

[3] La utilización según la reivindicación [1], en donde el inositol y el ácido fítico se obtienen del salvado de arroz.

Efecto de la invención

5 En la presente memoria se describe un agente eficaz para activar la producción de PDGF-BB, así como un agente eficaz para activar la producción y estabilizar células madre mesenquimatosas, que emplea el agente anteriormente mencionado.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Derivado de arándano rojo

10 El arándano rojo (nombre científico: *Vaccinium vitis-idaea* L.) es una planta de la familia de las ericáceas, género *Vaccinium*. Como se describe en la presente solicitud, los derivados de arándano rojo puede ser flores de arándano rojo, puntas florecientes, cápsulas, cáscaras, frutos, troncos, hojas, ramas, hojas laterales, tallos, corteza, rizomas, corteza de la raíz, raíces, semillas o toda la planta, que se ha sido pulverizado y exprimido, o extraído con un disolvente después de la pulverización, o descompuesto después de la pulverización, mediante un tratamiento tal como el tratamiento enzimático o tratamiento mecánico.

15 El disolvente de extracción utilizado como disolvente de extracción para la extracción de arándano rojo puede ser cualquiera deseado, y por ejemplo, agua o disolventes orgánicos incluidos alcoholes tales como metanol, etanol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina, alcoholes que contienen agua, cloroformo, dicloroetano, tetracloruro de carbono, acetona, acetato de etilo y similares pueden ser utilizados solos o en combinaciones.

20 La extracción puede llevarse a cabo a temperatura ordinaria, o puede llevarse a cabo con calentamiento (por ejemplo, usando un disolvente calentado tal como agua templada o agua caliente).

25 El extracto obtenido por extracción con disolvente puede usarse directamente, o el extracto concentrado puede usarse, o el extracto puede ser eliminado de impurezas por un proceso de adsorción utilizando una resina de intercambio iónico o similares, o puede someterse a adsorción en una columna con polímero poroso (por ejemplo, AMBERLITE XAD-2) y a continuación eluirse con metanol o etanol y concentrarse. Puede utilizarse también un extracto obtenido mediante un método de partición conocido (un método de partición que utiliza agua/acetato de etilo, por ejemplo).

30 Cuando el arándano rojo se va a descomponer, puede llevarse a cabo la "preparación unicelular", en la que las sustancias intercelulares se descomponen de forma selectiva para mantener las formas celulares. Se puede hacer referencia, por ejemplo al método descrito en la publicación de patente japonesa no examinada nº 2002-193734. Específicamente, este es un tratamiento en el que la planta se somete a enzimólisis, descomposición mecánica o similares para la descomposición selectiva o la interrupción de las sustancias intercelulares prácticamente sin descomposición de las paredes celulares, para resolución de la sustancia en unidades celulares con formas celulares mantenidas, y obteniendo una forma similar a una pasta, composición líquida o producto liofilizado. El tratamiento enzimático puede utilizarse para llevar a cabo dicha descomposición selectiva. Por ejemplo, pueden utilizarse productos que se han aislado o aislado y purificado por métodos comúnmente conocidos a partir de materiales enzimáticos tales como *Rhizopus* o *Aspergillus*, o pueden utilizarse productos comerciales. Cuando estas enzimas de la preparación unicelular se van a utilizar para el arándano rojo, se les permite preferiblemente actuar en condiciones óptimas tales como la temperatura óptima y el pH óptimo de la enzima, en las cantidades mínimas necesarias. La temperatura óptima para una enzima de preparación unicelular es de 30-45°C, y el pH óptimo es 4-6. La parte restante después de la reacción enzimática puede eliminarse usando un tamiz de aproximadamente 20 mesh para obtener un derivado de arándano rojo que se puede añadir a una composición para uso externo.

45 También, además de la suspensión de la preparación unicelular, la suspensión puede prepararse como una pasta unicelular, o su forma seca, obtenido por deshidratación por un método tal como separación centrífuga, para su uso como se describe en la presente descripción.

