

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 487**

51 Int. Cl.:

A61K 36/54	(2006.01)
A61K 8/97	(2007.01)
A61P 9/14	(2006.01)
A61P 17/00	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)
A61Q 19/08	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2009 PCT/JP2009/056709**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2009 WO09123211**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2009 E 09726820 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2269621**

54 Título: **Extracto de canela para tratar el fotoenvejecimiento**

30 Prioridad:

31.03.2008 JP 2008093363

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

20.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**OTA, MASAHIRO;
KOBAYASHI, KOJI;
KUSAKARI, KEN;
TSUNENAGA, MAKOTO y
TAKAKURA, NOBUYUKI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 655 487 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

Extracto de canela para tratar el fotoenvejecimiento

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un extracto derivado de una planta que pertenece al género *Cinnamomum*, y particularmente una planta de la especie *Cinnamomum cassia* Blume, para uso para prevenir o mejorar el fotoenvejecimiento.

Antecedentes de la técnica

10 En los vasos sanguíneos, las células vasculares del músculo liso y pericitos, que genéricamente se denominan células murales vasculares, se adhieren a las células endoteliales vasculares de la superficie externa de las células endoteliales vasculares directamente o vía la matriz extracelular. Las relaciones de adhesión de células endoteliales y células parietales difieren dependiendo del tamaño del diámetro del vaso, y en vasos grandes, múltiples capas de células murales revisten una sola capa de células endoteliales, en vasos medianos y pequeños, una sola célula parietal reviste una sola célula endotelial, mientras que en vasos de diámetro estrecho, una sola célula parietal se adhiere a una pluralidad de células endoteliales. De esta manera, el revestimiento de células endoteliales vasculares por células parietales es importante para el proceso estructural de "maduración" de los vasos sanguíneos. Además, la formación de adhesión focal entre células endoteliales por adhesión entre células endoteliales vasculares de modo que los factores medioambientales intravasculares (factores celulares y humorales) no salgan fácilmente fuera de los vasos sanguíneos, es importante para el proceso de "maduración" funcional de vasos sanguíneos. Además, los vasos sanguíneos regulan el flujo sanguíneo de modo que el oxígeno y los nutrientes lleguen adecuadamente a todos los tejidos incrementando el flujo sanguíneo por medio de la dilatación del lumen en respuesta a las demandas de oxígeno y nutrientes por los tejidos, y particularmente cuando hay una escasez de ellos. En otras palabras, el proceso por el cual se controla que el lumen del vaso sea grande, mediano o pequeño por medio de la estabilización estructural controlando la permeabilidad como resultado de las células endoteliales vasculares que forman una adhesión focal e inducen la estabilización estructural debido al revestimiento adjunto de células parietales con células endoteliales vasculares se define como "maduración vascular".

15 Además, los vasos que tienen estructuras vasculares deterioradas se forman en diversos estados de la enfermedad y se forman vasos inmaduros en los que se inhibe la adhesión entre células endoteliales, o la adhesión de células parietales a células endoteliales es deficiente. Esto conduce a incrementos no regulados de la permeabilidad vascular, lo que da como resultado anomalías en los intercambios entre los factores humorales y las células en el tejido y los vasos sanguíneos. La permeabilidad incrementada da como resultado la formación de edema tisular, que a su vez provoca un deterioro de la función del tejido y conduce a la inflamación debido a la infiltración no regulada de células inflamatorias. Además, dado que las células parietales inhiben el brote vascular desde los vasos existentes, el brote de vasos de los vasos que no tienen células parietales se vuelve excesivo y se induce el brote de vasos no regulado que da como resultado la exacerbación del estado de la enfermedad. Este tipo de fenómeno se observa en enfermedades representadas por retinopatía diabética, tumores e inflamaciones. En otras palabras, el retorno de los vasos sanguíneos en los que la permeabilidad vascular se ha visto alterada o de vasos sanguíneos anormales que provocan hiperplasia vascular no regulada hasta un estado normal al mejorar la adhesión entre células endoteliales y promover el revestimiento de células endoteliales con células parietales se define como "normalización vascular". Además, en vasos sanguíneos anormales como se describe anteriormente, los cambios en los factores medioambientales circulatorios internos y externos provocados por diabetes, hiperlipemia o hipertensión y similares imparten daño (tal como muerte celular) a células endoteliales y células parietales, y se desencadenan por incrementos excesivos de factores en la producción de factores que promueven la angiogénesis provocados por cáncer o inflamación. Cuando tal estado de la enfermedad ha ocurrido, la inhibición del daño a los vasos existentes y la inhibición de la disociación entre células endoteliales o la inhibición de la disociación entre células endoteliales y células parietales se define como "estabilización vascular". Además, un mecanismo que inhibe la muerte celular de las células endoteliales está incluido en esta estabilización.

20 La angiogénesis se refiere a un fenómeno por el que se forma una red de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes, y está íntimamente implicada en enfermedades asociadas principalmente a lesiones vasculares, como tumores, artritis reumatoide crónica, retinopatía diabética, hiperlipemia o hipertensión. Después de la clonación molecular del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), las moléculas de la familia VEGF y de la familia de la angiopoyetina (Ang) se han identificado sucesivamente como factores que actúan específicamente en la formación de vasos sanguíneos. El VEGF y sus receptores están implicados en una extremadamente amplia gama de formación de vasos, que se extiende desde la formación inicial de los vasos sanguíneos denominada vasculogénesis hasta su subsecuente angiogénesis. Por otra parte, la Ang funciona en la formación del lumen que acompaña a fenómenos celulares tales como brote, ramificación, invaginación o poda por las células endoteliales vasculares después de la vasculogénesis. La Ang controla la adhesión entre células endoteliales vasculares y células parietales vasculares del estilo de células periféricas (pericitos) y células vasculares musculares lisas por medio de una tirosina quinasa de tipo receptor Tie-2 (tirosina quinasa con dominios de homología de Ig y EGF) que se expresa en las células endoteliales vasculares, y funciona en la estabilización estructural de los vasos sanguíneos (Experimental Medicine, vol. 20, No. 8 (2002), pp. 52-57: Documento no de patente 1).

