

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 238**

51 Int. Cl.:

A61K 31/352 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)
A61K 36/00 (2006.01)
A61K 36/75 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2013 PCT/JP2013/067866**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14103410**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2013 E 13866826 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 2939672**

54 Título: **Agente promotor de la producción de IGF-1**

30 Prioridad:

26.12.2012 JP 2012283414

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.06.2020

73 Titular/es:

**MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD. (100.0%)
33-1 Shiba 5-chome Minato-ku
Tokyo 108-8384, JP**

72 Inventor/es:

**OSHIO, KAZUTAKA;
NAKAMURA, HIROHIKO y
SAKATA, YASUYUKI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 765 238 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agente promotor de la producción de IGF-1

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un agente promotor de la producción de IGF-1 que comprende un polimetoxiflavonoide como ingrediente activo para usar en el tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada de la deficiencia de la hormona del crecimiento en adultos, enanismo por deficiencia de la hormona del crecimiento y alopecia. La invención se refiere además al uso de un agente promotor de la producción de IGF-1 que comprende un polimetoxiflavonoide como ingrediente activo para la mejora del rendimiento deportivo, la promoción del crecimiento, la promoción del fortalecimiento físico mediante fisiculturismo, la promoción del metabolismo o el fortalecimiento de los músculos, con la condición de que se excluyan los usos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

Estado de la técnica

15 La síntesis de proteínas es estimulada por cambios de condiciones fisiológicas tales como las proporcionadas por la ingestión de alimentos, ejercicio y sueño. Las hormonas de crecimiento secretadas por la hipófisis al recibir estos estímulos actúan directa o indirectamente sobre los órganos objetivo. Cuando las hormonas de crecimiento actúan indirectamente, el factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) secretado por el hígado estimulado por una hormona de crecimiento es transportado por la sangre por todo el cuerpo y actúa en un órgano objetivo. Se sabe que la mayoría de las células humanas, especialmente las células de músculo, hueso, hígado, riñón, nervio, piel y pulmón, están influenciadas por IGF-1.

20 Por ejemplo, si IGF-1 se une a un órgano objetivo, o un receptor de cada célula de un tejido, la transferencia de señal comienza dentro de la célula. Existe la proteína objetivo rapamicina de mamífero (mTOR) corriente abajo de esta transferencia de señal. El sistema de transferencia de señal a través de mTOR funciona como un sensor para el equilibrio de aminoácidos en el entorno celular de los mamíferos, y participa en la síntesis de proteínas a través del control de las actividades de dos de los factores reguladores importantes involucrados en la traducción de proteínas, la S6 quinasa 1 (S6K1, documento 1 que no es de patente) y la proteína de unión al factor de iniciación 4E (4E-BP1, documento 2 que no es de patente) (documento 1 de patente, documentos 3 y 4 que no son de patente). También se sabe que S6K1 y 4E-BP1 se activan al fosforilarse (documento 5 que no es de patente).

Por lo tanto, la concentración de IGF-1 y los estados activados de S6K1 y 4E-BP1 (estados fosforilados) se usan frecuentemente como índices de síntesis de proteínas.

30 En los documentos de patente relativos a la promoción de la síntesis de proteínas, se ha reportado un hidrolizado de proteína de suero (documento 2 de patente), membrana de ovario de pez (documento 3 de patente), 11 β -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona (documento 4 de patente), glucósido de esteroide derivado de arroz integral germinado (documento 5 de patente), etc.

35 Aunque se conocen varias sustancias que tienen una acción promotora de síntesis de proteínas como se describió anteriormente, no se sabe que el extracto de *Citrus depressa*, o un polimetoxiflavonoide como la nobiletina y la tangeretina tengan una acción promotora de síntesis de proteínas.

40 Además, en los documentos de patente relativos a la acción de promoción de la producción de IGF-1, se han reportado gentiopicrina (documento 6 de patente), swertiamarina (documento 7 de patente), extracto de *Angelica keiskei* y/o luteolin-7-O-glucósido (documento 8 de patente), especies moleculares que incluyen la región Fc de inmunoglobulina G (documento 9 de patente), glucósido de esteroide derivado de arroz integral germinado (documento 5 de patente), ϵ -viniferina (documento 10 de patente), extracto de *Paeonia albiflora* (documento 11 de patente), etc.

Aunque se han reportado varias sustancias que tienen la acción promotora de producción de IGF-1 como se describió anteriormente, no se sabe que el extracto de *Citrus depressa*, o un polimetoxiflavonoide como la nobiletina y la tangeretina muestren la acción promotora de producción de IGF-1 .

45 Como materia prima de alimentos saludables derivados de plantas, el extracto de *Citrus depressa* llama la atención. Hasta la fecha se han encontrado diversas eficacias de polimetoxiflavonoides como la nobiletina y la tangeretina contenidas en el extracto de *Citrus depressa*. Por ejemplo, se informa que nobiletina tiene acciones tales como acciones antihipertensivas y anticancerígenas (documento 12 de patente), acciones de prevención y tratamiento de enfermedades cardíacas (documento 13 de patente) y acción antiulcerosa (documento 14 de patente). Además, se ha reportado que los polimetoxiflavonoides como la tangeretina y la nobiletina tienen una acción supresora de la neovascularización (documento 15 de patente). Además, se sabe que los flavonoides contenidos en especies de cítricos como *Citrus depressa* tienen una acción de supresión de la elevación de la presión arterial (documento 16 de patente).

55 Además, aunque se ha reportado que la nobiletina y la tangeretina tienen una acción de crecimiento de neuritas (documento 17 de patente), se sabe que no se requiere la síntesis de nueva proteína para el crecimiento de neuritas

(documento 6 que no es de patente). Además, aunque la posibilidad de tratamiento de trastornos funcionales del nervio periférico como la esclerosis lateral amiotrófica con ellos también se menciona en el documento 17 de patente, el objetivo de este tratamiento se limita a la mejora de una afección patológica causada por el crecimiento de neuritas, y el documento de patente no sugiere ni supresión de atrofia muscular ni síntesis de mioproteínas.

- 5 Como se describió anteriormente, se han reportado varios tipos de eficacia del extracto de *Citrus depressa*, o polimetoxiflavonoides tales como nobiletina y tangeretina, pero no se sabe que dicho extracto o sustancias tengan una acción promotora de producción de IGF-1 o una acción promotora de síntesis de proteínas.

Además, también se conoce un inhibidor del cambio de tipo de fibra muscular que usa un polifenol contenido en frutas de plantas de *Rosaceae*, tales como los manzanos, por ejemplo, procianidina, como ingrediente activo (documento 18 de patente). Sin embargo, el polifenol derivado del fruto como ingrediente activo de este inhibidor del cambio del tipo de fibra muscular se limita a los derivados de las frutas de las plantas de *Rosaceae*, pero los polifenoles derivados de las plantas de *Rosaceae* contienen polimetoxiflavonoides solo con un contenido bajo.

Tales polimetoxiflavonoides mencionados anteriormente están escasamente contenidos en el jugo del fruto, pero están contenidos principalmente en los pericarpios. Por lo tanto, solo exprimiendo las frutas, se obtienen estos polimetoxiflavonoides con un bajo contenido.

Los polimetoxiflavonoides constituyen una clase de flavonoides, tienen una estructura especial en la que se metilan una pluralidad de grupos hidroxilo fenólicos y están contenidos principalmente en especies de cítricos. También se ha reportado que los polimetoxiflavonoides como la nobiletina o la tangeretina se metabolizan en el hígado después de la ingestión. Por ejemplo, los grupos metoxi de nobiletina se convierten en grupos hidroxilo por metabolismo en el hígado de la rata, y los derivados de nobiletina que tienen 4'-OH, 7-OH, 6-OH, 3',4'-diOH, 6,7-diOH o similares se generan como metabolitos. Además, se ha reportado que, a partir de tangeretina, los derivados de tangeretina que tienen 4'-OH, 3',4'-diOH, 7,4'-diOH, 6,7-diOH o similares se generan como metabolitos (documento 7 que no es de patente).

El documento 19 de patente se refiere a un inhibidor de atrofia muscular que contiene un extracto de *Citrus depressa* como ingrediente activo.

El documento 20 de patente describe un método específico para producir una composición de nobiletina solubilizada.

El documento 21 de patente se refiere a un método para extender neuritas, que comprende administrar una composición a un sujeto, comprendiendo la composición un polialcoxiflavonoide específico y un vehículo o material alimenticio farmacéuticamente aceptable.

30 Referencias del estado de la técnica

Documentos de patente

- Documento 1 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2007-204379
- Documento 2 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2011-160757
- Documento 3 de patente: Patente japonesa No. 3946238
- 35 Documento 4 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2000-169374
- Documento 5 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2011-157345
- Documento 6 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2009-196989
- Documento 7 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2009-263262
- Documento 8 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2010-150177
- 40 Documento 9 de patente: Publicación internacional de patente WO2009/035055
- Documento 10 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2011-241162
- Documento 11 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2012-121856
- Documento 12 de patente: Publicación internacional de patente WO2006/49234
- Documento 13 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2011-37798
- 45 Documento 14 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 6-72870
- Documento 15 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2004-83417

Documento 16 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2001-240539

Documento 17 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2002-60340

Documento 18 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2006-328031

Documento 19 de patente: Solicitud de patente europea EP 2799083 A1

5 Documento 20 de patente: Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2008-074723

Documento 21 de patente: Solicitud de patente estadounidense US 2002/0040052 A1

Documentos que no son de patente

Documento 1 que no es de patente: Burnett, P.E. et al., PNAS, 95, 1432-1437 (1998)

Documento 2 que no es de patente: Isotani, S. et al., J. Biol. Chem., 274, 34493-34498 (1999)

10 Documento 3 que no es de patente: Gingras, A-C. et al., Genes & Dev., 15, 807-826 (2001)

Documento 4 que no es de patente: Fingar, D.C. y Blenis, J. Oncogene, 23, 3151-3171 (2004)

Documento 5 que no es de patente: Exp. Cell Res., 253 (1), 100-109 (1999)

Documento 6 que no es de patente: Partlow, L.M. y Larrabee, M.G., J. Neurochem., 18, 2101-2118 (1971)

Documento 7 que no es de patente: Koga, N. et al., Biol. Pharm. Bull., 30(12), 2317-2323 (2007)

15 Sumario de la invención

Objetivo a ser alcanzado por la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente promotor de la producción de IGF-1 que pueda tomarse de manera segura, y un alimento o bebida que lo comprenda.

Medios para lograr el objetivo

20 Los inventores de la presente invención llevaron a cabo diversas investigaciones para lograr el objetivo mencionado anteriormente. Como resultado, descubrieron que un extracto de *Citrus depressa* o un polimetoxiflavonoide como ingrediente del mismo tenía una acción superior de promoción de la producción de IGF-1, y lograron la presente invención.