50 El arándano rojo se ha utilizado en el pasado como un preparado externo que comprende un preparado de arándano rojo unicelular (publicación de patente japonesa no examinada nº 2002-193734), como cosmético bactericida, antibacteriano o anticasma (publicación de patente japonesa no examinada SHO nº 61-238719), como inhibidor de la actividad de la elastasa (publicación de patente japonesa no examinada nº 2002-363088), como eliminador de la enzima activa (publicación de patente Japonesa no examinada nº 2002-363027), como inhibidor de la producción de melanina (publicación de patente japonesa sin examinar nº 2002-363057), como inhibidor de la producción de peróxido de lípidos (publicación de patente japonesa sin examinar nº 2002-363089), como inhibidor de la actividad de la colagenasa (publicación de patente japonesa sin examinar nº 2003-12531), como inhibidor de la actividad de hialuronidasa (publicación de patente japonesa sin examinar nº 2003-73287), como inhibidor de la expresión de metaloproteasas (publicación de patente japonesa sin examinar nº 2002-193738), como inhibidor de glucosilación (inspección pública de patente japonesa nº 2004-505007) y como agente de control de daño a la piel contra

trastornos cutáneos tales como paquidermia y esclerodermia (publicación de patente japonesa sin examinar nº 2005-306850); sin embargo, se ha desconocido completamente hasta la fecha que los derivados del arándano rojo tienen efectos de activación de la producción de PDGF-BB, efectos de activación de la producción de células madre mesenquimatosas, efectos de estabilización de células madre y efectos de estabilización de la dermis, y estos efectos han sido descubiertos por primera vez por los presentes inventores.

Derivados del mangostino

El mangostino (nombre científico: *Garcinia mangostana*) es una planta de la familia Otagiriso, género *Garcinia*. Como se describe en la presente solicitud, un derivado de mangostino puede ser una cápsula, cáscara, fruta, tronco, hoja, rama, cotiledón, tallo, corteza, rizoma, corteza de la raíz, raíz, semilla o toda la planta de mangostino, que se ha pulverizado y exprimido, o extraído con un disolvente después de la pulverización.

Cuando va a extraerse el mangostino, se puede usar como disolvente de extracción cualquier disolvente que permita la extracción y, por ejemplo, la extracción puede realizarse usando alguno de los diversos disolventes orgánicos incluidos los alcoholes inferiores tales como metanol, etanol, alcohol propílico, alcohol isopropílico, butanol o isobutanol, o alcoholes inferiores acuosos, alcoholes polihídricos tales como propilenglicol o 1,3-butilenglicol o alcoholes polihídricos acuosos, acetona, éster de acetato de etilo o similares, con el disolvente posteriormente separado por destilación.

La extracción puede llevarse a cabo a temperatura ordinaria, o puede llevarse a cabo con calentamiento (por ejemplo, usando un disolvente calentado, tal como agua templada o agua caliente).

Puede añadirse también una enzima al disolvente para el tratamiento de extracción. La adición de una enzima puede disgregar el tejido celular de la fruta y aumentar aún más la eficacia de la extracción. La enzima utilizada es preferiblemente una enzima degradadora de tejido celular. Ejemplos de dichas enzimas incluyen pectinasas, celulasas, hemicelulasas, α -amilasas y fitasas. Cualquiera de estas enzimas pueden usarse solas, o dos o más de ellas se pueden usar en combinación.

El extracto obtenido usando un disolvente de extracción puede utilizarse directamente, o el disolvente de extracción puede eliminarse por destilación y el extracto utilizarse después del secado si es necesario.