Se han conocido previamente cuatro isoformas de angiopoyetina, que consisten en de Ang-1 a Ang-4, y aunque Ang-1 y Ang-2 están presentes tanto en seres humanos como en ratones, la Ang-3 solo está presente en ratones, mientras que la Ang-4 solo está presente en seres humanos. La Ang-1 y Ang-4 secretadas de células parietales inducen la adhesión entre células endoteliales y células parietales que acompañan la estimulación de Tie-2, inducción de la autofosforilación del dominio de la tirosina quinasa intracelular, activación de integrina, activación de la quinasa de adhesión focal (FAK) y activación de la fosfatidilinositol-3-quinasa/serina-treonina quinasa (PI3K/Akt). En un estado de oxígeno normal, aunque la adhesión entre células endoteliales y células parietales se mantiene mediante Ang-1 y Ang-4 secretadas constantemente por células parietales, cuando se produce un estado hipóxico local, la producción de antagonistas de Ang-1 y Ang-4 en forma de Ang-2 y Ang-3 se incrementa, inhibiendo por ello temporalmente la activación de Tie-2 e inhibiendo la adhesión entre células endoteliales y células parietales que las revisten. Las células endoteliales a continuación proliferan y comienza a brotar la angiogénesis debido a la disociación de células parietales, que conduce a la formación de una nueva red vascular. Dado que la activación de Tie-2 induce la adhesión entre células endoteliales y células parietales, contribuye a la estabilización de la estructura del vaso, mientras que también controla la permeabilidad vascular promoviendo la adhesión entre células endoteliales. Además, dado que también se sabe que la activación de Tie-2 inhibe la muerte celular de células endoteliales (Cho, C.H., Kammerer, R.A., Lee, H.J., Yasunaga, K., Kim, K.T., Choi, H.H., Kim, W., Kim, S.H., Park, S.K., Lee, G.M. y Koh, G.Y.: Designed ang angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2004, Apr.13, 101(15), 5553-8: Documento no de patente 2), los vasos sanguíneos se pueden estabilizar y normalizar en respuesta a factores medioambientales que dañan diversas estructuras vasculares intracelulares y extracelulares induciendo la activación de Tie-2 e inhibiendo la inestabilidad de los vasos sanguíneos. Además, induciendo la activación de Tie-2 en los vasos sanguíneos que han sido formados por células endoteliales vasculares en la terapia regenerativa vascular, la maduración de los vasos sanguíneos es posible induciendo adhesión entre células endoteliales y células parietales. Además, en enfermedades tales como tumores o retinopatía diabética, en las que los vasos sanguíneos exhiben crecimiento no regulado como resultado de la no adhesión de células parietales a células endoteliales, la activación de Tie-2 hace posible normalizar los vasos sanguíneos haciendo que las células parietales se adhieran a las células endoteliales. Además, según la bibliografía (Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D. y McDonald, D.M.: Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1, Science 1999, Dec. 24, 286 (5449): documento no de patente 3), se ha publicado que la activación de Tie-2 dilata el lumen vascular, y en enfermedades isquémicas que se ocurren provocadas por contracción vascular o inhibición de la dilatación vascular, el estado de la enfermedad se puede mejorar por medio de la dilatación del lumen vascular por activación de Tie-2.

Además, una pluralidad de moléculas que tienen un dominio enrollado en espiral y un dominio de tipo de fibrinógeno, que son características estructurales de Ang, se han descubierto recientemente. Dado que estas no tienen la capacidad de unirse a receptores Tie-1 o receptores Tie-2, se considera que constituyen un grupo de moléculas que difiere de la familia Ang existente, se han denominado proteína de tipo angiopoyetina (Angpt1), y se han publicado Angpt-1, -2, -3, -4, -5, -6 y -7. Aunque estos Angpt1 son ligandos huérfanos para los que aún se tienen que identificar receptores, se espera que demuestren varias acciones.

También se sabe que la activación de Tie-2 induce un estado latente en células distintas de las células endoteliales vasculares. Según publicaciones anteriores, se ha publicado que la activación de Tie-2 en células madre hematopoyéticas induce latencia en células madre hematopoyéticas (Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y. and Suda, T.: Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche, Cell, 2004, Jul. 23, 118 (2), 149-161: Documento no de patente 4). En otras palabras, la inducción de Tie-2 hace posible mantener la supervivencia de células madre hematopoyéticas in vitro durante largos períodos de tiempo. Además, según publicaciones anteriores, se sabe que la activación de Tie-2 induce la adhesión de células a la matriz extracelular y similares activando factores de adhesión tales como integrina (Takakura, N., Huang, X.L., Naruse, T., Hamaguchi, I., Dumont, D.J., Yancopoulos, G.D. y Suda, T.: Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis, Immunity, 1998, Nov., 9 (5), 677-86: Documento no de patente 5). Se cree que la inducción de esta adhesión celular permite la inducción del mantenimiento de la supervivencia dependiente del anclaje en células madre hematopoyéticas tanto in vitro como in vivo debido a la activación de Tie-2. Además, según publicaciones recientes, se ha sugerido la expresión de Tie-2 en las células madre de cáncer, que se considera que tienen el mayor grado de malignidad en el tejido canceroso y están implicadas en la recaída del cáncer (Lee, O.H., Xu, J., Fueyo, J., Fuller, G.N., Aldape, K.D., Alonso, M.M., Piao, Y., Liu, T.J., Lang, F.F., Bekele, B.N. and Gomez-Manzano, C.: Expression of the receptor tyrosine kinase Tie2 in neoplastic glial cells is associated with integrin betal-dependent adhesión to the extracelular matrix. Mol. Cancer Res., 2006, Dec., 4 (12), 915-26: Documento no de patente 6). De la misma manera que la activación de Tie-2 es capaz de provocar que el ciclo celular de las células madre hematopoyéticas entre en un estado latente, la proliferación del células madre cancerosas también se pueden inhibir mediante la activación de Tie-2 expresada en células madre cancerosas.

60 Descripción de la invención

[Problemas a resolver por la invención]

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo agente de maduración, normalización, estabilización

vascular y agente de activación (fosforilación) de Tie-2.

[Medios para resolver los problemas]

El comportamiento dentro del tejido cutáneo irradiado con ultravioleta B se estudió en detalle por los inventores de la presente invención. La irradiación con ultravioleta B provocó una considerable hipertrofia epidérmica y vascularización de la piel y provocó la formación de arrugas. Se encontró que la expresión de Ang-1 se deprimía significativamente en tejido cutáneo sometido a tal fotoenvejecimiento, mientras que se encontró que la expresión de Ang-2 se ha incrementado con relación a Ang-1. Además, el estado descamado de las células parietales de las células endoteliales vasculares provocado por radiación ultravioleta se observó en secciones de tejido cutáneo. Según estos hallazgos, la adhesión entre células endoteliales y células parietales fue inhibida por la radiación ultravioleta, y se sugirió que se indujo un estado en el que la inhibición de la fosforilación de Tie-2, concretamente la activación de Tie-2, se inhibió. En base a experimentos realizados permitiendo que diversos extractos de hierbas medicinales actúen sobre una línea celular pro-B murina, Ba/F3 transducida con TIE2 (BaF/TIE2) murino de longitud completa, y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), se descubrió que extractos derivados de plantas que pertenecen al género *Cinnamomum* tienen acción que activa Tie-2. Además, como resultado de aplicar extracto de rama de canela sobre piel de ratón en la que se había provocado fotoenvejecimiento irradiando con ultravioleta B, la acción de mejora se indicó específicamente aplicando este extracto. Por consiguiente, se encontró que este extracto mejora y promueve la adhesión entre las células endoteliales y las células parietales debido a la fosforilación de Tie-2, permite la formación de una estructura vascular estable y, a su vez, permite la recuperación de la lesión de la piel y la formación de arrugas inducida por UVB, conduciendo por ello a la finalización de la presente invención.