25 La presente invención proporciona así un agente promotor de la producción de IGF-1 que comprende un polimetoxiflavonoide como ingrediente activo para su uso en el tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de hormona de crecimiento en adultos, enanismo por deficiencia de hormona de crecimiento, y alopecia.

De acuerdo con una realización preferida del agente promotor de la producción de IGF-1 de la presente invención, el polimetoxiflavonoide es nobiletina y/o tangeretina.

30 La presente invención también proporciona un agente promotor de la producción de IGF-1 que comprende un extracto de *Citrus depressa* que comprende 0,3% en masa o más de un polimetoxiflavonoide en términos de materia sólida como ingrediente activo para su uso en el tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de hormona de crecimiento en adultos, enanismo por deficiencia de hormona de crecimiento y alopecia.

35 De acuerdo con una realización preferida del agente promotor de la producción de IGF-1 de la presente invención, el agente promotor de la producción de IGF-1 comprende además un agente clatrante que hace que el polimetoxiflavonoide sea soluble en agua.

40 De acuerdo con una realización preferida del agente promotor de la producción de IGF-1 de la presente invención, el agente clatrante es la ciclodextrina, y su contenido es del 0,1 al 95% en masa basado en la masa total de la materia sólida del extracto de *Citrus depressa* y ciclodextrina.

De acuerdo con otra realización preferida del agente promotor de la producción de IGF-1 de la presente invención, el agente promotor de la producción de IGF-1 comprende un extracto de *Citrus depressa* que comprende 0,2% en masa o más de nobiletina, y/o 0,1% en masa o más de tangeretina en términos de materia sólida como ingrediente activo.

45 La presente invención también proporciona un agente promotor de la producción de IGF-1 que comprende un polimetoxiflavonoide como ingrediente activo para uso en el tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada

del grupo que consiste en deficiencia de hormona de crecimiento en adultos, enanismo por deficiencia de hormona de crecimiento, y alopecia, en donde el agente está en forma de un alimento o bebida que comprende el agente promotor de la producción de IGF-1 mencionado anteriormente en una cantidad de 0,3% en masa o más como contenido del polimetoxiflavonoide en términos de materia sólida.

5 La presente invención proporciona además un agente promotor de la producción de IGF-1 que comprende un polimetoxiflavonoide como ingrediente activo para uso en el tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de hormona de crecimiento en adultos, enanismo por deficiencia de hormona de crecimiento, y alopecia, en donde el agente está en forma de un alimento o bebida que comprende el agente promotor de la producción de IGF-1, y en donde el alimento o bebida comprende nobiletina en una cantidad de 0,2% en masa o más como contenido de nobiletina en términos de materia sólida.

10 La presente invención también proporciona un agente promotor de la producción de IGF-1 que comprende un polimetoxiflavonoide como ingrediente activo para uso en el tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de hormona de crecimiento en adultos, enanismo por deficiencia de hormona de crecimiento, y alopecia, en donde el agente está en forma de un alimento o bebida que comprende el agente promotor de la producción de IGF-1, y en donde el alimento o bebida comprende tangeretina en una cantidad de 0,1% en masa o más como contenido de tangeretina en términos de materia sólida.

15 La presente invención proporciona además un agente promotor de la producción de IGF-1 que comprende un polimetoxiflavonoide como ingrediente activo para usar en el tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de hormona de crecimiento en adultos, enanismo por deficiencia de hormona de crecimiento, y alopecia, en donde el agente está en forma de un alimento o bebida que comprende el agente promotor de la producción de IGF-1, y en donde el alimento o bebida comprende nobiletina y tangeretina en una cantidad tal que el contenido de nobiletina es de 0,2% en masa o más en términos de materia sólida, y el contenido de tangeretina es de 0,1% en masa o más en términos de materia sólida.

20 La presente invención también proporciona el uso de un agente promotor de la producción de IGF-1 que comprende un polimetoxiflavonoide como ingrediente activo para la mejora del rendimiento deportivo, la promoción del crecimiento, la promoción del fortalecimiento físico mediante fisiculturismo, la promoción del metabolismo o el fortalecimiento de músculos, con la condición de que los usos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia estén excluidos.

Modos para llevar a cabo la invención

25 A continuación, se explicarán en detalle las realizaciones preferidas de la presente invención. Sin embargo, la presente invención no se limita a las siguientes realizaciones preferidas, sino que puede modificarse libremente dentro del alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones.

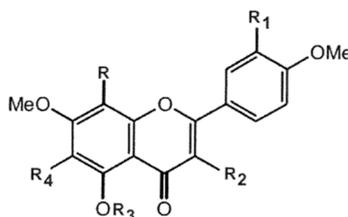
30 El agente promotor de la producción de IGF-1 de la presente invención comprende un polimetoxiflavonoide como ingrediente activo. En otra realización del agente promotor de producción de IGF-1 de la presente invención, el agente promotor de producción de IGF-1 comprende un extracto de *Citrus depressa*, especialmente un extracto de *Citrus depressa* que comprende 0,3% en masa o más de un polimetoxiflavonoide en términos de materia sólida, como ingrediente activo.

35 Los polimetoxiflavonoides comprendidos en *Citrus depressa* o un extracto de los mismos tienen principalmente una estructura representada por la siguiente fórmula, y ejemplos específicos incluyen nobiletina, tangeretina, nobiletina desmetilada en posición 5, nobiletina desmetoxilada en posición 8 (sinensetina), tangeretina desmetoxilada en posición 6, nobiletina desmetoxilada en posición 6, citromitina, 5,6,7,8,4-pentametoxiflavanona, etc. Entre estos, se prefieren nobiletina y tangeretina.

40 En la siguiente fórmula química, R, R₁, R₂, R₃ y R₄ son OMe, OMe, H, Me y OMe, respectivamente, en nobiletina, o OMe, H, H, Me y OMe, respectivamente, en tangeretina (Me representa un grupo metilo, OMe representa un grupo metoxi y H representa hidrógeno).

45 El polimetoxiflavonoide puede consistir en un solo tipo de polimetoxiflavonoide o una mezcla de dos o más tipos arbitrarios de polimetoxiflavonoides.

[Fórmula 1]



(En la fórmula, R, R₁, R₂ y R₄ representan independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo metoxi, y R₃ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo).

El polimetoxiflavonoide puede extraerse de un fruto, hoja, raíz, tallo, etc. de una especie de cítricos u otra planta que comprenda esa sustancia, o puede producirse por síntesis química.

- 5 El extracto de *Citrus depressa* se puede producir, por ejemplo, mediante extracción del fruto y/o la hoja de *Citrus depressa* con agua y/o un disolvente orgánico. El disolvente orgánico puede comprender agua. *Citrus depressa* (Shiikuwasha) es un tipo de especie de cítrico perteneciente a la familia *Rutaceae*.

10 El fruto y/o la hoja pueden ser el fruto y/o la hoja enteros, o pueden ser parte de los mismos. Por ejemplo, el fruto puede ser pulpa o pericarpio. Además, el fruto y/o la hoja pueden usarse tal cual, o pueden usarse después de la trituración, por ejemplo, como un producto finamente triturado del fruto y/o la hoja que tiene un tamaño de orden nanométrico. Además, el fruto y/o la hoja pueden ser un residuo de extracción de jugo de un fruto y/o una hoja, o una parte de la misma. De aquí en adelante, estos frutos y/u hojas, una parte de los mismos, el producto triturado de los mismos y el residuo de extracción de jugo de los mismos pueden denominarse como "fruto y/u hoja de *Citrus depressa*, etc."

15 Los ejemplos del disolvente orgánico incluyen alcoholes tales como metanol, etanol, propanol, isopropanol y butanol, ésteres tales como acetato de etilo, acetona, hexano, cloroformo, éter dietílico, acetonitrilo, estos disolventes orgánicos que comprenden agua, combinación de cualquiera de estos disolventes orgánicos y disolventes orgánicos que comprenden agua, etc., pero entre estos, se prefiere el etanol. Aunque el contenido de agua en el disolvente orgánico no está particularmente limitado, es preferiblemente del 0 al 90% en masa, y más preferiblemente del 0 al 40% en masa.

20 Aunque la cantidad del disolvente orgánico con respecto al fruto y/o la hoja de *Citrus depressa*, etc. utilizada en la extracción con el disolvente orgánico no está particularmente limitada, la relación (relación en peso) del fruto y/o la hoja de *Citrus depressa*, etc., con respecto al disolvente orgánico es preferiblemente 1:0,5 a 1:100, y más preferiblemente 1:1 a 1:20.

25 Aunque el método de extracción no está particularmente limitado, los ejemplos incluyen, por ejemplo, un método para añadir un disolvente orgánico al, fruto o la hoja de *Citrus depressa*, etc., realizar la extracción preferiblemente durante 5 minutos a 3 horas con agitación, y luego recoger la capa líquida mediante un medio de separación sólido/líquido tal como filtración o separación por centrifugación.

30 Además, después de la extracción o antes del proceso de secado, es preferible agregar un agente clatrante para hacer que el polimetoxiflavonoide sea soluble en agua. Si se usa dicho agente clatrante, pueden esperarse efectos de mejora en la solubilidad en agua, digestión y absorción, y el sabor del polimetoxiflavonoide. Como agente clatrante, es preferible usar un compuesto para el clatrato como la ciclodextrina. En el caso de la ciclodextrina, la cantidad del agente clatrante es preferiblemente del 0,1 al 95% en masa, y más preferiblemente del 1 al 90% en masa, basado en la masa total de la materia sólida del extracto de *Citrus depressa* y ciclodextrina.

35 El extracto de *Citrus depressa* de la presente invención también se puede producir por extracción supercrítica. Específicamente, puede producirse, por ejemplo, sometiendo fruto u hoja de *Citrus depressa* congelado y triturado, o fruto u hoja de *Citrus depressa* en polvo mediante liofilización o secado al aire caliente a extracción supercrítica realizada en las siguientes condiciones (a) a (d) .

(a) El disolvente de extracción es dióxido de carbono (dióxido de carbono gaseoso).

40 (b) La temperatura de extracción es de 31,1 a 120 °C, preferiblemente de 40 a 100 °C, y particularmente preferiblemente de 60 a 80 °C.

(c) La presión es de 7,38 a 60 MPa, preferiblemente de 20 a 40 MPa, y particularmente preferiblemente de 25 a 35 MPa.

(d) El tiempo de extracción es de 5 a 70 minutos, preferiblemente de 10 a 50 minutos, y particularmente preferiblemente de 20 a 30 minutos.