El mangostino se ha utilizado en el pasado como un absorbente de ultravioleta (Publicación de patente japonesa no examinada HEI nº 9-87155), como inhibidor de MMP (Publicación de patente japonesa no examinada nº 2003-252745) y como activador de fibroblastos (Publicación de patente japonesa no examinada nº 2006-249051), y se ha conocido por tener efectos sobre la producción del derivado de xantona y la producción de colágeno (Publicación de patente japonesa no examinada nº 2009-84169); sin embargo, ha sido completamente desconocido hasta la fecha que los derivados de mangostino tienen efectos de activación de la producción de PDGF-BB, efectos de activación de la producción de células madre mesenquimatosas, efectos de estabilización de células madre y efectos de estabilización de la dermis, y estos efectos los han descubierto por primera vez los presentes inventores.

Derivados de la raíz de escutelaria

La raíz de escutelaria (nombre científico: *Scutellaria baicalensis* Georgi, Labiaceas) es una planta de la familia de las Lamiaceas, género *Scutellaria*. Según se describe en la presente solicitud, un derivado de la raíz de escutelaria puede ser una cápsula, cáscara, fruto, tronco, hoja, rama, cotiledón, tallo, corteza, rizoma, corteza de la raíz, raíz, semilla o toda la planta de la raíz de escutelaria que ha sido pulverizada y exprimida, o extraída con un disolvente después de la pulverización.

Para la extracción de la raíz de escutelaria, el disolvente de extracción puede ser cualquier disolvente deseado que se utiliza normalmente para la extracción de plantas, y los ejemplos incluyen agua, alcoholes inferiores tales como metanol, etanol, isopropanol y n-butanol, alcoholes polihídricos tales como propilenglicol y 1,3-butilenglicol, o formas hidratadas de estos alcoholes, y disolventes a base de hidrocarburos tales como n-hexano y tolueno. Estos pueden usarse solos, o cualquiera de dos o más de los mismos se pueden usar en combinación. Se utilizan preferiblemente alcoholes inferiores tales como metanol o etanol.

La extracción puede llevarse a cabo a temperatura ordinaria, o puede llevarse a cabo con calentamiento (por ejemplo, usando un disolvente calentado, tal como agua templada o agua caliente).

Puede añadirse también una enzima al disolvente para el tratamiento de extracción. La adición de una enzima puede disgregar el tejido celular del fruto y aumentar aún más la eficacia de la extracción. La enzima utilizada es preferiblemente una enzima degradadora del tejido celular. Ejemplos de dichas enzimas incluyen pectinasas, celulasas, hemicelulasas, α -amilasas y fitasas. Cualquiera de estas enzimas puede utilizarse sola, o dos o más de ellas pueden usarse en combinación.

El extracto obtenido usando un disolvente de extracción puede utilizarse directamente, o el disolvente de extracción puede eliminarse por destilación y el extracto utilizarse después del secado si es necesario.

En el pasado se ha utilizado raíz de escutelaria como agente de activación de la papila pilosa (Publicación de patente japonesa no examinada HEI nº 11-240823), como potenciador de la producción de ácido hialurónico (Publicación de patente japonesa no examinada HEI nº 10-95735), como inmunoestimulante para prevenir la pérdida inducida por ultravioleta de la función inmunológica de la piel (Publicación de patente japonesa no examinada HEI nº 11-71295), como fármaco antiinflamatorio (Publicación de patente japonesa no examinada nº 2006-8536) y como antioxidante (Publicación de patente japonesa no examinada HEI nº 5-238925); sin embargo, ha sido completamente desconocido hasta la fecha que los derivados de raíz de escutelaria tienen efectos activadores de la producción de PDGF-BB, efectos activadores de la producción de células madre mesenquimatosas, efectos estabilizadores de las células madre y efectos estabilizadores de la dermis, y estos efectos los han descubierto por primera vez los presentes inventores.

