

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 910 095**

51 Int. Cl.:

A23L 33/105 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2017** **PCT/JP2017/045207**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2019** **WO19116574**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2017** **E 17934367 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.01.2022** **EP 3607835**

54 Título: **Alimento dietético y cosmético antienvjecimiento y procedimiento para producir un componente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2022

73 Titular/es:

NAGAO, TSUKASA (100.0%)
141-1 Kamiteru-cho
Nagahama-shi Siga 526-0015, JP

72 Inventor/es:

NAGAO, TSUKASA

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 910 095 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

Alimento dietético y cosmético antienvjecimiento y procedimiento para producir un componente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva

[ANTECEDENTES DE LA INVENCÓN]

5 [CAMPO DE LA INVENCÓN]

La presente invención se refiere a un alimento dietético y cosmético antienvjecimiento, y a un procedimiento de fabricación de un ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva, en particular, a un alimento dietético y cosmético antienvjecimiento que tienen un mejor efecto antienvjecimiento que el resveratrol y a un procedimiento de fabricación de un ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva que tiene el mejor efecto antienvjecimiento.

[ANTECEDENTES]

Un estudio previo sobre la prevención del envejecimiento y el control de la vida ha revelado que se espera que un compuesto, por ejemplo, resveratrol (trans-3,4',5-trihidroxi-estilbeno), tenga un efecto antienvjecimiento.

15 Por ejemplo, Konrad T. Howitz *et al.*, Nature 425, y 191-196 (2003) informan de que en una levadura gemante (*Saccharomyces cerevisiae*), el resveratrol estimuló Sir2 de una enzima de *Caenorhabditis elegans*, lo que ajustó la esperanza de vida para mejorar la estabilidad del ADN de la levadura gemante, lo que prolongó, de este modo, la esperanza de vida de la levadura gemante en un 70 %.

20 Sin embargo, como se describe en Richard A. Miller *et al.*, Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES 191-201 (2010), se ha informado de que el resveratrol no prolonga la esperanza de vida de un ratón macho y hembra ni tiene ningún efecto antienvjecimiento.

25 El documento JP2014073988A describe una composición funcional que contiene extracto de pepitas de uva en polvo, teniendo dicha composición acción inhibidora del olor relacionado con el envejecimiento, acción contra el cáncer y acción de mejora de la función visual. Dicha composición también se puede usar para preparar un alimento dietético y un cosmético que contengan la composición. El documento JP2014073988A también describía un procedimiento de producción para obtener dichas composiciones.

Además, el documento JP2014073988A describió que el extracto de pepitas de uva en polvo extraído de pepitas de uva tratadas con agua tiene un efecto de incremento de la biogénesis mitocondrial, suprimiendo, de este modo, el olor relacionado con la edad. Sin embargo, el documento JP2014073988A no se pronuncia sobre cualquier efecto que el extracto de pepitas de uva en polvo pueda tener sobre el incremento de la cantidad de células apoptóticas y/o disminución de la cantidad de células necróticas. Asimismo, el documento JP2014073988A no mencionó, ni sugirió, ningún procedimiento para forzar la germinación.

35 Además, otras publicaciones, tales como el documento WO 2014/140312 A1, describieron composiciones orales para uso farmacéutico, nutricional o cosmético, que tienen actividad antioxidante frente a los radicales libres, así como el procedimiento para obtener dicha composición a partir de pepitas de *Vitis vinifera*, o extracto de pepitas y hojas que contiene una combinación de los flavonoides catequina que se usan en diferentes proporciones molares conjuntamente con b) un extracto de hoja de olivo, *Olea europaea L.*, que tiene un hidroxitirosol.

En consecuencia, aunque se espera que el resveratrol tenga un efecto antienvjecimiento, no se ha confirmado si el resveratrol realmente tiene el efecto antienvjecimiento.

[SUMARIO DE LA INVENCÓN]

40 Como se describe anteriormente, no se ha confirmado si el resveratrol, que se esperaba que tuviera un efecto antienvjecimiento, realmente tiene dicho efecto antienvjecimiento.

En consecuencia, existe una necesidad de obtener una sustancia que tenga un efecto antienvjecimiento más fiable y mejor que el resveratrol.

45 Después de una seria consideración, los autores de la invención descubrieron que un extracto que consistía en polifenol derivado de pepitas de uva tenía un mejor efecto antienvjecimiento que el resveratrol.

50 El problema que se ha de resolver por la presente invención es proporcionar un ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva que tenga un mejor efecto antienvjecimiento que el resveratrol que se esperaba que tuviera dicho efecto antienvjecimiento, y un procedimiento de fabricación de dicho ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva, y proporcionar un alimento dietético antienvjecimiento y cosmético antienvjecimiento que contengan el ingrediente antienvjecimiento.

[MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS]

La presente invención de acuerdo con un primer aspecto se refiere a un alimento dietético y cosmético antienvjecimiento, que comprenden un ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva que consiste en un 60 % en peso o más de polifenol derivado de pepitas de uva purificado en crudo.