45 Como fluido de extracción, es posible usar propano supercrítico, etileno supercrítico, 1,1,1,2-tetrafluoroetano supercrítico, o similares, para mejorar la eficiencia de extracción del fruto y/u hoja de *Citrus depressa*, etc. Sin embargo, para aumentar la seguridad como alimento o bebida, es preferible usar dióxido de carbono (gas de dióxido de carbono). La temperatura de extracción puede elegirse apropiadamente para estar en el intervalo de temperatura de 31,1 a 120 °C, pero para mejorar la eficiencia de extracción y aumentar el contenido del polimetoxiflavonoide, especialmente nobiletina y/o tangeretina, está preferiblemente en el intervalo de 40 a 100 °C, y más preferiblemente en el intervalo de 60 a 80 °C. La presión está preferiblemente en el intervalo de 7,38 a 60 MPa, y más preferiblemente en el intervalo de 20 a 40 MPa. Además, en la presente invención, se puede usar etanol, agua o similares como un agente de arrastre, para mejorar la eficiencia de extracción.

Aunque el tiempo de extracción puede elegirse apropiadamente de acuerdo con la temperatura o presión, está, por

ejemplo, preferiblemente en el intervalo de 10 a 50 minutos, y más preferiblemente de 20 a 30 minutos.

La operación de extracción puede realizarse usando un aparato disponible comercialmente.

El extracto de *Citrus depressa* de la presente invención también se puede producir por extracción subcrítica. Específicamente, se puede producir sometiendo, por ejemplo, el fruto o la hoja de *Citrus depressa* congelado y triturado, o el fruto o la hoja de *Citrus depressa* en polvo mediante liofilización o secado al aire caliente a extracción subcrítica realizada en las siguientes condiciones (a) a (d).

(a) El disolvente de extracción es agua.

(b) La temperatura de extracción es de 140 a 374 °C, y preferiblemente de 140 a 180 °C.

(c) La presión es de 3 a 22 MPa, y preferiblemente de 3 a 10 MPa.

(d) El tiempo de extracción es de 0 a 10 minutos, y preferiblemente de 0 a 5 minutos.

El tiempo de extracción de 0 minutos significa que inmediatamente después de que la temperatura se eleva a la temperatura de extracción objetivo desde el inicio de la extracción, la temperatura se reduce enfriando hasta el nivel al inicio de la extracción.

Los ejemplos del fluido de extracción utilizado para la extracción subcrítica incluyen, por ejemplo, agua y dióxido de carbono. Sin embargo, para aumentar la seguridad como alimento o bebida, es preferible usar agua.

En el caso de usar agua como fluido de extracción, la temperatura de extracción puede elegirse apropiadamente para estar en el intervalo de temperatura de 140 a 374 °C, pero para mejorar la eficiencia de extracción y aumentar el contenido del polimetoxiflavonoide, especialmente nobiletina y/o tangeretina, preferiblemente está en el intervalo de 140 a 180 °C. La presión está preferiblemente en el intervalo de 3 a 10 MPa en el caso de usar agua como fluido de extracción.

Aunque el tiempo de extracción puede elegirse apropiadamente de acuerdo con la temperatura o la presión, preferiblemente está en el intervalo de 0 a 10 minutos, y más preferiblemente de 0 a 5 minutos.

La operación de extracción puede realizarse usando un aparato disponible comercialmente.

Los rendimientos de nobiletina y tangeretina en un extracto obtenido como se describió anteriormente por el método de extracción que usa agua, un disolvente orgánico o un disolvente orgánico que comprende agua, extracción supercrítica o extracción subcrítica son usualmente de aproximadamente 0,001 a 3% en masa, y aproximadamente 0,0001 a 2% en masa, respectivamente, con base en el peso del fruto y/o la hoja de *Citrus depressa* etc.

El extracto de *Citrus depressa* obtenido como se describió anteriormente comprende 0,1% en masa o más, preferiblemente 0,3% en masa o más, más preferiblemente 0,6% en masa o más, aún más preferiblemente 1% en masa o más, más preferiblemente 3% en masa o más, y particularmente preferiblemente 10% en masa o más, del polimetoxiflavonoide en términos de materia sólida. Además, dicho extracto de *Citrus depressa* comprende 0,07% en masa o más, preferiblemente 0,2% en masa o más, más preferiblemente 0,4% en masa o más, aún más preferiblemente 0,7% en masa o más, más preferiblemente 2% en masa o más, y particularmente preferiblemente 6% en masa o más, de nobiletina en términos de materia sólida, y/o 0,04% en masa o más, preferiblemente 0,1% en masa o más, más preferiblemente 0,2% en masa o más, aún más preferiblemente 0,4% en masa o más, más preferiblemente 1% en masa o más, y particularmente preferiblemente 3% en masa o más, de tangeretina en términos de materia sólida.

La frase "en términos de materia sólida" tiene el mismo significado que "como cantidad de materia sólida (contenido sólido)". Además, la expresión de que el agente, alimento o similar comprende X% o más del extracto de *Citrus depressa*, polimetoxiflavonoide, nobiletina o tangeretina "en términos de materia sólida" significa que la proporción de la cantidad de materia sólida del extracto de *Citrus depressa*, polimetoxiflavonoide, nobiletina o tangeretina con respecto a la cantidad de materia sólida del agente, alimento o similar es X%.

El extracto se puede usar como tal, o se puede usar después de la concentración, y el disolvente se puede eliminar parcial o completamente. La concentración o eliminación del disolvente se puede llevar a cabo mediante métodos tales como diversas técnicas de cromatografía, destilación, solidificación por secado y recristalización. Es preferible eliminar, en particular, los disolventes orgánicos deseablemente que no estén comprendidos en un medicamento o alimento o bebida, tal como metanol, propanol, butanol, acetato de etilo, acetona, hexano, cloroformo y éter dietílico. Además, para aumentar el contenido del polimetoxiflavonoide, especialmente nobiletina y/o tangeretina, el extracto puede fraccionarse. El contenido del polimetoxiflavonoide tal como nobiletina y/o tangeretina puede medirse por HPLC o similares.

Tal extracto de *Citrus depressa* o polimetoxiflavonoide tal como se describió anteriormente se puede usar tal cual como ingrediente activo del agente promotor de la producción de IGF-1 (en adelante también denominado "agente de la presente invención"), alimento, bebida o pienso. El extracto de *Citrus depressa* o polimetoxiflavonoide puede estar

en forma de solución, o también puede liofilizarse o secarse por pulverización de manera convencional, luego almacenarse y usarse como polvo.

5 El agente de la presente invención se puede usar como un fármaco o un ingrediente activo del mismo como una realización. Como agente de la presente invención, un extracto de *Citrus depressa* tal cual, o el polimetoxiflavonoide, o nobiletina y/o tangeretina, o una combinación de estos con un vehículo farmacéuticamente aceptable puede administrarse por vía oral a un mamífero, incluido el ser humano.

10 La forma de preparación del agente de la presente invención no está particularmente limitada, y los ejemplos incluyen tabletas (incluyendo tabletas recubiertas de azúcar, tabletas recubiertas entéricas y tabletas bucales), polvos, cápsulas (incluidas cápsulas entéricas y cápsulas blandas), gránulos (incluidos gránulos recubiertos), píldoras, grageas, agentes de liposomas encapsulados, soluciones, preparaciones de liberación sostenida farmacéuticamente aceptables de estos, etc. Cuando se elabora la preparación, se pueden usar aditivos comúnmente utilizados en fármacos orales habituales como ingredientes farmacéuticos, tales como vehículo, excipiente, aglutinante, agente desintegrante, lubricante, estabilizador, agente saborizante, diluyente, tensioactivo y disolvente.

15 Además, siempre que el efecto de la presente invención no se degrade, el extracto de *Citrus depressa* o el polimetoxiflavonoide puede usarse junto con un agente o composición farmacéutica que tenga una acción promotora de la producción de IGF-1 o una acción promotora de síntesis de proteínas, que ya se conoce o se encontrará en el futuro, o un agente o composición farmacéutica que tenga una acción de inhibición de la atrofia muscular, que ya se conoce o se encontrará en el futuro. La composición farmacéutica usada en conjunto puede estar comprendida en el agente de la presente invención como uno de los ingredientes activos, o puede no estar comprendida en el agente de la presente invención, sino combinada como un fármaco separado con el agente de la presente invención para formar un producto comercial.

20 Los ejemplos del vehículo y excipiente utilizados para la preparación mencionada incluyen lactosa, glucosa, sacarosa, manitol, almidón de patata, almidón de maíz, carbonato de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, celulosa cristalina, polvo de raíz de *Glycyrrhizae*, polvo de raíz de *Gentianae* etc., y ejemplos del aglutinante incluyen, por ejemplo, almidón, gelatina, jarabe, alcohol polivinílico, éter polivinílico, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etc.

25 Los ejemplos del agente desintegrante incluyen almidón, agar, gelatina en polvo, carboximetilcelulosa de sodio, carboximetilcelulosa de calcio, celulosa cristalina, carbonato de calcio, hidrogenocarbonato de sodio, arginato de sodio, etc.

30 Los ejemplos del lubricante incluyen estearato de magnesio, aceite vegetal hidrogenado, Macrogol, etc., y los ejemplos del colorante incluyen Rojo No. 2, Amarillo No. 4, Azul No. 1, que se pueden agregar a los medicamentos, etc.

35 Las tabletas y los gránulos pueden recubrirse con sacarosa, hidroxipropilcelulosa, goma laca purificada, gelatina, sorbitol, glicerol, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, metacrilato de metilo, polímero de ácido metacrílico, etc., según se requiera.

40 Un aspecto de la presente invención es un polimetoxiflavonoide o un extracto de *Citrus depressa* que comprende un polimetoxiflavonoide para usar como un fármaco para promover la producción de IGF-1 para el tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada de la deficiencia de la hormona del crecimiento en adultos, enanismo por deficiencia de la hormona de crecimiento y alopecia. En este aspecto, el extracto de *Citrus depressa* es un extracto de *Citrus depressa* que comprende 0,3% en masa o más del polimetoxiflavonoide.

45 La cantidad del polimetoxiflavonoide o extracto de *Citrus depressa* que comprende un polimetoxiflavonoide comprendido en el agente de la presente invención no está particularmente limitada, y puede elegirse apropiadamente. Sin embargo, cuando se usa un extracto de *Citrus depressa* que comprende un polimetoxiflavonoide, por ejemplo, la cantidad es preferiblemente 0,01% en masa o más, más preferiblemente 0,1% en masa o más, aún más preferiblemente 1% en masa o más, y particularmente preferiblemente 10% en masa o más, en términos de la cantidad de materia sólida comprendida en el extracto de *Citrus depressa*. Alternativamente, la cantidad del extracto de *Citrus depressa* comprendida en el agente de la presente invención es preferiblemente 0,1% en masa o más, más preferiblemente 0,3% en masa o más, aún más preferiblemente 0,6% en masa o más, más preferiblemente 1% en masa o más, aún más preferiblemente 3% en masa o más, y particularmente preferiblemente 10% en masa o más, como contenido del polimetoxiflavonoide en términos de materia sólida. Aunque el contenido máximo del extracto de *Citrus depressa* no está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 95% en masa o menos, 90% en masa o menos, o 50% en masa o menos, en términos de la cantidad de materia sólida en el extracto de *Citrus depressa*, o puede ser, por ejemplo, 95% en masa o menos, 80% en masa o menos, 60% en masa o menos, o 40% en masa o menos, en términos de la cantidad del polimetoxiflavonoide.