Inositol/fosfato de inositol

El inositol se considera que es una forma de vitamina B, y también se sabe que se biosintetiza en el cuerpo a partir de glucosa. El inositol se encuentra en plantas tales como cereales, azúcar, alubias y frutas. El inositol a menudo está presente en una forma con grupos hidroxilo fosforilados (fosfato de inositol). Según se describe en la presente descripción, también se puede utilizar el fosfato de inositol. También están incluidos varios estereoisómeros de inositol en el inositol utilizado para la invención. Los estereoisómeros de inositol incluyen cis-inositol (1,2,3,4,5,6/0-inositol), epi-inositol (1,2,3,4,5/6-inositol), alo-inositol (1,2,3,4/5,6-inositol), mio-inositol (1,2,3,5/4,6-inositol), mucu-inositol (1,2,4,5/3,6-inositol), neo-inositol (1,2,3/4,5,6-inositol), quiro-inositol (1,2,4/3,5,6-inositol) y escilo-inositol (1,3,5/2,4,6-inositol). El fosfato de inositol puede ser un compuesto que tiene uno o más de los 6 grupos hidroxilo de inositol fosforilado. Se prefiere el ácido fólico, que es un compuesto que tiene los 6 grupos hidroxilo de inositol fosforilados. El inositol o el ácido fólico utilizado para la invención procede preferiblemente del salvado de arroz. Cualquiera de las sales del ácido fólico puede usarse también para la invención.

Según una realización de la invención, el inositol y el ácido fólico pueden utilizarse en forma de diluciones apropiadas obtenidas por disolución de polvo simple en un medio.

El inositol y ácido fólico también pueden combinarse con otras sustancias para mejorar el efecto de activación de la producción de PDGF-BB. Tales otras sustancias pueden ser extractos de levadura, tales como Biodyne^R EMPP (producto de Arch Personal Care Products L.P.). Cuando dicho extracto se va a utilizar, el extracto puede añadirse al medio a aproximadamente 0,1% de concentración del residuo seco del extracto.

En el pasado se han utilizado inositol y fosfato de inositol como composiciones cosméticas que contienen inositol para la piel envejecida y/o para la piel devastada por el estrés (Inspección pública de patente japonesa nº 204-501069), en forma de composiciones cosméticas que contienen fosfato de inositol (especialmente ácido fólico y sus sales) para reducir o prevenir los signos de lipedema (Publicación de patente japonesa no examinada HEI nº 8-253406), y en forma de composiciones para la retención de humedad de la piel y/o protección de la piel y/o la prevención del envejecimiento de la piel (publicación de patente japonesa no examinada nº 2010-150258). Los ejemplos como vitaminas B incluyen preparados externos para activación celular para la piel que contienen vitamina B2 y B6 (publicación de patente japonesa no examinada HEI nº 9-241146) y antioxidantes que contienen vitamina B (publicación de patente japonesa no examinada HEI nº 7-277939 y publicación de patente japonesa no examinada y nº 205306831). Sin embargo, ha sido completamente desconocido que las vitaminas B e inositol o fosfato de inositol tienen efectos de activación de la producción de PDGF-BB, efectos de activación de la producción de células madre mesenquimatosas, efectos de estabilización de células madre y efectos de estabilización de la dermis, y esto lo han descubierto por primera vez por los presentes inventores.

Activador de la producción de PDGF-BB, acelerador de la producción de células madre mesenquimatosas, estabilizador de células madre y regenerador dérmico

El activador de la producción de PDGF-BB de la invención comprende uno o más componentes seleccionados de entre los derivados del arándano, derivados de mangostino, derivados de la raíz de escutelaria, inositol y fosfato de inositol, como principio activo. El acelerador de la producción de células madre mesenquimatosas, el estabilizador de células madre y el regenerador dérmico de la invención comprenden un activador de la producción de PDGF-BB que incluye un principio activo como se ha descrito anteriormente. El activador de la producción de PDGF-BB, el acelerador de la producción de células madre mesenquimatosas, el estabilizador de células madre y el regenerador dérmico (en adelante estos también se denominarán en conjunto "agentes de la invención") pueden contener cualquiera de los principios activos anteriormente mencionados solos, o dos o más de los mismos en cualquier combinación y proporción deseadas.