La presente invención está definida por las reivindicaciones y se refiere a:

- (1) un extracto derivado de una planta perteneciente al género *Cinnamomum* para su uso en la prevención o mejora del fotoenvejecimiento;
- (2) el extracto para su uso según (1), en el que el extracto se deriva de una planta de la especie *Cinnamomum cassia* Blume;
- (3) el extracto para su uso según (2), en el que el extracto se deriva de rama de canela o corteza de canela;
- (4) el extracto para su uso según uno cualquiera de (1) a (3), en el que el extracto es un extracto en agua;
- (5) el extracto para su uso según cualquiera de (1) a (4), en el que dicho fotoenvejecimiento es provocado por lesión de la piel o exposición a luz ultravioleta; y
- (6) el extracto para su uso según cualquiera de (1) a (5), en el que dicho fotoenvejecimiento se identifica por un estado seleccionado del grupo que consiste en agrietamiento de la piel, aparición de angiectasia capilar, formación de lunares, aparición de púrpura, aumento de la susceptibilidad a lesiones, atrofia, aparición de regiones fibrosas de despigmentación y aparición de tumores premalignos o tumores malignos.

Breve descripción de los dibujos

- La FIG. 1 muestra los resultados de la fosforilación de Tie-2 por extracto de rama de canela y Ang-1 en células Baf3.
- La FIG. 2 muestra los resultados de la fosforilación de Tie-2 por extracto de rama de canela y extracto de corteza de canela.
- La FIG. 3 muestra los resultados de la fosforilación de Tie-2 por extracto de rama de canela y Ang-1 en células HUVEC.
- La FIG. 4 muestra una imagen teñida de la formación del lumen.
- La FIG. 5 muestra la acción inhibitoria de la angiogénesis del extracto de canela en base a la longitud de la formación del lumen.
- La FIG. 6 muestra la acción inhibitoria de la angiogénesis del extracto de canela en base al área superficial de la formación del lumen.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Las plantas que pertenecen al género *Cinnamomum* son plantas del orden Lauraceae, familia Lauraceae que consisten en más de 300 especies, cuyos ejemplos conocidos incluyen *Cinnamomum cassia* Blume, *C. camphora*, *C. daphnoides*, *C. doederleinii*, *C. japonicum*, *C. pseudo-pedunculatum*, *C. sieboldii*, *C. verum* y *C. zeylanicum*. Un extracto derivado de *Cinnamomum cassia* Blume, y particularmente un extracto derivado de rama de canela o corteza de canela, se usa preferentemente como agente de maduración, normalización o estabilización vascular, agente de activación (fosforilación) de Tie-2 o inhibidor de angiogénesis en la presente invención. Aunque se sabe

que los extractos derivados de corteza de canela son útiles como ingredientes activos de tónicos capilares, por ejemplo (publicación de patente japonesa no examinada No. H10-265350), no se conoce que tengan actividad de maduración, normalización o estabilización vascular, actividad de activación (fosforilación) de Tie-2 o actividad inhibidora de la angiogénesis.

5 Los extractos mencionados anteriormente se pueden obtener según métodos ordinarios, por ejemplo, sumergiendo o calentando a reflujos una planta que sirve como fuente de los mismos con un disolvente de extracción a temperatura ambiente o calentando, filtrando y concentrando. Se puede usar cualquier disolvente para el disolvente de extracción con tal de que sea un disolvente usado normalmente para extracción, cuyos ejemplos incluyen disolventes acuosos tales como agua, disolución salina fisiológica, tampón de fosfato o tampón de borato y
10 disolventes orgánicos del estilo de alcoholes tales como metanol, etanol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina, alcoholes hidratados, cloroformo, dicloroetano, tetracloruro de carbono, acetona, acetato de etilo y hexano, y cada uno de estos se puede usar solo o en combinación. Se usa agua preferentemente para el disolvente. Un extracto obtenido por extracción con los disolventes anteriores se puede usar tal cual, se puede concentrar liofilizando, por ejemplo, para obtener un extracto, se puede usar después de retirar las impurezas según sea necesario mediante un
15 método de adsorción o usando una columna de intercambio iónico, por ejemplo, o se puede usar después de eluir con un disolvente deseado y concentrar después de haber adsorbido con una columna de polímero poroso (tal como Amberlite XAD-2).

La activación de Tie-2 se refiere a la capacidad de ser capaz de convertir Tie-2 a su forma activa (Tie-2 fosforilada) por fosforilación. Un ejemplo de un agente de activación de Tie-2 es la angiotensina 1, que se sabe que activa el Tie-
20 2.

El extracto derivado de una planta que pertenece al género *Cinnamomum* se puede usar como un producto farmacéutico o cosmético útil para prevenir y mejorar diversas enfermedades y el envejecimiento provocados por cambios en la estructura vascular. El extracto se puede usar como un producto farmacéutico para mejorar los sitios de lesiones en todo el cuerpo que acompañan a la angiogénesis y la destrucción vascular en varias enfermedades
25 inflamatorias, enfermedades inmunes y enfermedades de aparición en adultos, tales como varias enfermedades infecciosas, cáncer, artritis reumatoide, gota, hipertensión, diabetes, arteriosclerosis o dermatitis atópica, induciendo la normalización y la estabilización vascular. Además, también se puede usar como producto farmacéutico o cosmético para mejorar los síntomas de edema de órganos, que incluyen la piel, sistemas y tejidos orgánicos, tal como el edema vascular provocado por enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunes o enfermedades de
30 aparición en adultos, o edema y picazón causado por el aumento de la permeabilidad vascular debido a la exposición a los rayos ultravioleta, picaduras de insectos o alergias, inhibiendo la permeabilidad vascular. Además, el extracto se puede usar como un producto farmacéutico o cosmético capaz de inhibir la inestabilidad vascular inhibiendo la muerte celular de células endoteliales inducida por diversos factores tales como enfermedades
35 inflamatorias, enfermedades inmunes o enfermedades de aparición en adultos tales como varias enfermedades infecciosas, cáncer, artritis reumatoide, gota, hipertensión, diabetes, arteriosclerosis, o inhibiendo la muerte celular de las células endoteliales provocada por una lesión por radiación, varios fármacos o rayos ultravioleta. El extracto se puede usar en productos farmacéuticos como un mejorador de la promoción de la curación de heridas tales como úlceras por traumatismo o decúbito, maduración vascular en terapia regenerativa vascular o enfermedades
40 isquémicas tales como infarto cerebral o infarto de miocardio, por maduración vascular y dilatación del lumen vascular, y también se puede usar como medicación interna o compuesto farmacéutico aplicado externamente para el dolor lumbar, la congelación o la caída del cabello utilizando sus efectos de mejora de la circulación. También se puede aplicar a la demencia en términos de aumentar el flujo sanguíneo cerebral. También se puede usar como cosmético con respecto a la pérdida de cabello. Además, en casos de cáncer, se puede usar como un fármaco para
45 mantener células madre in vitro e in vivo funcionando como un fármaco terapéutico que induce quiescencia en células cancerosas.