55 Además, cuando se usa el polimetoxiflavonoide, la cantidad del polimetoxiflavonoide comprendida en el agente es preferiblemente 0,001% en masa o más, más preferiblemente 0,01% en masa o más, aún más preferiblemente 0,1% en masa o más, más preferiblemente 0,3% en masa o más, aún más preferiblemente 0,6% en masa o más, aún más preferiblemente 1% en masa o más, aún más preferiblemente 3% en masa o más, y particularmente preferiblemente

10% en masa o más, en términos de materia sólida. Aunque el contenido máximo del polimetoxiflavonoide no está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 95% en masa o menos, 80% en masa o menos, 60% en masa o menos, 40% en masa o menos, o 30% en masa o menos.

5 Cuando se usa nobiletina como el polimetoxiflavonoide, la cantidad de nobiletina comprendida en el agente es preferiblemente 0,0007% en masa o más, más preferiblemente 0,07% en masa o más, aún más preferiblemente 0,2% en masa o más, más preferiblemente 0,4% en masa o más, aún más preferiblemente 2,0% en masa o más, y particularmente preferiblemente 5% en masa o más, en términos de materia sólida. Aunque el contenido máximo de nobiletina no está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 95% en masa o menos, 70% en masa o menos, 50% en masa o menos, 30% en masa o menos, o 10% en masa o menos.

10 Cuando se usa tangeretina como polimetoxiflavonoide, la cantidad de tangeretina comprendida en el agente es preferiblemente 0,0004% en masa o más, más preferiblemente 0,04% en masa o más, aún más preferiblemente 0,1% en masa o más, más preferiblemente 0,2% en masa o más, aún más preferiblemente 1% en masa o más, y particularmente preferiblemente 2% en masa o más, en términos de materia sólida. Aunque el contenido máximo de tangeretina no está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 95% en masa o menos, 70% en masa o menos, 50% en masa o menos, 30% en masa o menos, o 10% en masa o menos.

20 Cuando se usan dos o más tipos de polimetoxiflavonoides, tales como nobiletina, tangeretina y otros polimetoxiflavonoides, el contenido de los mismos en el agente puede elegirse apropiadamente para estar dentro de los intervalos mencionados anteriormente. Por ejemplo, cuando se usan tanto la nobiletina como la tangeretina como polimetoxiflavonoide, aunque es suficiente que la cantidad de al menos uno de ellos esté dentro de cualquiera de los intervalos mencionados anteriormente, se prefiere que las cantidades de ambos compuestos estén dentro de cualquiera de los intervalos mencionados anteriormente.

25 El agente de la presente invención tiene una acción promotora de producción de IGF-1. Se sabe que IGF-1 está involucrado en una amplia variedad de enfermedades y acciones que incluyen enfermedades del nervio central (demencia tal como la enfermedad de Alzheimer, etc.), enfermedades cardiovasculares (infarto de miocardio, infarto cerebral, hipertensión, etc.), trastornos metabólicos (obesidad, diabetes, hipercolesterolemia, etc.), trastornos del sistema digestivo y viscerales (úlceras, disminución de la función hepática, etc.), enfermedades que afectan la locomoción (artritis reumatoide, artritis, etc.), trastornos dermatológicos (envejecimiento de la piel, alopecia, etc.), acciones de activación de inmunidad (activación de células NK, etc.), etc. (Patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) No. 2011-157345).

30 La presente invención se refiere al agente promotor de la producción de IGF-1 para su uso en la mejora de la deficiencia de la hormona del crecimiento en adultos, enanismo por deficiencia de la hormona del crecimiento o alopecia.

35 Como se describe en este documento y no forma parte de la presente invención, el agente también se puede usar para mejorar las enfermedades del nervio central (demencia como la enfermedad de Alzheimer, etc.) (Cell Mol. Neurobiol., abril de 2010, 30 (3): 347-60; Brain Res., 15 de diciembre de 2009, 1303: 179-94), enfermedades cardiovasculares (infarto de miocardio, infarto cerebral, hipertensión, etc.) (Clin. Endocrinol. (Oxf), 2005, 63: 470-476; Circulation, 2004, 110: 2260-2265), trastornos metabólicos (obesidad, diabetes, hipercolesterolemia, etc.) (Brain Res., 15 de diciembre de 2009, 1303: 179-94), trastornos del sistema digestivo y viscerales (úlceras, disminución de la función hepática, etc.) (J. Surg. Res., 2008, 145: 279-286), enfermedades que afectan la locomoción (artritis reumatoide, artritis, sarcopenia, etc.) (Int. J. Biochem. Cell Biol., octubre de 2005, 37 (10): 1974-84), trastornos dermatológicos (envejecimiento de la piel, etc.) (Ann. Dermatol., febrero de 2012, 24 (1): 26-31), etc., así como la activación de la inmunidad (activación de células NK, etc.), etc.; por ejemplo, se puede contemplar el uso como aplicaciones, nuevamente dentro del alcance de la presente invención, para la reducción de grasa visceral, contra la senilidad, prevención y tratamiento de enfermedades, etc. con base en la elevación del nivel de IGF-1.

45 Además, el agente de la presente invención exhibe una acción promotora de síntesis de proteínas a través de la acción promotora de producción de IGF-1. En una realización preferida del agente promotor de la producción de IGF-1 de la presente invención, se usa para promover la síntesis de proteínas. Por lo tanto, en esta especificación, la "acción promotora de producción de IGF-1" y el "agente promotor de producción de IGF-1" pueden leerse como "acción promotora de síntesis de proteínas" y "agente promotor de síntesis de proteínas", respectivamente.

50 Debido a la acción promotora de la síntesis de proteínas del agente de la presente invención, se puede contemplar su uso para mejorar el rendimiento deportivo, la promoción del crecimiento, la promoción del fortalecimiento físico mediante el fisiculturismo, etc., la promoción del metabolismo, el fortalecimiento de músculos, recuperación de atrofia muscular, etc. Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de un agente promotor de la producción de IGF-1 que comprende un polimetoxiflavonoide como ingrediente activo para mejorar el rendimiento deportivo, promover el crecimiento, promover el fortalecimiento físico mediante el fisiculturismo, promover el metabolismo o fortalecer los músculos, con la condición de que se excluyan los usos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

En cuanto al agente promotor de la producción de IGF-1 de la presente invención, especialmente el agente promotor

de la producción de IGF-1 utilizado para promover la síntesis de proteínas, el uso como inhibidor de la atrofia muscular está excluido del uso del mismo. La atrofia muscular mencionada anteriormente se refiere a un estado en que la masa muscular disminuye debido a la disminución en el número de fibras musculares y la disminución en el volumen de las fibras musculares.

- 5 El tiempo para la administración del agente de la presente invención no está particularmente limitado, y puede elegirse apropiadamente de acuerdo con la forma de administración del objeto.

La dosis del agente de la presente invención se elige apropiadamente dependiendo de la edad, el sexo, la forma de administración del objeto, otras condiciones, etc. La dosis se elige preferiblemente para que esté en el intervalo de 0,01 a 500 (mg/kg/día), y más preferiblemente de 1 a 250 (mg/kg/día), como estándar en términos de la cantidad (mg) por 1 kg de peso corporal por día de la materia sólida comprendida en el extracto de *Citrus depressa*.

10 El agente puede administrarse a una dosis de preferiblemente 0,03 (mg/kg/día) o más, más preferiblemente 0,3 (mg/kg/día) o más, aún más preferiblemente 3 (mg/kg/día) o más, y particularmente preferiblemente 30 (mg/kg/día) o más, como estándar en términos de la cantidad (mg) por 1 kg de peso corporal por día del polimetoxiflavonoide comprendido en la materia sólida del extracto de *Citrus depressa*. En este caso, la dosis máxima es preferiblemente 150 (mg/kg/día) o menos, más preferiblemente 120 (mg/kg/día) o menos, aún más preferiblemente 90 (mg/kg/día) o menos, y particularmente preferiblemente 60 (mg/kg/día) o menos.

15 La dosis del agente de la presente invención en términos de la cantidad (mg) por 1 kg de peso corporal por día del polimetoxiflavonoide es preferiblemente (0,03 mg/kg/día) o más, más preferiblemente 0,3 (mg/kg/día) o más, todavía más preferiblemente 3 (mg/kg/día) o más, y particularmente preferiblemente 30 (mg/kg/día) o más, como estándar. La dosis máxima en este caso es preferiblemente 150 (mg/kg/día) o menos, más preferiblemente 120 (mg/kg/día) o menos, aún más preferiblemente 90 (mg/kg/día) o menos, y particularmente preferiblemente 60 (mg/kg/día) o menos.

20 La dosis en términos de la cantidad (mg) por 1 kg de peso corporal por día de nobiletina es preferiblemente de 0,02 (mg/kg/día) o más, más preferiblemente de 0,2 (mg/kg/día) o más, aún más preferiblemente 2 (mg/kg/día) o más, y particularmente preferiblemente 20 (mg/kg/día) o más, como estándar. La dosis máxima en este caso es preferiblemente 90 (mg/kg/día) o menos, más preferiblemente 72 (mg/kg/día) o menos, aún más preferiblemente 54 (mg/kg/día) o menos, y particularmente preferiblemente 36 (mg/kg/día) o menos.

25 La dosis en términos de la cantidad (mg) por 1 kg de peso corporal por día de tangeretina es preferiblemente 0,01 (mg/kg/día) o más, más preferiblemente 0,1 (mg/kg/día) o más, aún más preferiblemente 1 (mg/kg/día) o más, y particularmente preferiblemente 10 (mg/kg/día) o más, como estándar. La dosis máxima en este caso es preferiblemente 60 (mg/kg/día) o menos, más preferiblemente 48 (mg/kg/día) o menos, aún más preferiblemente 36 (mg/kg/día) o menos, y particularmente preferiblemente 24 (mg/kg/día) o menos.

Además, cuando el período de administración es largo, por ejemplo, de uno a varios meses o más, se puede esperar el efecto incluso con una dosis del agente de aproximadamente 1/10 a 1/100 de los intervalos mencionados anteriormente.