Basándose en el conocimiento de los presentes inventores, como se mencionó anteriormente, PDGF-BB contribuye a la localización de las células madre mesenquimatosas, y activa la producción de PDGF-BB por las células endoteliales vasculares, lo que ayuda a activar la producción y estabilizar las células madre mesenquimatosas (solicitud de patente japonesa nº 2010-209705). Es decir, el activador de la producción de PDGF-BB de la invención se puede utilizar de manera muy eficaz para activar la producción de células madre mesenquimatosas y estabilizarlas.

También, como se mencionó anteriormente, se sabe que la activación de la producción, y la estabilización, de las células madre mesenquimatosas, es muy eficaz para la estabilización vascular, el mantenimiento de la homeostasis tisular, la reparación y regeneración de tejido dañado (especialmente la regeneración dérmica), la prevención de la fibrosis, la prevención y el tratamiento de enfermedades tales como la esclerosis múltiple y la diabetes y la
 5 prevención y mejora de enfermedades relacionadas con la inflamación crónica, tal como el síndrome metabólico. Por lo tanto, un acelerador de la producción de células madre mesenquimatosas y el estabilizador de células madre que emplea el activador de la producción de PDGF-BB se pueden usar de manera muy eficaz para tales propósitos.

Los agentes se pueden preparar como composiciones que comprenden el principio activo mencionado anteriormente en combinación con uno o más de otros componentes, tales como excipientes, vehículos y/o
 10 diluyentes. La constitución y la forma de la composición pueden ser como se desee, y pueden seleccionarse apropiadamente dependiendo de las condiciones incluidos el principio activo y el propósito de su utilización. La composición puede prepararse por un método corriente como una formulación en una combinación adecuada con un excipiente, vehículo y/o diluyente u otros componentes, dependiendo de la forma farmacéutica.

Los agentes pueden mezclarse con diversos alimentos y bebidas o piensos (alimentos para mascotas o similares)
 15 para la ingestión por un ser humano o animal. También pueden combinarse en cosméticos o similares para seres humanos o animales, o administrarse en forma de preparados médicos a seres humanos o animales.

Específicamente, cuando ha de añadirse un agente a un alimento o bebida o pienso, el contenido (peso seco) del organismo vegetal o su extracto puede determinarse apropiadamente según el tipo de planta, el propósito, la forma y el método de uso. Por ejemplo, el contenido puede ser tal que el consumo diario de una planta o su extracto para
 20 adultos es de 0,5 mg-1 g (residuo seco) para el extracto de grosella espinosa india o aproximadamente 0,5 mg-3 g de extracto de arándano rojo. En particular, cuando se va a utilizar como un alimento o bebida saludable, se añade preferiblemente a 10 mg-500 mg (residuo seco) para el extracto de grosella espinosa india o 10 mg-1,5 g (residuo seco) para el extracto de arándano rojo, al día para adultos, de modo que el efecto deseado del principio activo se exhibe de manera adecuada.

La forma de la comida o bebida o pienso puede ser cualquier forma deseada, y por ejemplo, puede moldearse en
 25 forma granular, en partículas, similar a una pasta, similar a un gel, sólida o líquida. Estas formas pueden combinarse apropiadamente con distintas sustancias conocidas aprobados para adición a los alimentos y bebidas, incluidos excipientes tales como aglutinantes, disgregantes, espesantes, agentes dispersantes, aceleradores de reabsorción, correctores del sabor, agentes tampón, tensioactivos, auxiliares de disolución, conservantes, emulsionantes,
 30 agentes isotonzantes, estabilizadores y reguladores del pH.

Cuando se va a añadir un agente a un cosmético, el contenido (peso seco) del organismo vegetal o su extracto se puede determinar apropiadamente según el tipo de planta, el propósito, la forma y el método de uso. Por ejemplo, el extracto de grosella espinosa india o de extracto de arándano rojo pueden añadirse a 0,0001%-50% (referido al peso seco), y más preferiblemente a 0,0001%-5% (referido al peso seco), del cosmético total.