Según la invención, sin embargo, el extracto derivado de una planta que pertenece al género *Cinnamomum* se usa para prevenir o mejorar el fotoenvejecimiento. El fotoenvejecimiento típicamente se refiere a los cambios en el aspecto y función de la piel observados como resultado de la exposición repetida a la luz solar. La luz ultravioleta (UV), que es uno de los elementos constitutivos de la luz solar, y particularmente la radiación UV intermedia (denominada UVB y que tiene una longitud de onda de 290 a 320 nm), es la principal causa del fotoenvejecimiento.
50 La dosis de exposición a UVB requerida para provocar el fotoenvejecimiento es actualmente desconocida. Sin embargo, la exposición repetida a los rayos UVB a un nivel que provoca manchas rojas o quemaduras solares generalmente conduce al fotoenvejecimiento. Clínicamente, el fotoenvejecimiento se puede identificar por grietas en la piel, formación de arrugas, oscurecimiento de la piel, formación de comas, aparición de angiectasia capilar, formación de lunares, aparición de púrpura, aumento de la susceptibilidad a lesiones, atrofia, aparición de regiones de despigmentación fibrosa o la aparición de tumores premalignos o tumores malignos. El fotoenvejecimiento normalmente ocurre en la piel que habitualmente está expuesta a la luz solar, como la piel de la cara, las orejas, la cabeza, el cuello y las manos. Aunque el fotoenvejecimiento provocado por la lesión de la piel o la exposición a la luz ultravioleta es la causa principal del envejecimiento en la piel, el extracto se puede usar para mejorar el
60 fotoenvejecimiento inhibiendo el daño vascular provocado por el fotoenvejecimiento.

La dosificación, método de administración y forma del fármaco de un agente de maduración, normalización o estabilización vascular o agente de fosforilación de Tie-2 que comprende el extracto derivado de una planta que

pertenece al género *Cinnamomum* se pueden determinar apropiadamente según el propósito de uso. Por ejemplo, la forma de administración de tal inhibidor de angiogénesis o agente de fosforilación de Tie-2 puede ser una preparación oral, una preparación parenteral o una preparación externa y similares. Los ejemplos de formas farmacológicas incluyen preparaciones orales tales como comprimidos, polvos, cápsulas, gránulos, extractos o jarabes, preparaciones parenterales tales como inyecciones, goteos intravenosos o supositorios, y preparaciones externas tales como pomadas, cremas, lociones lechosas, lociones, paquetes faciales o aditivos de baño.

Aunque la cantidad incorporada del extracto derivado de una planta que pertenece al género *Cinnamomum* que inhibe la angiogénesis del agente de maduración, estabilización o estabilización vascular o agente de activación (fosforilación) de Tie-2 se puede determinar apropiadamente según la aplicación, típicamente es de 0,001 a 20,0% en peso y preferentemente de 0,0001 a 10,0% en peso en forma de extracto seco basado en el peso total del inhibidor.

Además, un vehículo, desecante, conservante, agente fortificante, espesante, emulsionante, antioxidante, edulcorante, agente agrio, agente aromatizante, colorante o fragancia y similares normalmente usados en alimentos y productos farmacéuticos, o un agente blanqueante, humectante, componente aceitoso, absorbente de ultravioleta, tensioactivo, espesante, alcohol, componente en polvo, colorante, componente acuoso, agua o varios tipos de nutrientes para la piel y similares, se pueden incorporar apropiadamente según sea necesario en el agente de maduración, normalización o estabilización vascular o agente de activación (fosforilación) de Tie-2, además del extracto derivado de una planta que pertenece al género *Cinnamomum* descrito anteriormente.

Además, en el caso de usar un agente de maduración, normalización o estabilización vascular o agente de activación (fosforilación) de Tie-2 que comprende el extracto derivado de una planta que pertenece al género *Cinnamomum* en forma de una preparación cutánea externa, se puede incorporar apropiadamente en ella un asistente comúnmente usado en preparaciones cutáneas externas, cuyos ejemplos incluyen agentes quelantes de metales tales como edetato de disodio, edetato de trisodio, citrato de sodio, polifosfato de sodio, metafosfato de sodio o ácido glucónico, fármacos tales como cafeína, tanino, verapamilo, ácido tranexámico y sus derivados, extracto de regaliz, glabridina, extractos en agua caliente de fruta de espino de fuego (*Pyracantha fortuneana*), varias hierbas medicinales, acetato de tocoferol o ácido glicirricó y sus derivados o sales, agentes blanqueantes tales como vitamina C, ascorbilfosfato de magnesio, ascorbilglucósido, albutina o ácido kójico, azúcares tales como glucosa, fructosa, manosa, sacarosa o trehalosa y compuestos de vitamina A tales como ácido retinoico, retinol, acetato de retinilo o palmitato de retinilo.

[Ejemplos]

Lo siguiente proporciona una explicación más detallada de la presente invención por medio de sus ejemplos. Las cantidades incorporadas se indican en forma de porcentaje en peso (% en peso).

Preparación de residuo seco de extracto en agua caliente de rama de canela

Se añadieron 400,7 g de rama de canela (porción de rama de *Cinnamomum cassia* Blume) a 2 l de agua seguido de calentamiento y extracción durante 3 horas y filtración. Se añadieron 2 l de agua al residuo resultante seguido de calentamiento y extracción dos veces repitiendo el mismo procedimiento. El líquido resultante se liofilizó para obtener 39,7 g de un residuo seco de extracto en agua caliente. Esta muestra se usó como extracto en agua caliente de rama de canela.

Tratamiento de extracto de rama de canela con columna HP-20

Se cargaron 10 g del extracto en agua caliente obtenido anteriormente en una columna Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical) y se eluyeron con etanol hidratado para obtener una fracción de elución de etanol al 50% como la fracción de elución objetivo.

Preparación de residuo seco de extracto en agua caliente de corteza de canela

Se añadieron 20,12 g de corteza de canela (porción de corteza de *Cinnamomum cassia* Blume) a 200 ml de agua seguido de calentamiento y extracción durante 3 horas y filtración. Se añadieron 200 ml de agua al residuo resultante seguido de calentamiento y extracción dos veces repitiendo el mismo procedimiento. El líquido resultante se liofilizó para obtener 1,35 g de un residuo seco de extracto en agua caliente. Esta muestra se usó como extracto en agua caliente de corteza de canela.

Método de evaluación de la fosforilación de Tie-2

Se incubaron células Baf3, una línea celular murina pro-B, Ba/F3 transducidas con TIE2(BaF/TIE2) murino de longitud completa en medio RPMI 1640 en presencia de IL-3 (Biosource, PMC0034) y FCS al 10%. Las células se depositaron en una placa de 6 pocillos a 2×10^6 células/1,5 ml/pocillo y se incubaron durante la noche mientras se omitía el FCS comenzando el día anterior a la estimulación celular. Disoluciones de DMSO de los residuos secos de extracto en agua caliente antes mencionados, Angiopoietin-1 (R & D System, 932-AN) como control positivo o DMSO como control negativo se añadieron a los pocillos a una concentración final de 100 ppm, 0,5 ppm y 1.000

ppm, respectivamente, seguido de incubación durante 10 minutos, enfriando las células en hielo y lavando con PBS enfriado. Las células se homogeneizaron a continuación ultrasónicamente en tampón RIPA que contiene inhibidores de proteasa (leupeptina, aprotinina, pepstatina, PMSF, Na_2VO_4). A continuación se añadió tampón de muestra (Tris-HCl 0,2 M (pH 6,8), SDS al 4%, glicerol al 20%, EDTA 5 mM, BPB al 0,01%) seguido de la realización de SDS-PAGE

5

Gel: gel de acrilamida al 7,5% (NPU-7.5L, Atto Corp.)