- 35 Independientemente del período de administración, la dosis diaria del agente se puede administrar una vez al día, o dos o más veces al día como porciones divididas.

El agente de la presente invención, o el extracto de *Citrus depressa* o polimetoxiflavonoide como ingrediente activo del agente, se puede agregar a las dietas (bebidas o alimentos).

40 Además, también es posible agregar el polimetoxiflavonoide, el extracto de *Citrus depressa* que comprende un polimetoxiflavonoide, o el agente de la presente invención a una bebida o pienso como ingrediente activo para producir una bebida o alimento que tenga una acción promotora de la producción de IGF-1 como una realización del agente promotor de la producción IGF-1.

45 Las formas y propiedades de los alimentos y bebidas no están particularmente limitadas siempre que el efecto del polimetoxiflavonoide o el extracto de *Citrus depressa* no se degrade, y se puedan ingerir por vía oral, y se puedan preparar utilizando las materias primas habituales utilizadas para alimentos y bebidas y métodos habituales, excepto que se agrega el polimetoxiflavonoide o el extracto de *Citrus depressa*.

50 Las formas de tales piensos como las mencionadas anteriormente no están particularmente limitadas, y pueden estar en forma de líquido, pasta, sólido gelificado, polvo o similares. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, tabletas de confitería y dietas líquidas, así como, por ejemplo, productos de harina como pan, macarrones, espagueti, fideos, mezcla para pasteles, polvo para freír y migas de pan; alimentos listos para comer, tal como fideos instantáneos, fideos de olla, alimentos de retorta y cocidos, enlatados cocinados, alimentos para calentar en microondas, sopa y estofado instantáneos, sopa de miso instantánea y sopa japonesa clara, sopa enlatada, alimentos liofilizados y otros alimentos listos para comer; productos agrícolas procesados tales como productos agrícolas enlatados, frutas enlatadas, mermeladas y confitura, encurtidos, frijoles cocidos, productos agrícolas secos y cereales (productos de granos procesados); productos marinos procesados tales como productos marinos enlatados, pescado, jamón y salchichas, productos marinos en pasta, golosinas marinas y tsukudani (productos marinos hervidos en soja); productos de

55

ganadería procesados, tales como productos de ganadería enlatados y pastas, y carne de ganado, jamón y salchichas; leches y productos lácteos tales como leche procesada, bebidas lácteas, yogures, bebidas de ácido láctico, queso, helados, leche en polvo modificada, cremas y otros productos lácteos; aceites y grasas tales como mantequilla, margarinas y aceites vegetales; condimentos básicos como salsa de soja, miso, salsas, condimentos de tomate procesados, mirín y vinagres; condimentos y alimentos complejos como mezclas para cocinar, curry en polvo o roux, salsas para untar, aderezos, sopas de fideos, especias y otros condimentos complejos; alimentos congelados tales como materiales alimenticios congelados, alimentos congelados semi-cocinados y alimentos congelados cocinados; confiterías tales como dulces de caramelo, dulces, gomas de mascar, chocolates, galletas, bizcochos, pasteles, tartas, bocadillos, galletas, dulces japoneses, confiterías de arroz, confiterías de frijol, pasteles de postre, jaleas y otras confiterías; bebidas tales como bebidas gaseosas, jugos de frutas naturales, jugos de frutas, refrescos de jugos de frutas, bebidas de pulpa de frutas, bebidas de frutas con pulpa de frutas, bebidas a base de vegetales, leche de soja, bebidas de leche de soja, bebidas de café, bebidas de té, bebidas en polvo, bebidas concentradas, bebidas deportivas, bebidas nutricionales, bebidas alcohólicas y otras bebidas; otros alimentos comerciales tales como alimentos para bebés, condimentos de arroz y condimentos de algas marinas para arroz hervido empapado en té; leche en polvo modificada para lactantes; nutrientes enterales; alimentos funcionales (alimentos para uso específico de salud, alimentos que reivindican una función nutricional), etc.

Además, al agregar el polimetoxiflavonoide o extracto de *Citrus depressa* que comprende un polimetoxiflavonoide, o el agente de la presente invención a un pienso como ingrediente activo, se puede preparar un pienso que tenga una acción promotora de la producción de IGF-1, como una realización del agente promotor de la producción de IGF-1.

La forma del pienso no está particularmente limitada. Por ejemplo, el pienso se puede preparar mezclando cereales como maíz, trigo, cebada, centeno y mijo; harinas de aceite vegetal tales como harina de aceite de soja, harina de aceite de colza, harina de aceite de coco y harina de aceite de linaza; salvados tales como salvado de trigo, salvado de arroz y salvado de arroz desgrasado; comidas elaboradas tales como harina de gluten de maíz y harina de mermelada de maíz; piensos derivados de animales o peces, como harina de pescado, leche descremada en polvo, suero, grasa amarilla y sebo; levaduras como la levadura torula y la levadura de cerveza; piensos de material mineral tales como fosfato de calcio tribásico y carbonato de calcio; aceites y grasas; aminoácidos monoméricos; sacáridos, etc. Los ejemplos de la forma del pienso incluyen, por ejemplo, alimento para mascotas, pienso para ganado, pienso para cría de peces, etc.

La cantidad del polimetoxiflavonoide o extracto de *Citrus depressa* comprendida en el alimento o bebida (incluido el pienso) de la presente invención no está particularmente limitada, y puede elegirse apropiadamente. Sin embargo, por ejemplo, cuando se usa un extracto de *Citrus depressa* que comprende un polimetoxiflavonoide, la cantidad del mismo es preferiblemente 1% en masa o más en términos de la cantidad de materia sólida comprendida en el extracto de *Citrus depressa*.

Como alternativa, la cantidad del extracto de *Citrus depressa* comprendida en el alimento o bebida es preferiblemente 0,3% en masa o más, más preferiblemente 0,6% en masa o más, aún más preferiblemente 3% en masa o más, y particularmente preferiblemente 10% en masa o más, en términos del contenido del polimetoxiflavonoide. Aunque el contenido máximo del extracto de *Citrus depressa* no está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 95% en masa o menos, 50% en masa o menos, 30% en masa o menos, 20% en masa o menos, o 10% en masa o menos, en términos de la cantidad de materia sólida en el extracto de *Citrus depressa*, o puede ser, por ejemplo, 95% en masa o menos, 70% en masa o menos, 60% en masa o menos, 50% en masa o menos, o 40% en masa o menos, en términos de la cantidad del polimetoxiflavonoide.

Además, cuando se usa el polimetoxiflavonoide, la cantidad del polimetoxiflavonoide comprendida en el alimento o bebida es preferiblemente 0,3% en masa o más, más preferiblemente 0,6% en masa o más, aún más preferiblemente 3,0% en masa o más, y particularmente preferiblemente 10% en masa o más, en términos de materia sólida. Aunque el contenido máximo del polimetoxiflavonoide no está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 95% en masa o menos, 70% en masa o menos, 60% en masa o menos, 50% en masa o menos, o 40% en masa o menos.

Cuando se usa nobiletina, la cantidad de nobiletina comprendida en el alimento o bebida es preferiblemente 0,2% en masa o más, más preferiblemente 0,4% en masa o más, aún más preferiblemente 2,0% en masa o más, y particularmente preferiblemente 5% en masa o más, en términos de materia sólida. Aunque el contenido máximo de nobiletina no está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 95% en masa o menos, 70% en masa o menos, 50% en masa o menos, 30% en masa o menos, o 10% en masa o menos.

Cuando se usa tangeretina, la cantidad de tangeretina comprendida en el alimento o bebida es preferiblemente 0,1% en masa o más, más preferiblemente 0,2% en masa o más, aún más preferiblemente 1,0% en masa o más, y particularmente preferiblemente 2% en masa o más, en términos de materia sólida. Aunque el contenido máximo de tangeretina no está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 95% en masa o menos, 70% en masa o menos, 50% en masa o menos, 30% en masa o menos, o 10% en masa o menos.

Si se ingieren ingredientes tales como proteína de leche (caseína), proteína de suero (suero), proteína de soja, péptidos de suero, aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina, isoleucina), HMB, glutamina, arginina, ornitina, citrulina, creatina, carnitina, ácidos nucleicos (ADN, ARN), vitamina B6, vitamina C, vitamina D, vitamina E, zinc,

magnesio, varios polimetoxiflavonoides y varios polifenoles junto con el alimento o bebida de la presente invención, se puede esperar que se obtenga un mayor efecto promotor de la producción de IGF-1. Estos ingredientes pueden agregarse al alimento o bebida de la presente invención.

5 Además, el alimento o bebida (incluido el pienso) de la presente invención comprende deseablemente 5 mg o más, preferiblemente 18 mg o más, y más preferiblemente 180 mg o más, del extracto de *Citrus depressa* en términos de materia sólida en una cantidad del mismo por ingestión única.

Además, el alimento o bebida (incluyendo el pienso) de la presente invención deseablemente comprende 1,8 mg o más, preferiblemente 18 mg o más, y más preferiblemente 180 mg o más, del polimetoxiflavonoide en términos de materia sólida en una cantidad del mismo por ingestión única.

10 Además, el alimento o bebida (incluido el pienso) de la presente invención deseablemente comprende 1,2 mg o más, preferiblemente 12 mg o más, y más preferiblemente 120 mg o más, de nobiletina en términos de materia sólida en una cantidad de los mismos para ingestión única.

15 Además, el alimento o bebida (incluido el pienso) de la presente invención deseablemente comprende 0,6 mg o más, preferiblemente 6 mg o más, y más preferiblemente 60 mg o más, de tangeretina en términos de materia sólida en una cantidad del mismo para ingestión única.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se explicará más específicamente con referencia a ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo 1

20 Se evaluó el efecto promotor de la producción de IGF-1 del extracto de *Citrus depressa* en ratones bajo condiciones de carga de ejercicio.

El extracto de *Citrus depressa* utilizado (producto comercial, ARKRAY) se obtuvo mediante la adición de ciclodextrina como agente clatrante a un extracto del residuo exprimido de frutos de *Citrus depressa* extraído con etanol que contiene agua, y que tenía la siguiente composición de acuerdo con la especificación habitual de los mismos.

25	Materia sólida	92% en masa o más
	Ciclodextrina	50% en masa
	Polimetoxiflavonoides	10% en masa o más

El contenido de nobiletina y el contenido de tangeretina del extracto de *Citrus depressa* (que comprende ciclodextrina) usados para el siguiente experimento fueron 6,9% en masa y 3,4% en masa, respectivamente.

30 Los ratones machos C57BL/6J (10 semanas de edad) se criaron preliminarmente durante una semana y se dividieron en tres grupos (grupo de control (Cont), grupo de ejercicio (Run) y grupo de ejercicio + administración de extracto de *Citrus depressa* (Run + SE), n = 8 para los grupos Cont y Run + SE, y n = 7 para el grupo Run).