Además de los componentes mencionados anteriormente, también pueden añadirse apropiadamente, según sea
 35 necesario, los componentes que se utilizan normalmente en preparados externos para la piel tales como cosméticos o productos farmacéuticos, incluidos antioxidantes, aceites, agentes protectores contra el ultravioleta, tensioactivos, espesantes, alcoholes, constituyentes en polvo, materiales colorantes, componentes acuosos, agua y preparados de nutrientes de la piel, en intervalos que no interfieran con el efecto de la invención.

Además, también pueden añadirse cantidades apropiadas de quelantes de iones metálicos, tales como edetato
 40 disódico, edetato trisódico, citrato de sodio, polifosfato de sodio, metafosfato de sodio y ácido glucónico, agentes antisépticos tales como metilparabeno, etilparabeno y butilparabeno, fármacos, incluidos la cafeína, tanino, verapamilo, ácido tranexámico y sus derivados, extracto de regaliz, glabridina, extracto en agua caliente de membrillo chino, preparados galénicos, acetato de tocoferol, enoxolona y sus derivados y sales, blanqueadores de la
 45 piel tales como la vitamina C, fosfato de ascorbato de magnesio, ascorbato glucósido, arbutina y ácido kójico, y sacáridos tales como glucosa, fructosa, manosa, sacarosa y trehalosa.

Estos preparados externos para la piel pueden utilizarse ampliamente en cosméticos, cuasi fármacos y similares,
 50 que se aplican externamente a la piel, y aún más preferiblemente en los cosméticos. La forma farmacéutica puede ser cualquiera que pueda aplicarse a la piel, tal como una solución, forma disuelta, emulsión, dispersión de polvo, bicapa de agua-aceite, tricapa de agua-aceite-polvo, pomada, agua cosmética, gel, aerosol o similares.

Cuando un agente es para ser usado como cosmético, se utiliza preferiblemente en forma de un agua cosmética,
 látex, base, barra de labios, crema de labios, crema de limpieza, masaje, crema, compresa, crema de manos, polvo para manos, cuerpo, champú, cuerpo, loción, cuerpo, crema, cosmético para baño o similares, en cuyo caso los
 55 componentes normalmente añadidos y formulados con dichas formas pueden ser incluidos como componentes adecuados, incluidos tales como humectantes, compuestos aromáticos, agentes disolventes, estabilizantes, absorbentes del ultravioleta, agentes de dispersión del ultravioleta y similares.

Cuando un agente es para ser aplicado como preparado externo, el contenido (peso seco) del organismo vegetal o su extracto se puede determinar apropiadamente según el tipo de planta, el propósito, la forma y el método de

uso. Por ejemplo, se utiliza preferiblemente al 0,00001%-50% (referido al peso seco) en un cosmético, o preferiblemente al 0,0001% -5% (referido al peso seco) en un alimento o bebida.

5 Cuando un agente es para ser utilizado como producto parafarmacéutico, la formulación puede utilizarse según proceda ya sea en forma oral o parenteral (por administración intravenosa, administración intraperitoneal o similares). La forma farmacéutica puede ser como se desee, y puede prepararse adecuadamente por un método conocido para cualquier forma, incluidas las formulaciones sólidas orales tales como comprimidos, gránulos, polvo o cápsulas, formulaciones líquidas orales, tales como fármacos o jarabes internos líquidos, o formulaciones líquidas parenterales tales como inyecciones. Dichos preparados médicos pueden contener apropiadamente excipientes utilizados normalmente tales como aglutinantes, disgregantes, espesantes, agentes dispersantes, aceleradores de reabsorción, correctores del sabor, agentes tampón, tensioactivos, auxiliares de disolución, conservantes, emulsionantes, agentes isotonzantes, estabilizantes y reguladores del pH.