Condiciones de Foresis: 40 mA (75 minutos, 2 láminas de gel)

Anticuerpo Tie-2: sc-324 (Santa Cruz Biotechnology)

Anticuerpo Phospho-Tie-2: # 4221 (Cell Signaling)

10 A continuación, se llevó a cabo la transferencia de Western (20 V, 4°C, durante la noche) para la transcripción a una membrana de PVDF. Después de bloquear (1 hora) con leche desnatada al 5%/TBST, se añadió anticuerpo Tie-2 (Santa Cruz, sc-324) o anticuerpo Tie-2 fosforilado (Cell Signaling, # 4221) seguido de dejar en reposo durante la noche a 4°C. A continuación, se añadió sHRP IgG anti-conejo de cabra (Biosource, ALI3404) seguido de dejar en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectaron bandas de proteínas por detección por

15

La FIG. 1 muestra los resultados de la evaluación de la fosforilación de Tie-2 del extracto en agua caliente de rama de canela. Se observó que el extracto de rama de canela provocaba la fosforilación de Tie-2 de la misma manera que Ang-1. De este modo, se sugirió que el extracto en agua caliente de rama de canela muestra los efectos de fosforilación de Tie-2 y contribuye a la maduración, normalización y estabilización vascular, haciendo posible por ello

20

2) La fosforilación de Tie-2 se evaluó similarmente usando células endoteliales de vena umbilical humana normal (HUVEC). El medio se cambió de Humedia a RPMI 1640 tres horas antes de la estimulación celular, seguido de evaluación de la misma manera que las células Baf3. Los resultados se muestran en la FIG. 3. De manera similar a los resultados para las células Baf3, el extracto de rama de canela provocó la fosforilación de Tie-2 de la misma manera que Ang-1. Además, no se observó una fosforilación significativa de Tie-2 en el sistema al que se añadió DMSO que se usó como control negativo (no mostrado).

25

30 Ensayo de los efectos de prevención/mejora de arrugas. Ensayo de mejora de arrugas de fotoenvejecimiento

Se formaron arrugas usando ratones sin pelo Hr-1 (Skh-1) (animales de laboratorio Hoshino: de 6 a 10 semanas de edad) de acuerdo con un método que consiste en irradiar repetidamente con UVB (Naganuma, M., et al., J Dermatol. Sci., 25, 29-35, 2001; Schwartz, E., J., Invest. Dermatol., 91, 158-161, 1988) usando una variación parcial del método de Schwartz (Haratake, A. et al., J. Invest. Dermatol., 108, 769 - 775, 1997). A saber, los lomos de ratones individuales se irradiaron tres veces a la semana durante 10 semanas con UVB (fuente de luz: lámpara fluorescente Toshiba FL-20SE, Toshiba). La dosis en el inicio del ensayo se ajustó a 36 mJ/cm^2 y se incrementó gradualmente a partir de la segunda semana, alcanzando finalmente una dosis de 216 mJ/cm^2 en la décima semana. La dosis de radiación total fue de $4,6 \text{ J/cm}^2$. Los valores medidos usando un radiómetro de UV (UVR-305 / 365D (II), Topcon) se usaron para la dosificación de la radiación. Después de completar la exposición a la radiación, se tomaron fotografías de los lomos de los animales, se puntuó el grado de formación de arrugas según los siguientes criterios de evaluación usando una variación parcial del método de Bissett (Bissett, DL, et al., Photochemistry and Photobiology, 46, 367-378, 1987), y el extracto del Ejemplo 1 (extracto de rama de canela, que incorpora el residuo seco de extracto en agua caliente antes mencionado) o el extracto del Ejemplo 2 (extracto de rama de canela, que incorpora la fracción de elución de etanol al 50% de la columna HP-20) se aplicó solo a aquellos animales que mostraron una puntuación de formación de arrugas de 7 o superior. La puntuación de formación de arrugas se llevó a cabo por tres analistas por separado y las puntuaciones finales se determinaron de común acuerdo.

35

40

45

Además, la evaluación de la formación de arrugas se llevó a cabo sobre la base de un protocolo que se aprobó por un comité interno de examen de animales de laboratorio, mientras se observaba estrictamente la Ley de Tratamiento y Manejo Humanitario de los Animales y otras ordenanzas relacionadas.

50

Composición del Ejemplo 1:

	(componentes)	cantidad incorporada (% en peso)
	Extracto de rama de canela	1,0
	Alcohol de calidad cosmética	30,0
5	Agua purificada	El resto

Composición del Ejemplo 2:

	(componente)	Cantidad incorporada (% en peso)
	Fracción de elución de etanol al 50% de columna HP-20	1,0
	Etanol de calidad cosmética	30,0
10	Agua purificada	El resto

Puntuación: Criterios de evacuación

- 0: no se observaron arrugas
- 1: arrugas más superficiales, más cortas o menos que en el nivel 2
- 2: arrugas superficiales observadas
- 15 3: arrugas más profundas o más largas que en el nivel 2, pero menos profundas, más cortas o menos que en el nivel 4
- 4: arrugas superficiales observadas en toda el lomo
- 5: arrugas más profundas o más largas que en el nivel 4, pero menos profundas o más cortas que en el nivel 6
- 6: arrugas profundas observadas
- 20 7: arrugas más profundas, más largas y más numerosas que en el nivel 6, pero menos profundas o cortas que en el nivel 8
- 8: arrugas profundas y largas observadas en todo el lomo.

25 Los ratones sin pelo evaluados con una puntuación de 7 o superior se dividieron en dos grupos de 5 animales cada uno de modo que ambos grupos tenían la misma puntuación media, y los 100 µml de las formulaciones del Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 que tenían las composiciones descritas anteriormente se aplicaron respectivamente a la piel de todos los lomos de los animales de cada grupo una vez al día y 5 veces a la semana durante 6 semanas consecutivas.

30 Después de la finalización de la aplicación, se tomaron fotografías de los lomos de los animales y 3 analistas puntuaron separadamente el grado de formación de arrugas según los criterios de evaluación indicados anteriormente, mientras se ocultaba el nombre del grupo de los animales, después de lo cual se determinaron las puntuaciones finales por medio de común acuerdo.

Además, se llevó a cabo el mismo ensayo en animales usando una formulación designada como Ejemplo Comparativo 1 de la que se omitió el extracto de rama de canela de la composición del Ejemplo 1.

Composición del ejemplo comparativo 1:

	(componentes)	Cantidad incorporada (% en peso)
35	Etanol de calidad cosmética	30,0
	Agua purificada	El resto

El grado de mejora de las arrugas se determinó de la manera descrita a continuación. A saber, el grado de mejora se calculó según la siguiente ecuación:

40 Grado de mejora de las arrugas = (Puntuación antes de aplicar la disolución de muestra) – (Puntuación después de aplicar la disolución de muestra durante 6 semanas)

Los grados de mejora como los obtenidos según la ecuación anterior se muestran como el valor medio de cada

grupo en la tabla a continuación.