35 Para los ratones de los grupos Run y Run + SE, se programó un período de aclimatación al ejercicio en cinta rodante de dos semanas (frecuencia, tres días/semana; la carga de ejercicio se incrementó gradualmente (gradiente, 5 a 20%; velocidad, 5 a 20 m/minuto; tiempo, 30 a 60 minutos/día)) y luego los ratones fueron sometidos a una carga de ejercicio durante 10 semanas (gradiente, 20%; 20 m/minuto; 60 minutos/día; 5 días/semana).

40 Al mismo tiempo, los ratones de los grupos Cont y Run se alimentaron con alimentación estándar AIN-93M (CLEA Japón), y los ratones del grupo Run + SE se alimentaron con AIN-93M que comprende el extracto de *Citrus depressa* en una proporción de 1% en masa durante 12 semanas, incluido el período de aclimatación al ejercicio (ingestión oral libre).

Doce semanas después del cambio del pienso, los ratones se diseccionaron y se recogieron los hígados y el suero. La expresión de ARNm de IGF-1 en el hígado y la concentración de IGF-1 en el suero se midieron por PCR en tiempo real y ELISA, respectivamente.

45 El tejido hepático recogido se sumergió en ARN más tarde (solución para estabilizar ARN en tejidos, Ambion), se dejó reposar durante la noche a 4 °C y luego se almacenó a -20 °C. El ARNm se extrajo del tejido hepático usando el Kit RNeasy (QIAGEN), y se transcribió de forma inversa usando Thermal Cycler Veriti (Applied Biosystems) y el Kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) para obtener ADNc. La expresión de ARNm de IGF-1 se midió mediante PCR en tiempo real realizada usando el ADNc obtenido anteriormente, los cebadores para amplificar ADNc de IGF-1 (ensayo ID Mm004395960_ml, Applied Biosystems), aparato de PCR en tiempo real (Sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast, Applied Biosystems) y ensayo de expresión génica TaqMan (Applied Biosystems).

50

La medición se realizó de acuerdo con los protocolos adjuntos a los kits y las condiciones generales establecidas en los aparatos. La cantidad de expresión génica se cuantificó y analizó como una cantidad relativa con base en la obtenida en el grupo Cont, que se tomó como 1. Las diferencias estadísticamente significativas se examinaron mediante procesamientos estadísticos basados en la prueba de Tukey o la prueba de Tukey-Kramer.

5 La concentración en suero de IGF-1 se midió usando el kit de ELISA de IGF-1 (RSD) de acuerdo con el protocolo adjunto al kit.

Los resultados que representan la variación de la expresión del ARNm de IGF-1 del hígado (AU) proporcionado por la administración del extracto de *Citrus depressa* en los ratones bajo la carga de ejercicio se muestran en la Tabla 1, y los resultados que representan la variación de la concentración en suero de IGF-1 proporcionada por la administración del extracto de *Citrus depressa* en los ratones bajo la carga de ejercicio se muestra en la Tabla 2.

10 En las tablas 1 y 2, Cont representa el grupo de control, Run representa el grupo de ejercicio y Run + SE representa el grupo de ejercicio + administración del extracto de *Citrus depressa*.

La expresión de ARNm de IGF-1 en el hígado fue de $1,00 \pm 0,27$ para el grupo Cont, pero fue de $1,23 \pm 0,30$ para el grupo Run, y $1,67 \pm 0,17$ para el grupo Run + SE. Por lo tanto, la cantidad aumentó a 135,7% en el grupo Run + SE en comparación con el grupo Run ($p < 0,05$, S.D. representa la desviación estándar). Con base en este resultado, se confirmó que la expresión del ARNm de IGF-1 se promueve en el hígado mediante la ingestión del extracto de *Citrus depressa* que comprende polimetoxiflavonoides.

[Tabla 1]

Tabla 1

Grupo	Expresión de ARNm IGF-1 en hígado (AU)	S.D.		
Cont	1,00	0,27		*1
Run	1,23	0,30	*1	
Run + SE	1,67	0,17	*1	*1

20 * 1: $p < 0,05$

Además, la concentración de IGF-1 en el suero fue de 101 ± 56 ng/mL para el grupo Cont, pero fue de 97 ± 38 ng/mL para el grupo Run y de 179 ± 40 ng/mL para el grupo Run + SE. Por lo tanto, la concentración de IGF-1 aumentó a 184% en el grupo Run + SE en comparación con el grupo Run ($p = 0,09$, S.E. representa el error estándar).

25 Como se describió anteriormente, se confirmó que la producción sistémica de IGF-1 se promueve mediante la ingestión del extracto de *Citrus depressa* que comprende polimetoxiflavonoides.

[Tabla 2]

Tabla 2

Grupo	Concentración de IGF-1 en suero (ng/mL)	S.E.	
Cont	101	56	
Run	97	38	†1
Run + SE	179	40	†1

† 1: $p = 0,09$

Ejemplo 2 (comparativo)

30 Los efectos promotores de la síntesis de proteínas de las ingestiones del extracto de *Citrus depressa*, polimetoxiflavonoide, nobiletina y tangeretina sobre la recuperación de la atrofia muscular se evaluaron en ratones en los que se indujo atrofia muscular mediante suspensión por la cola durante dos semanas.

El extracto de *Citrus depressa* usado para el siguiente experimento fue el mismo que el usado en el Ejemplo 1. Como el polimetoxiflavonoide, se usó una mezcla de 67% en masa de nobiletina y 33% en masa de tangeretina.

35 Los ratones machos C57BL/6J (10 semanas de edad) se criaron preliminarmente durante una semana, y se dividieron en seis grupos (grupo de control (Cont), administración de pienso estándar después del grupo de suspensión por la cola (Fix), administración de extracto de *Citrus depressa* después del grupo de suspensión por la cola (Fix + SE), administración de polimetoxiflavonoides después del grupo de suspensión por la cola (Fix + PMF), administración de nobiletina después del grupo de suspensión por la cola (Fix + NOB) y administración de tangeretina después del grupo de suspensión por la cola (Fix + TAN), $n = 8$ para los grupos Cont, Fix, Fix + SE, Fix + PMF, Fix + NOB y Fix + TAN).

Después de la cría preliminar, se indujo atrofia muscular en los ratones de los grupos Fix y Fix + SE mediante suspensión por la cola durante dos semanas. Durante este período, se permitió la ingestión oral libre del pienso estándar AIN-93M (CLEA Japón) para los ratones de los tres grupos.

5 Después del período de suspensión por la cola, se alimentó con AIN-93N a los ratones de los grupos Cont y Fix; se alimentó con AIN-93N, que comprende 1% en masa del extracto de *Citrus depressa*, a los ratones del grupo Fix + SE; se alimentó con AIN-93M que comprende 0,1% en masa del polimetoxiflavonoide (mezcla de 67% en masa de nobiletina y 33% en masa de tangeretina, nobiletina y tangeretina fueron producidos por Tokyo Chemical Industry), a los ratones del grupo Fix + PMF; se alimentó con AIN-93M que comprende el 0,07% en masa de nobiletina (Tokyo Chemical Industry) a los ratones del grupo Fix + NOB; y se alimentó con AIN-93M que comprende el 0,04% en masa de tangeretina (Tokyo Chemical Industry) a los ratones del grupo Fix + TAN, cada uno durante 3 días (ingestión oral libre).

En el día 4 después del cambio del pienso, los ratones se diseccionaron, y se evaluaron la concentración de IGF-1 en suero, la expresión de ARNm de folistatina en el gastrocnemio, la expresión de ARNm de IGF-1 en el gastrocnemio, y la relación de fosforilación ($\beta + \gamma$) de p70S6K1 en el gastrocnemio.

15 Se sabe que la folistatina se une a los miembros de la familia de TGF- β (TGF- β , activina, miostatina, etc.) para controlar o suprimir sus actividades. En particular, se ha reportado la acción citostática para el TGF- β , la acción de supresión de la secreción de la hormona del crecimiento para la activina y la acción sobre la diferenciación de las células madre en células grasas para miostatina, y se considera que, cuando la folistatina inhibe estas acciones, se promueve la síntesis de proteínas. Por lo tanto, la expresión de ARNm de folistatina sirve como un marcador de síntesis de proteínas.

Además, la relación de fosforilación de p70S6K1 también sirve como un marcador de síntesis de proteínas.

25 La concentración de IGF-1 en suero se midió de la misma manera que la utilizada en el Ejemplo 1. La expresión de ARNm de folistatina en el gastrocnemio se midió de la misma manera que la utilizada en el Ejemplo 1, excepto que se extrajo el gastrocnemio de la pata trasera de cada rata, y se usó el ensayo ID Mm00514982_ml (Applied Biosystems) como cebador. La fosforilación de p70S6K1 se midió mediante el método de quimioluminiscencia utilizando el sistema de análisis de transferencia Western ECL (GE Healthcare Life Science) para bandas obtenidas en SDS-PAGE, luego se transfirió a una membrana de PVDF y se unió a anticuerpos primarios (p70S6 quinasa α (C-18), SantaCruz Biotechnology) y anticuerpos secundarios (IgG anti-conejo de ECL).

Los resultados de las mediciones se muestran en las Tablas 3 a 6.

30 Los resultados presentados en la Tabla 3 muestran la variación de la concentración de IGF-1 en suero proporcionada por la administración del extracto de *Citrus depressa* en el momento de la recuperación de la atrofia muscular en ratones en los que la atrofia muscular fue inducida por la suspensión por la cola. En la tabla, Cont representa el grupo de control, Fix representa la administración de pienso estándar en el momento de la recuperación de la atrofia muscular después del grupo de suspensión por la cola, y Fix + SE representa la administración del extracto de *Citrus depressa* en el momento de la recuperación de la atrofia muscular después del grupo de suspensión por la cola.

40 Los resultados presentados en la Tabla 4 muestran la variación de la expresión de ARNm de folistatina proporcionada por la administración del polimetoxiflavonoide en el momento de la recuperación de la atrofia muscular en ratones en los que la atrofia muscular fue inducida por la suspensión por la cola. Cont representa el grupo de control, Fix representa la administración de pienso estándar en el momento de la recuperación de la atrofia muscular después del grupo de suspensión por la cola, y Fix + PMF representa la administración de polimetoxiflavonoide en el momento de la recuperación de la atrofia muscular después del grupo de suspensión por la cola.

45 Los resultados presentados en la Tabla 5 muestran la variación de la expresión de ARNm de IGF-1 en el gastrocnemio proporcionado por la administración de nobiletina en el momento de la recuperación de la atrofia muscular en ratones en los que la atrofia muscular fue inducida por la suspensión por la cola. Cont representa el grupo de control, Fix representa la administración de pienso estándar en el momento de la recuperación de la atrofia muscular después del grupo de suspensión por la cola, y Fix + NOB representa la administración de nobiletina en el momento de la recuperación de la atrofia muscular después del grupo de suspensión por la cola.