Un preparado externo puede aplicarse generalmente en una forma tal como una pomada, y se utiliza preferiblemente en forma de loción, agente de suspensión, emulsión, fármaco líquido, pomada o parche médico. Formas que pueden aplicarse para el agente no se limitan a estas formas farmacéuticas.

15 El nivel de expresión del gen de PDGF-BB en las células madre mesenquimatosas tras la administración de un agente puede determinarse y evaluarse midiendo el nivel de PDGF-BB, por ejemplo. Preferiblemente, la medición se lleva a cabo por un método que es conocido en el campo usando anticuerpos específicos para PDGF-BB, y por ejemplo, puede llevarse a cabo por un método de inmunotinción usando una sustancia fluorescente, colorante, enzima y similares, o por transferencia Western o un método de inmunoanálisis tal como ELISA o RIA. Además, 20 puede extraerse el RNA total en las células madre mesenquimatosas, y medirse la cantidad de ARNm que codifica a PDGF-B para la determinación y evaluación. Los métodos de extracción y medición de ARNm son bien conocidos en el campo, y por ejemplo, el ARN se cuantifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, tal como reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). La selección de un cebador adecuado para RT-PCR puede llevarse a cabo por un método conocido para los expertos en la técnica.

25 Ejemplos

La presente invención se explicará ahora con mayor detalle mediante ejemplos. Sin embargo, la invención no está en modo alguno limitada por los ejemplos.

Muestra de evaluación

Las siguientes se utilizaron como muestras para la evaluación del efecto de activación de la producción de PDGF-BB.

30 · Inositol:

Polvo de inositol disponible en el mercado (myo-inositol, producto de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) se disolvió en PBS y después se utilizó en una cantidad de 10 ppm en el medio descrito a continuación.

· Ácido fítico:

35 Se utilizó ácido fítico disponible en el mercado (solución acuosa al 50%, producto de la Nacalai Tesque, Inc.) en una cantidad de 10 ppm en el medio descrito a continuación.

· Extracto de raíz de escutelaria

40 Raíces de escutelaria con la película eliminada se extrajeron con etanol al 70% vol (mezcla de agua y etanol en una relación en volumen de 3:7) y se utilizó el extracto. El extracto se secó y almacenó, y se añadió 70% en volumen de etanol para la disolución inmediatamente antes del uso, en una cantidad de 15 ppm en el medio descrito a continuación (con referencia al peso seco del extracto).

· Arándano rojo CRS (sistema de liberación celular):

45 La suspensión utilizó compuesto 1,3-BG añadido a 40% en volumen a una suspensión celular obtenida por tratamiento de hojas de arándano rojo con una enzima citolítica (macerozima A). La suspensión se almacenó en forma líquida y se utilizó en una cantidad de 30 ppm en el medio descrito a continuación (referido al peso seco del extracto).

· Extracto de corteza de mangostino:

50 Se extrajo corteza de mangostino con 70% en volumen de 1,3-BG (una mezcla de agua y 1,3-BG en una relación en volumen de 3:7) y el extracto obtenido se utilizó. El extracto se secó y almacenó, y 70% en volumen de 1,3-BG se añadió para la disolución inmediatamente antes de su uso, en una cantidad de 10 ppm en el medio descrito a continuación (referido al peso seco del extracto).

Evaluación del efecto activador de la producción de PDGF-BB en células endoteliales vasculares