Tabla 1

	Grado de mejora de las arrugas. Media
Extracto de rama de canela	3,2
Formulación de control	2,3
Fracción de elución con etanol al 50% en columna HP-20 de rama de canela	2,4
Formulación de control	1,4

5 Como está claro en la tabla, la reducción de arrugas se promovió significativamente en el grupo al que se aplicó la formulación del Ejemplo 1 de la presente invención (que incorpora extracto de rama de canela) en comparación con el grupo al que se aplicó la formulación de control (que no incorpora extracto). Similarmente, la reducción de arrugas también se promovió significativamente en el Ejemplo 2. En base a estos resultados, se confirmó que tanto la disolución de rama de canela como la fracción de elución en etanol al 50% en columna HP-20 de rama de canela mostraron efectos de mejora de las arrugas.

10 Evaluación de la acción inhibidora de la angiogénesis

Se realizó un ensayo para confirmar la acción inhibidora de la angiogénesis del extracto en agua caliente de corteza de canela.

15 Se co-cultivaron células endoteliales de vena umbilical humana normal y fibroblastos dérmicos humanos a una relación constante usando un kit de angiogénesis (Kurabo Industries) y se prepararon en el estado de crecimiento de la etapa inicial de formación de lumen. Las células se incubaron (en condiciones de 37°C y 5% de CO₂) después de añadir medio que contiene una concentración prescrita de extracto en agua caliente de corteza de canela en presencia de 10 ng/ml de factor de crecimiento celular endotelial A (VEGF-A, Kurabo Industries). El medio se reemplazó respectivamente con medio que contiene una concentración prescrita de extracto de corteza de canela en presencia de VEGF-A 4 días, 7 días y 9 días después del comienzo del cultivo. Subsecuentemente, la capa de células en cada pocillo se fijó con etanol al 70% y se tiñó con CD31 (PECAM-1). Las imágenes teñidas obtenidas de cada pocillo se fotografiaron a continuación (FIG. 4), y las imágenes se analizaron usando la longitud y área superficial de formación de lumen como indicadores para evaluar la acción inhibidora de la angiogénesis (FIGS. 5 y 6). El análisis de imágenes de la longitud de la formación de lumen y el análisis de imágenes para el área superficial se llevaron a cabo respectivamente usando software de cuantificación de angiogénesis (Kurabo Industries). Se consideró que los incrementos de la longitud de la formación de lumen y los incrementos del área superficial de la formación de lumen significaban que se observó angiogénesis. Un grupo al que se añadió solo medio se usó como control, un grupo al que solo se añadió VEGF-A (10 ng/ml) se usó como control negativo, y un grupo al que se añadió Suramina, un conocido inhibidor de la angiogénesis, se usó como control positivo. Además, la acción inhibidora de la angiogénesis en presencia de VEGF-A se evaluó también para Ang-1, que se sabe que tiene una acción que es responsable de la estabilización vascular.

Discusión de los resultados

35 La FIG. 4 es una imagen teñida de la formación de lumen después de la tinción de las células con DAB. En contraste con la formación del lumen que se observa en el caso de haber cultivado en presencia de VEGF-A, se determinó que la formación de lumen se inhibe en el caso del cultivo con VEGF-A en presencia de un conocido inhibidor de la angiogénesis en la forma de Suramina y extracto de corteza de canela (y particularmente a 300 ppm). Las FIGS. 5 y 6 muestran el resultado de cuantificar los resultados observados en la FIG. 4, y sugerían que el extracto de corteza de canela inhibe significativamente la angiogénesis inducida por VEGF-A dependiente de la dosis entre 10 y 300 ppm. Es interesante advertir que la Ang-1 no tenía acción inhibidora de la angiogénesis. De este modo, se sugirió que, aunque el extracto en agua caliente de corteza de canela muestra acciones tales como acción de estabilización vascular por fosforilación de Tie-2 por un mecanismo del tipo de Ang-1, muestra acción inhibidora de la angiogénesis por un mecanismo que difiere del de la Ang-1.

REIVINDICACIONES

1. Un extracto derivado de una planta que pertenece al género *Cinnamomum* para uso para prevenir o mejorar el fotoenvejecimiento.
- 5 2. El extracto para uso según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el extracto se deriva de una planta de la especie *Cinnamomum cassia* Blume.
3. El extracto para uso según la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que el extracto se deriva de rama de canela o corteza de canela.
- 10 4. El extracto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por el hecho de que el extracto es un extracto en agua.
5. El extracto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que dicho envejecimiento está provocado por la lesión de la piel o exposición a la luz ultravioleta.
- 15 6. El extracto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por el hecho de que dicho fotoenvejecimiento se identifica por un estado seleccionado del grupo que consiste en agrietamiento de la piel, aparición de angiectasia capilar, formación de lunares, aparición de púrpura, susceptibilidad a las heridas incrementada, atrofia, aparición de regiones de despigmentación fibrosa, y aparición de tumores premalignos o tumores malignos.

Fig.1

RESULTADOS DE LA EVALUACION DE LA FOSFORILACIÓN DE Tie2 POR EXTRACTO EN AGUA CALIENTE DE RAMA DE CANELA (WT Tie2-BaF/3)

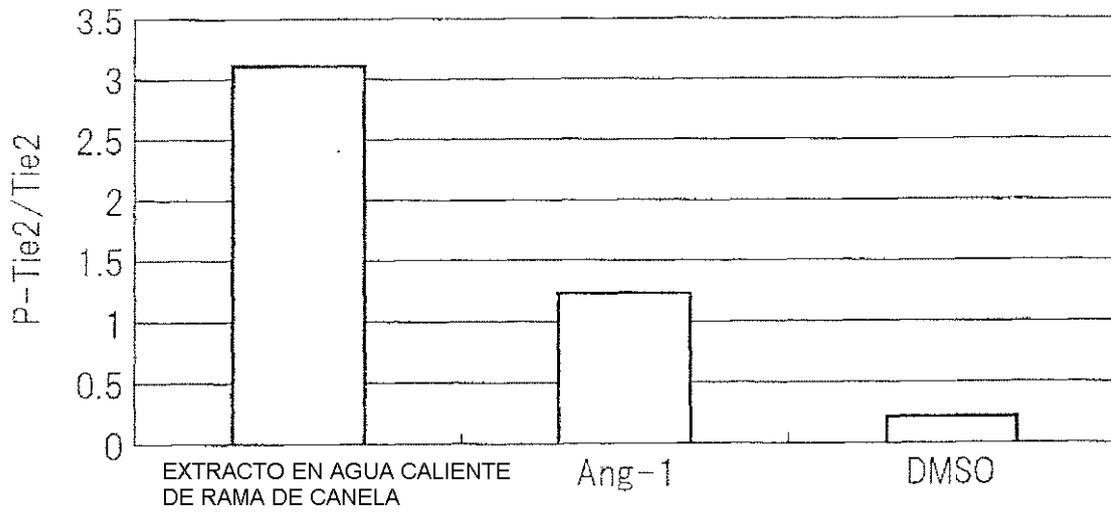
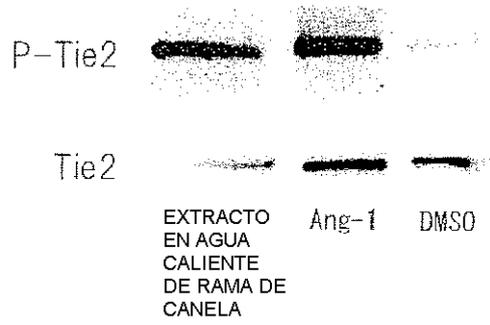