50 Los resultados presentados en la Tabla 6 muestran la variación de la relación de fosforilación de p70S6K1 en el gastrocnemio proporcionada por la administración de tangeretina en el momento de la recuperación de la atrofia muscular en ratones en los que la atrofia muscular fue inducida por la suspensión por la cola. Cont representa el grupo de control, Fix representa la administración de pienso estándar en el momento de la recuperación de la atrofia muscular después del grupo de suspensión por la cola, y Fix + TAN representa la administración de tangeretina en el momento de la recuperación de la atrofia muscular después del grupo de suspensión por la cola.

55 La concentración de IGF-1 en suero fue de 252 ± 78 ng/mL para el grupo Cont, pero fue de 294 ± 42 ng/mL para el grupo Fix y 325 ± 34 ng/mL para el grupo Fix + SE, y por lo tanto aumentó a 110,5% en el grupo Fix + SE en comparación con el grupo Fix (Tabla 3). Con base en este resultado, se confirmó que aunque se observó un aumento de la concentración de IGF-1 en el momento de la recuperación de la atrofia en comparación con el tiempo habitual,

la concentración de IGF-1 aumentó aún más por la ingestión del extracto de *Citrus depressa*. Dado que la ingestión se permitió solo durante 3 días en este experimento, no se observaron diferencias significativas entre el grupo Fix y el grupo Fix + SE. Sin embargo, se considera que la ingestión prolongada del extracto de *Citrus depressa* puede proporcionar una acción promotora de la producción de IGF-1 y una acción promotora de la síntesis de proteínas.

5 [Tabla 3]

Tabla 3

Grupo	Concentración de IGF-1 en suero (ng/mL)	S.D.
Cont	252	78
Fix	294	42
Fix + SE	325	34

* 2
* 2

* 2: p <0,05

10 El resultado de la medición de la expresión del ARNm de folistatina fue $1,00 \pm 0,27$ para el grupo Cont, pero fue $1,10 \pm 0,20$ para el grupo Fix y $1,30 \pm 0,21$ para el grupo Fix + PMF, y por lo tanto la expresión del ARNm de folistatina aumentó a 118% en el grupo Fix + PMF en comparación con el grupo Fix (Tabla 4). Con base en este resultado, se confirmó que, aunque se observó un aumento de la expresión del ARNm de folistatina en el momento de la recuperación de la atrofia en comparación con el tiempo habitual, la expresión del ARNm de folistatina aumentó aún más por la ingestión del polimetoxiflavonoide. Dado que la ingestión se permitió solo durante 3 días en este experimento, no se observaron diferencias significativas entre el grupo Fix y el grupo Fix + PMF. Sin embargo, se considera que la ingestión prolongada del polimetoxiflavonoide puede proporcionar acción promotora de expresión de ARNm de folistatina y acción promotora de síntesis de proteínas.

15

[Tabla 4]

Tabla 4

Grupo	Expresión de ARNm de folistatina (AU)	S.D.
Cont	1,00	0,27
Fix	1,10	0,20
Fix + PMF	1,30	0,21

*3
†2
*3 †2

* 3: p <0,05

† 2: p = 0,07

20 El resultado de la medición de la expresión de ARNm de IGF-1 en el gastrocnemio fue de $1,00 \pm 0,13$ para el grupo Cont, pero la expresión de ARNm de IGF-1 fue de $1,64 \pm 0,15$ para el grupo Fix y $1,75 \pm 0,40$ para el grupo Fix + NOB (Tabla 5) y, por lo tanto, la expresión de ARNm de IGF-1 aumentó al 107% en el grupo Fix + NOB en comparación con el grupo Fix. Con base en este resultado, se confirmó que, aunque se observó un aumento de la expresión del ARNm de IGF-1 en el momento de la recuperación de la atrofia en comparación con el tiempo habitual, la expresión de ARNm de IGF-1 aumentó aún más por la ingestión de nobiletina. Dado que la ingestión se permitió solo durante 3 días en este experimento, no se observaron diferencias significativas entre el grupo Fix y el grupo Fix + NOB. Sin embargo, se considera que la ingestión prolongada de nobiletina puede proporcionar acción promotora de producción de IGF-1 y acción promotora de síntesis de proteínas.

25

30 [Tabla 5]

Tabla 5

Grupo	Expresión de ARNm de IGF-1 en gastrocnemius (AU)	S.D.
Cont	1,00	0,13
Fix	1,64	0,15
Fix + NOB	1,75	0,40

*4 *5
*4 *5

* 4: p <0,01

* 5: p <0,01

35 El resultado de la medición de la relación de fosforilación de p70S6K1 en el gastrocnemio fue $26,4 \pm 4,8$ para el grupo Cont, pero fue $42,8 \pm 10,2$ para el grupo Fix y $47,8 \pm 11,8$ para el grupo Fix + TAN (Tabla 6), y por lo tanto, la relación de fosforilación de p70S6K1 aumentó a 112% en el grupo Fix + TAN en comparación con el grupo Fix. Con base en este resultado, se confirmó que aunque el aumento de la relación de fosforilación de p70S6K1 también se observó en

el momento de la recuperación de la atrofia en comparación con el tiempo habitual, la relación de fosforilación de p70S6K1 aumentó aún más por la ingestión de tangeretina. Dado que la ingestión se permitió solo durante 3 días en este experimento, no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, se considera que la ingestión prolongada de tangeretina puede proporcionar una acción promotora de la síntesis de proteínas.

5 [Tabla 6]

Tabla 6

Grupo	Relación de fosforilación de p70S6K1 en gastrocnemius ($\beta+\gamma$) (%)	S.D.		
Cont	26,4	4,8	*6	*7
Fix	42,8	10,2	*6	
Fix + TAN	47,8	11,8		*7

* 6: $p < 0,01$

* 7: $p < 0,01$

Ejemplo 3 (comparativo)

10 El efecto de la promoción de la síntesis de proteínas por la ingestión del extracto de *Citrus depressa* se evaluó en ratones en los que se indujo atrofia muscular por fijación con yeso durante dos semanas.

El extracto de *Citrus depressa* usado para el siguiente experimento fue el mismo que el usado en el Ejemplo 1.

15 Las ratas macho SD (18 meses) fueron criadas preliminarmente durante una semana, y se dividieron en tres grupos (grupo de control (Cont), grupo de fijación de la pata trasera + administración de pienso estándar (Fix), y grupo de fijación de la pata trasera + administración de extracto de *Citrus depressa* (Fix + SE), $n = 7$ para los grupos Cont y Fix, $n = 6$ para el grupo Fix + SE).

El pienso estándar AIN-93M (CLEA Japan) se administró a las ratas de los grupos Cont y Fix, y el AIN-93M que comprende 1% en masa del extracto de *Citrus depressa* se administró a las ratas del grupo Fix + SE durante 14 días (ingestión oral libre).

20 Después de alimentar durante 14 días, se permitió continuamente la ingestión de cada pienso, y se realizó la fijación mediante yeso para las ratas de los grupos Fix y Fix + SE durante siete días para inducir atrofia muscular.

El día 8 después del comienzo de la fijación por yeso, se diseccionaron las ratas, se extrajo el gastrocnemio de la pata trasera derecha y se midió la proporción de fosforilación de p70S6K1 de la misma manera que la utilizada en el Ejemplo 2.

25 Los resultados que muestran la variación de la relación de fosforilación de p70S6K1 proporcionada por la administración del extracto de *Citrus depressa* en las ratas en las que se indujo atrofia muscular por fijación de la pata trasera se muestran en la Tabla 7. En la tabla 7, Cont representa el grupo de control, Fix representa el grupo de fijación de la pata trasera + administración de pienso estándar, y Fix + SE representa el grupo de fijación de la pata trasera + administración de extracto de *Citrus depressa*.

30 La relación de fosforilación de p70S6K1 en el gastrocnemio fue de $26,3 \pm 1,9\%$ para el grupo Cont, pero fue $23,3 \pm 0,8\%$ para el grupo Fix y $29,0 \pm 2,5\%$ para el grupo Fix + SE, y por lo tanto aumentó a 124,4 % en el grupo Fix + SE en comparación con el grupo Fix ($p < 0,05$). Por lo tanto, se confirmó que el extracto de *Citrus depressa* tiene una acción promotora de la síntesis de proteínas también sobre la base de la relación de fosforilación de p70S6K1.

[Tabla 7]

35

Tabla 7

Grupo	Relación de fosforilación de p70S6K1 en gastrocnemius ($\beta+\gamma$) (%)	S.D.	
Cont	26,3	1,9	
Fix	23,3	0,8	*8
Fix + SE	29,0	2,5	*8

* 8: $p < 0,05$

Ejemplo 4: Gelatina

5 Todas las siguientes materias primas se disolvieron en agua, la solución se agitó, y luego se disolvió nobiletina clatrada con ciclodextrina en la solución. La solución se esterilizó de manera convencional y se llenó para preparar gelatina (100 g por pieza) que tenía la siguiente composición. El contenido de nobiletina en una pieza de la gelatina obtenida fue de 70 mg. Se obtuvieron resultados que sugieren que la ingestión a largo plazo de dos piezas por día de este alimento proporciona una acción promotora de la síntesis de proteínas con base en la acción promotora de la producción de IGF-1.

	Dextrina (Matsutani Chemical Industry)	25,0% en masa
	Proteína de suero (Morinaga Milk Industry)	12,5% en masa
10	Agente gelificante (San-Ei Gen F.F.I.)	0,3% en masa
	Ácido cítrico (San-Ei Gen F.F.I.)	0,2% en masa
	Ascorbato de sodio (DSM Nutrition)	0,1% en masa
	Nobiletina (Tokyo Chemical Industry)	0,07% en masa
	Ciclodextrina (San-Ei Gen F.F.I.)	0,07% en masa
15	Saborizante (San-Ei Gen F.F.I.)	0,02% en masa
	Vitamina D (San-Ei Gen F.F.I.)	5,0 x 10 ⁻⁷ % en masa
	Agua	61,74% en masa

Ejemplo 5: Bebida

20 Todas las siguientes materias primas se disolvieron en agua, la solución se agitó, y luego la tangeretina clatrada con ciclodextrina se disolvió en la solución. La solución se esterilizó de manera convencional y se llenó para preparar una bebida (350 mL por botella) que tenía la siguiente composición. El contenido de tangeretina en una botella de la bebida obtenida fue de 28 mg. Se obtuvieron resultados que sugieren que la ingestión a largo plazo de dos botellas por día de esta bebida proporciona una acción promotora de la síntesis de proteínas con base en la acción promotora de la producción de IGF-1.