Células endoteliales vasculares humanas HUVEC se subcultivaron con medio EGM-2 (Sanko Junyaku Co., Ltd.), y las células del cuarto subcultivo se pusieron en suspensión en medio HuMedia-EG2 exento de VEGF-A (Kurabo Industries, Ltd.) y se sembraron en una multiplaca de 24 pocillos recubiertos con colágeno (Asahi Glass Co., Ltd.) a una relación celular de 20.000, y el cultivo se llevó en presencia de CO₂ al 5% durante 3-5 días hasta que las células alcanzaron confluencia a 37°C. Después del intercambio con el medio HuMedia-EG2 (Kurabo Industries, Ltd.) que contiene cada muestra añadido a la concentración especificada o un disolvente añadido que disuelve cada muestra de evaluación, el cultivo se continuó durante 2 días. El ARNm se extrajo y se purificó de las células cultivadas utilizando un reactivo de extracción de ARN MagNA Pure LC mRNA HS kit (Roche) y un aparato de extracción de ácido nucleico automático MagNA Pure LC 1.0 Instrument (Roche), según el protocolo del fabricante. Para cada muestra, se utilizó un volumen igual de ARNm como plantilla para la (RT)-PCR en tiempo real cuantitativa de una sola etapa del gen PDGF-B usando pares de cebadores de SEQ ID n°: 1 y n°: 2 enumerados a continuación, el reactivo de reacción QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) y un reactor LightCycler (Roche). Las condiciones de la composición fueron según el protocolo por Qiagen. Las condiciones de RT-PCR fueron reacción en RT a 50°C durante 20 minutos, desnaturalización inicial a 95°C durante 15 minutos, desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, hibridación a 60°C durante 20 segundos y ampliación a 72°C durante 30 segundos. Se utilizó G3PDH como patrón interno (par de cebadores de SEQ ID n°: 3 y n°: 4), y el nivel de ARNm se calibró con respecto a la referencia.

PDGF-B:

Cebador directo: 5'-CCTGGCATGCAAGTGTGA-3' (SEQ ID n°: 1)

20 Cebador inverso: 5'-CCAATGGTCACCCGATTT-3' (SEQ ID n°: 2)

G3PDH:

Cebador directo: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' (SEQ ID n°: 3)

Cebador inverso: 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3' (SEQ ID n°: 4)

Resultados de evaluación

25 Los niveles de expresión de ARNm de PDGF-BB para cada muestra se presentan en la tabla siguiente, en comparación con los niveles de expresión para la referencia (disolvente que disuelve cada muestra de evaluación), como se obtiene por el procedimiento de evaluación descrito anteriormente. Los resultados siguientes demuestran que los componentes tienen actividad de activar la expresión de PDGF-BB.

Tabla 1

Nombre del fármaco	Concentración (relación al medio)	Expresión de PDGF-BB (frente a referencia)
Inositol	10 ppm	1,37
Ácido fítico	10 ppm	1,20
Extracto de raíz de escutelaria	15 ppm	1,56
Arándano rojo CRS	30 ppm	1,85
Extracto de corteza de mangostino	10 ppm	1,31

30

Lista de secuencias

<110> SHISEIDO COMPANY, LTD.

- 5 <120> Activador de la producción del factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB, y acelerador de la producción de células madre mesenquimatosas, estabilizador de células madre y regenerador dérmico que comprenden el mismo
- <130> SSD-Z669-PCT
- 10 <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- 15 <210> 1
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Cebador directo PDGF-B
- <400> 1
- 25 cctggcatgc aagtgta 18
- <210> 2
<211> 18
<212> ADN
- 30 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Cebador inverso PDGF-B
- 35 <400> 2
- ccaatggtca cccgattt 18
- <210> 3
- 40 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> Cebador directo G3PDH
- <400> 3
- gcaccgtcaa ggctgagaac 20
- 50 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<223> Cebador inverso G3PDH
- <400> 4
- 60 atggtggtga agacgccagt

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una composición cosmética que comprende uno o más principios activos seleccionados del grupo que consiste en un extracto de arándanos, un extracto de mangostino, un extracto de raíz de escutelaria, inositol y ácido fítico, para activar la producción y/o estabilizar las células madre mesenquimatosas en la dermis, activando la producción de PDGF-BB.
- 5 2. La utilización según la reivindicación 1, en donde la composición cosmética comprende inositol o ácido fítico, y comprende además un extracto de levadura.
3. La utilización según la reivindicación 1, en donde el inositol o el ácido fítico se obtiene del salvado de arroz.