Fig.2

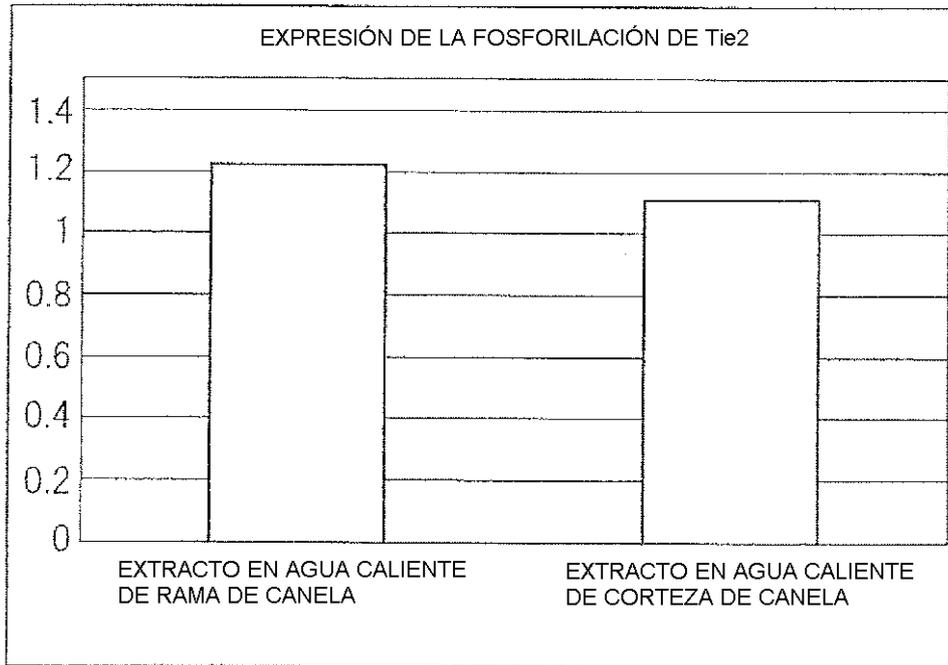
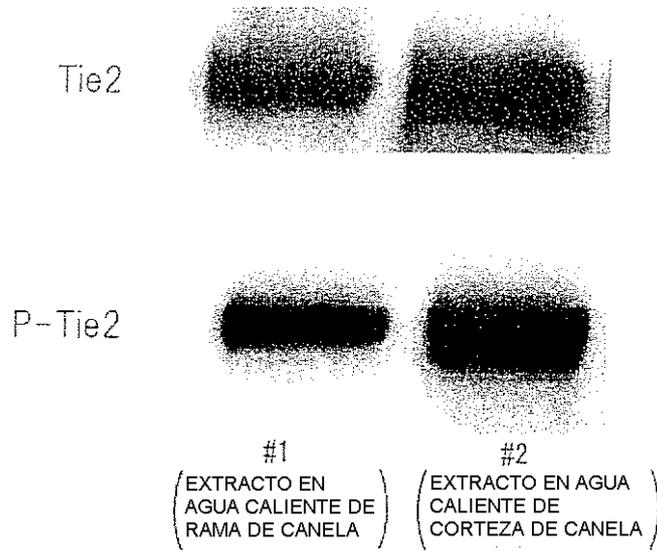


Fig.3

RESULTADOS DEL ENSAYO HUVEC (CÉLULAS ENDOTELIALES VASCULARES HUMANAS)