25	Dextrina (Matsutani Chemical Industry)	7,0% en masa
	Hidrolizado de proteínas (Morinaga Milk Industry)	0,5% en masa
	Ácido cítrico (San-Ei Gen F.F.I.)	0,2% en masa
	Ascorbato de sodio (DSM Nutrition)	0,2% en masa
	Saborizante (San-Ei Gen F.F.I.)	0,02% en masa
30	Edulcorante (San-Ei Gen F.F.I.)	0,01% en masa
	Tangeretina (Tokyo Chemical Industry)	0,008% en masa
	Ciclodextrina (San-Ei Gen F.F.I.)	0,008% en masa
	Agua	92,054% en masa

Ejemplo 6: Confeitería en tabletas

35 Una mezcla que tenía la siguiente composición se confeccionó de una manera convencional para producir confitería en tabletas que tenían un peso de 250 mg por tableta. El contenido del extracto de *Citrus depressa* en 1 g de la confitería en tabletas obtenidos fue de 60 mg. Dado que el contenido de polimetoxiflavonoide en el extracto de *Citrus depressa* utilizado como materia prima era del 10% o superior, el contenido del polimetoxiflavonoide en 1 g de la confitería en tabletas era de aproximadamente 6 mg. Se obtuvieron resultados que sugieren que la ingestión a largo plazo de 16 tabletas por día de este alimento proporciona una acción promotora de la síntesis de proteínas con base en la acción promotora de la producción de IGF-1.

	Caramelo en polvo (Showa Sangyo)	86,0% en masa
	Extracto de <i>Citrus depressa</i> (Arkray)	6,0% en masa
	Ácido cítrico (San-Ei Gen F.F.I.)	4,0% en masa

Saborizante (San-Ei Gen F.F.I.)	2,0% en masa
Emulsionante (Kao)	2,0% en masa

Ejemplo 7: Tableta masticable

5 Las tabletas masticables que tienen la siguiente composición y un peso de 250 mg por tableta se produjeron de manera convencional. El contenido del extracto de *Citrus depressa* en 1 g de las tabletas masticables obtenidas fue de 200 mg. Dado que el contenido de polimetoxiflavonoide en el extracto de *Citrus depressa* utilizado como materia prima era del 10% o superior, el contenido del polimetoxiflavonoide en 1 g de las tabletas masticables era de aproximadamente 20 mg. Se obtuvieron resultados que sugieren que la ingestión a largo plazo de 4 tabletas por día de este alimento
10 proporciona una acción promotora de la síntesis de proteínas con base en la acción promotora de la producción de IGF-1.

Eritritol (Mitsubishi Chemical Foods)	68,0% en masa
Extracto de <i>Citrus depressa</i> (Arkray)	20,0% en masa
Ácido cítrico (San-Ei Gen F.F.I.)	7,0% en masa
Talco (San-Ei Gen F.F.I.)	3,0% en masa
15 Saborizante (San-Ei Gen F.F.I.)	2,0% en masa

Ejemplo 8: Nutriente enteral (dieta líquida concentrada)

La caseína y la dextrina apenas digerible se disolvieron en agua tibia, luego se mezclaron dextrina, mezcla mineral, mezcla de vitaminas y nobiletina clatrada con ciclodextrina con la solución, se añadieron un emulsionante y aceite de soja a la mezcla, y la mezcla se homogeneizó. La mezcla se esterilizó y se llenó de manera convencional para preparar
20 un nutriente enteral que tenía la siguiente composición. La mezcla mineral y la mezcla de vitaminas mencionadas a continuación se obtuvieron mezclando los ingredientes en las cantidades que se muestran en la Tabla 8. El contenido de nobiletina en 1000 mL del nutriente enteral obtenido fue de 46 mg. Se obtuvieron resultados que sugieren que la ingestión a largo plazo de 1000 mL por día de esta dieta proporciona una acción promotora de la síntesis de proteínas basada en la acción promotora de la producción de IGF-1.

25 Dextrina (Matsutani Chemical Industry)	15,0% en masa
Caseína sódica (Morinaga Milk Industry)	4,0% en masa
Aceite de soja (Taiyo Yushi)	3,0% en masa
Dextrina difícilmente digerible (Matsutani Chemical Industry)	1,0% en masa
Mezcla mineral	0,3% en masa
30 Emulsionante (San-Ei Gen F.F.I.)	0,05% en masa
Mezcla de vitaminas	0,02% en masa
Saborizante (San-Ei Gen F.F.I.)	0,01% en masa
Nobiletina (Tokyo Chemical Industry)	0,0046% en masa
Ciclodextrina (San-Ei Gen F.F.I.)	0,0046% en masa
35 Agua	76,6108% en masa

[Tabla 8]

Tabla 8

	(/ 1000 mL)
Mezcla de minerales	
Na	900 mg
K	1500 mg
Ca	750 mg
Mg	380 mg

Fe	11 mg
Mezcla de vitaminas	
β-caroteno	1800 µg
Vitamina D	5 µg
α-Tocoferol	12 mg
Vitamina B1	1,6 mg
Vitamina B2	1,8 mg
Vitamina B6	3 mg
Vitamina B12	3 µg
Vitamina C	100 mg

Ejemplo 9: Confeitería horneada

5 La confitería horneada que tiene la siguiente composición se produjo de manera convencional. El contenido de polimetoxiflavonoides en la confitería obtenida para una persona (50 g) fue de 55 mg. Se observó que la ingestión de este alimento resultó en un efecto promotor de la síntesis de proteínas. Se obtuvieron resultados que sugieren que la ingestión a largo plazo de este alimento en la cantidad para una persona por día proporciona una acción promotora de la síntesis de proteínas con base en la acción promotora de la producción de IGF-1.

	Azúcar granulada (Nissin Sugar Manufacturing)	30.0% en masa
	Harina de trigo (San-Ei Gen F.F.I., Inc.)	30.0% en masa
10	Mantequilla (Morinaga Milk Industry)	15,0% en masa
	Salsa de huevo entero (TAIYO KAGAKU)	10,0% en masa
	Péptido de suero (Morinaga Milk Industry)	9,0% en masa
	Caseína sódica (Tatua Japón)	4,5% en masa
	Extracto de <i>Citrus depressa</i> (Arkray)	1,1% en masa
15	Mezcla de vitaminas (Riken Vitamin)	0,2% en masa
	Gluconato de zinc (Oriental Yeast)	0,1% en masa
	Gluconato cúprico (Oriental Yeast)	0,09% en masa
	Saborizante (Nagaoka Perfumery)	0,01% en masa
	Vitamina D (Riken Vitamin)	5,0 x 10 ⁻⁶ % en masa
20	Aplicabilidad industrial	

25 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un agente promotor de la producción de IGF-1, como se define adicionalmente en las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere al agente promotor de la producción de IGF-1 para uso como fármaco en el tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de hormona de crecimiento en adultos, enanismo por deficiencia de hormona de crecimiento y alopecia. Además, ya que el agente promotor de la producción de IGF-1 de la presente invención usa los ingredientes comprendidos en *Citrus depressa* como ingrediente activo, es altamente seguro y puede usarse en forma de alimentos, bebidas, etc.

REIVINDICACIONES

1. Un agente promotor de la producción de IGF-1 que comprende un polimetoxiflavonoide como ingrediente activo para uso en el tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de hormona de crecimiento en adultos, enanismo por deficiencia de hormona de crecimiento y alopecia.
- 5 2. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polimetoxiflavonoide es nobiletina y/o tangeretina.
3. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el agente comprende un extracto de *Citrus depressa* que comprende 0.3% en masa o más de un polimetoxiflavonoide en términos de materia sólida como ingrediente activo.
- 10 4. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agente comprende además un agente clatrante que vuelve al polimetoxiflavonoide soluble en agua.
5. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el agente clatrante es ciclodextrina, y su contenido es de 0,1 a 95% en masa con base en la masa total de la materia sólida del extracto de *Citrus depressa* y ciclodextrina.
- 15 6. El agente para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el agente comprende un extracto de *Citrus depressa* que comprende 0,2% en masa o más de nobiletina, y/o 0,1% en masa o más de tangeretina en términos de materia sólida como ingrediente activo.
7. El agente para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente está en forma de un alimento o bebida que comprende el agente promotor de la producción de IGF-1 en una cantidad de 0,3% en masa o más como contenido del polimetoxiflavonoide en términos de materia sólida.
- 20 8. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 6, en el que el agente está en forma de un alimento o bebida y la cantidad de nobiletina comprendida en el alimento o bebida es 0,2% en masa o más en términos de materia sólida, y la cantidad de tangeretina comprendida en el alimento o bebida es 0,1% en masa o más en términos de materia sólida.
- 25 9. El agente para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente está en forma de un fármaco que comprende el agente promotor de la producción de IGF-1 en una cantidad de 0,3% en masa o más como contenido del polimetoxiflavonoide en términos de materia sólida.
10. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 6, en el que el agente está en forma de un fármaco y la cantidad de nobiletina comprendida en el fármaco es 0,2% en masa o más en términos de materia sólida, y la cantidad de tangeretina comprendida en el fármaco es de 0,1% en masa o más en términos de materia sólida.
- 30 11. Uso de un agente promotor de la producción de IGF-1 que comprende un polimetoxiflavonoide como ingrediente activo para mejorar el rendimiento deportivo, promover el crecimiento, promover el fortalecimiento físico mediante fisicoculturismo, promover el metabolismo o fortalecer los músculos, con la condición de que el uso para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia están excluidos.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el polimetoxiflavonoide es nobiletina y/o tangeretina.
- 35 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que el agente comprende un extracto de *Citrus depressa* que comprende 0,3% en masa o más de un polimetoxiflavonoide en términos de materia sólida como ingrediente activo.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el agente comprende además un agente clatrante que vuelve al polimetoxiflavonoide soluble en agua.
- 40 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el agente clatrante es ciclodextrina, y su contenido es de 0,1 a 95% en masa con base en la masa total de la materia sólida del extracto de *Citrus depressa* y ciclodextrina.
16. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el agente comprende un extracto de *Citrus depressa* que comprende 0,2% en masa o más de nobiletina, y/o 0,1% en masa o más de tangeretina en términos de materia sólida como ingrediente activo.
- 45 17. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en el que el agente está en forma de un alimento o bebida que comprende el agente promotor de la producción de IGF-1 en una cantidad de 0,3% en masa o más como contenido del polimetoxiflavonoide en términos de materia sólida.
- 50 18. El uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 16, en el que el agente está en forma de un alimento o bebida y la cantidad de nobiletina comprendida en el alimento o bebida es 0,2% en masa o más en términos de materia sólida, y la cantidad de tangeretina comprendida en el alimento o bebida es 0,1% en masa o más en términos de materia sólida.