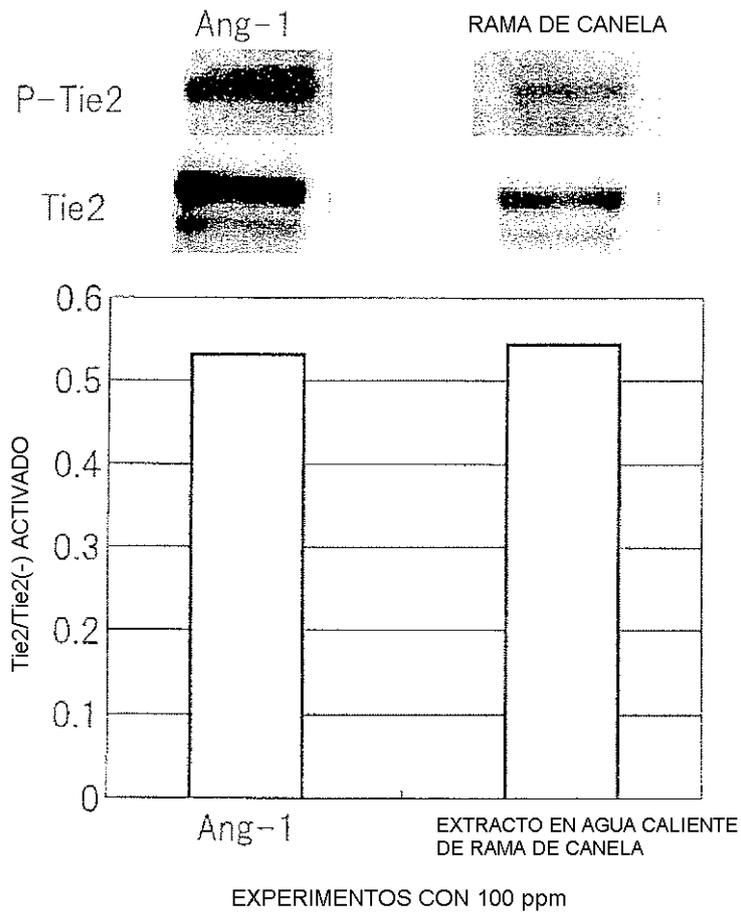


Fig.4

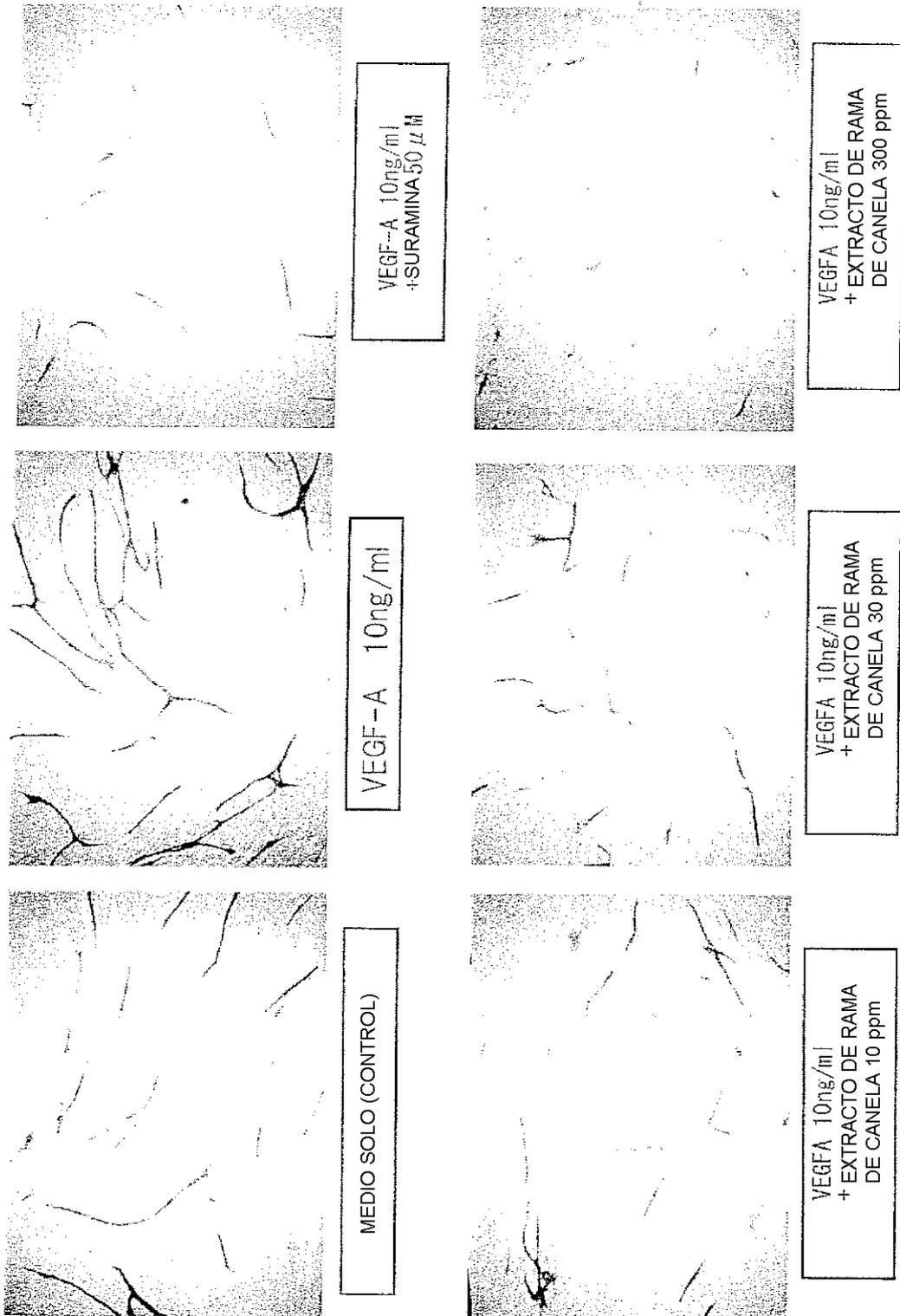


Fig.5

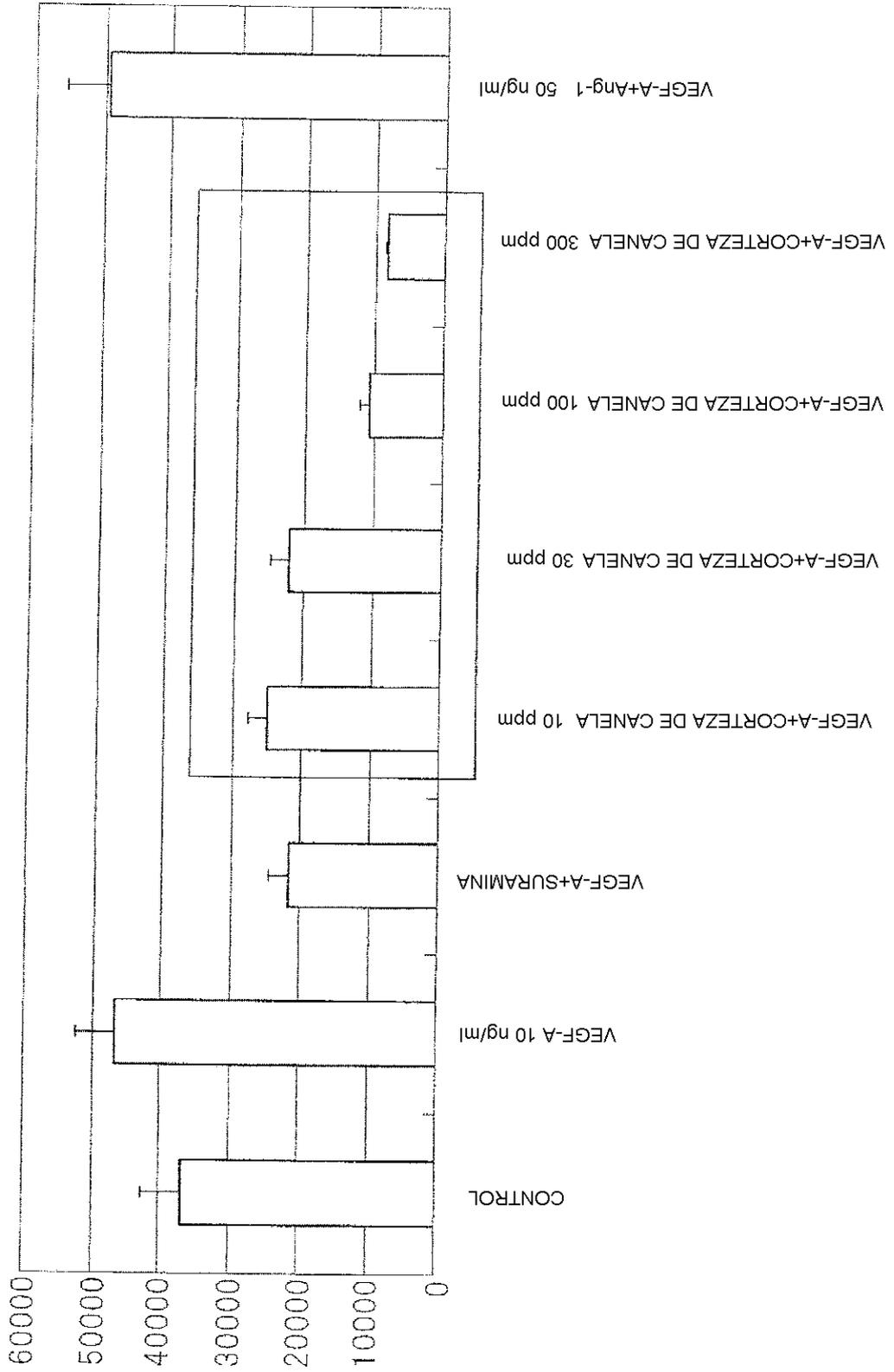


Fig.6