- 5 La presente invención de acuerdo con un segundo aspecto se refiere a un procedimiento de fabricación de un ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva, que comprende:

(etapa 1) pretratar una o más pepitas de uva seleccionadas de un grupo que consiste en *Vitis vinifera L.*, *Vitis labrusca L.*, *Vitis coignetiae L.*, *Vitis amurensis L.* y *Vitis shiragai L.* para forzar la germinación de estas pepitas de uva y secar las pepitas de uva de germinación forzada a 35 °C - 60 °C;

- 10 (etapa 2) reducir a polvo las pepitas de uva secadas en la etapa 1;

(etapa 3) obtener una fracción extraída que contiene polifenol derivado de pepitas de uva sumergiendo las pepitas de uva en polvo obtenidas en la etapa 2 en agua, etanol o bien un disolvente mixto de agua y etanol; y

(etapa 4) secar y reducir a polvo la fracción extraída que contiene el polifenol derivado de pepitas de uva obtenido en la etapa 3.

- 15 La presente invención de acuerdo con un tercer aspecto se refiere al alimento dietético y cosmético antienvjecimiento del primer aspecto o al procedimiento del segundo aspecto, en el que la pepita de uva es una pepita de uno o más cultivares de uva de vinificación seleccionados de un grupo que consiste en: Agiorgitiko, Viognier, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Gamay, Carignan, Carmenere, Xinomavro, Grenache, Gewurztraminer, Kerner, Colombard, Koshu, Sultana, Sangiovese, Chardonnay, Chenin Blanc, Syrah, Zinfandel, Semillon, Sauvignon Blanc, Tannat, Zweigelt, Tempranillo, Trebbiano, Nebbiolo, Nero D'Avola, Barbera, Pinotage, Pinot Noir, Pinot Gris, Pinot Blanc, Petit Verdot, Black Queen, Muscat Bailey A, Malbec, Muller-Thurgau, Mourvedre, Meunier, Melon de Bourgogne, Merlot, Moscato, Yama-Sauvignon, Riesling y Ruby Cabernet.

[Efecto de la presente invención]

- 25 De acuerdo con la presente invención del primer aspecto, el alimento dietético y cosmético antienvjecimiento comprenden un ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva que consiste en un 60 % en peso o más de polifenol derivado de pepitas de uva purificado en crudo. Por tanto, se puede proporcionar un alimento dietético y cosmético antienvjecimiento que tengan un buen efecto antienvjecimiento.

- 30 De acuerdo con la presente invención del segundo aspecto, el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva se fabrica (etapa 1) al pretratar una o más pepitas de uva seleccionadas de un grupo que consiste en *Vitis vinifera L.*, *Vitis labrusca L.*, *Vitis coignetiae L.*, *Vitis amurensis L.* y *Vitis shiragai L.* para forzar la germinación de estas pepitas de uva y secar las pepitas de uva de germinación forzada a 35 °C - 60 °C;

(etapa 2) reducir a polvo las pepitas de uva secadas en la etapa 1;

(etapa 3) obtener una fracción extraída que contiene polifenol derivado de pepitas de uva sumergiendo las pepitas de uva en polvo obtenidas en la etapa 2 en agua, etanol o bien un disolvente mixto de agua y etanol; y

- 35 (etapa 4) secar y reducir a polvo la fracción extraída que contiene el polifenol derivado de pepitas de uva obtenido en la etapa 3. Por tanto, se puede fabricar un ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva que tenga un buen efecto antienvjecimiento.

- 40 De acuerdo con la presente invención del tercer aspecto, la pepita de uva usada para el alimento dietético y cosmético antienvjecimiento del primer aspecto o para el procedimiento del segundo aspecto es una pepita de uno o más cultivares de uva de vinificación seleccionados de un grupo que consiste en Agiorgitiko, Viognier, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Gamay, Carignan, Carmenere, Xinomavro, Grenache, Gewurztraminer, Kerner, Colombard, Koshu, Sultana, Sangiovese, Chardonnay, Chenin Blanc, Syrah, Zinfandel, Semillon, Sauvignon Blanc, Tannat, Zweigelt, Tempranillo, Trebbiano, Nebbiolo, Nero D'Avola, Barbera, Pinotage, Pinot Noir, Pinot Gris, Pinot Blanc, Petit Verdot, Black Queen, Muscat Bailey A, Malbec, Muller-Thurgau, Mourvedre, Meunier, Melon de Bourgogne, Merlot, Moscato, Yama-Sauvignon, Riesling y Ruby Cabernet. Por tanto, se puede fabricar un alimento dietético y cosmético antienvjecimiento que tengan un mejor efecto antienvjecimiento, o se puede fabricar un ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva que tenga un mejor efecto antienvjecimiento.

[BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS]

- 50 [Fig. 1] La fig. 1 es un gráfico que muestra la cantidad de células senescentes calculada en los ejemplos 1-3, ejemplo comparativo 1 y un control. (a) muestra la cantidad de células senescentes en células cultivadas durante 7 días, (b) muestra la cantidad de células senescentes en células cultivadas durante 14 días, y (c) muestra la cantidad de células senescentes en células cultivadas durante 21 días. Además, suponiendo que la cantidad de

células senescentes calculada en un control sea de un 100 %, las cantidades de células senescentes en los ejemplos 1-3 y ejemplo comparativo 1 se muestran en una proporción con respecto a la cantidad de células senescentes en el control.

[Fig. 2] La fig. 2 es un gráfico que muestra la cantidad de mitocondrias medida en los ejemplos 1-3, ejemplo comparativo 1 y un control. (a) muestra la cantidad de mitocondrias en células cultivadas durante 7 días, (b) muestra la cantidad de mitocondrias en células cultivadas durante 14 días y (c) muestra la cantidad de mitocondrias en células cultivadas durante 21 días. Además, suponiendo que la cantidad de mitocondrias calculada en un control sea de un 100 %, las cantidades de mitocondrias en los ejemplos 1-3 y ejemplo comparativo 1 se muestran en una proporción con respecto a la cantidad de mitocondrias en el control.

[Fig. 3] La fig. 3 es un gráfico que muestra la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias medida en los ejemplos 1-3, ejemplo comparativo 1 y un control. (a) muestra la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en células cultivadas durante 7 días, (b) muestra la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en células cultivadas durante 14 días, y (c) muestra la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en células cultivadas durante 21 días. Además, suponiendo que la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias calculada en un control sea de un 100 %, la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en los ejemplos 1-3 y ejemplo comparativo 1 se muestra en una proporción con respecto a la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en el control.

[Fig. 4] La fig. 4 es un gráfico que muestra la cantidad de células apoptóticas medida en los ejemplos 1-3, ejemplo comparativo 1 y un control. (a) muestra la cantidad de células apoptóticas en células cultivadas durante 7 días, (b) muestra la cantidad de células apoptóticas en células cultivadas durante 14 días y (c) muestra la cantidad de células apoptóticas en células cultivadas durante 21 días. Además, suponiendo que la cantidad de células apoptóticas calculada en un control sea de un 100 %, las cantidades de células apoptóticas en los ejemplos 1-3 y ejemplo comparativo 1 se muestran en una proporción con respecto a la cantidad de células apoptóticas en el control.

[Fig. 5] La fig. 5 es un gráfico que muestra la cantidad de células necróticas medida en los ejemplos 1-3, ejemplo comparativo 1 y un control. (a) muestra la cantidad de células necróticas en células cultivadas durante 7 días, (b) muestra la cantidad de células necróticas en células cultivadas durante 14 días, y (c) muestra la cantidad de células necróticas en células cultivadas durante 21 días. Además, suponiendo que la cantidad de células necróticas calculada en un control sea de un 100 %, las cantidades de células necróticas en los ejemplos 1-3 y ejemplo comparativo 1 se muestran en una proporción con respecto a la cantidad de células necróticas en el control.

[DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION]

A continuación, en el presente documento, se expondrá un alimento dietético y cosmético antienviejecimiento, y un procedimiento de fabricación de un ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención.

Además, en la presente memoria descriptiva, "envejecimiento" se refiere a un estado donde la capacidad de duplicación de una célula disminuye o un estado donde una célula deja de crecer de forma irreversible en la fase G1. La supresión de un gen que facilita la progresión del ciclo celular y la expresión incrementada de los genes p16^{INK4a} y p53 que inhiben el ciclo celular y su factor de transcripción dirigido, p21^{CIP1}, se implican en estos estados. Además, una célula senescente es resistente a la proliferación celular inducida por mitógenos y, por tanto, crece enormemente y se aplana. La célula senescente presenta un marcador bioquímico común, tal como una actividad de β -galactosidasa asociada con senescencia (SA β Gal). Aunque este fenómeno de envejecimiento se ha caracterizado por una célula cultivada, se ha demostrado que se produce incluso en un cuerpo vivo.

El alimento dietético y cosmético antienviejecimiento de acuerdo con la presente invención contienen un ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva que consiste en un 60 % en peso o más de polifenol derivado de pepitas de uva purificado en crudo.

El ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva que consiste en polifenol derivado de pepitas de uva contenido en el alimento dietético y cosmético antienviejecimiento de acuerdo con la presente invención se obtiene a partir de las siguientes etapas de fabricación.

<Etapa 1>

La etapa 1 es pretratar una pepita de uva para forzar la germinación y secar la pepita de uva de germinación forzada.

El tipo de uva para la pepita de uva usada en la presente invención es, pero sin limitarse a, por ejemplo, una o más uvas seleccionadas de un grupo que consiste en *Vitis vinifera* L., *Vitis labrusca* L., *Vitis coignetiae* L., *Vitis amurensis* L. y *Vitis shiragai* L.

Entre otras, la uva preferente es un cultivo de uva de vinificación, tal como Agiorgitiko, Viognier, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Gamay, Carignan, Carmenere, Xinomavro, Grenache, Gewurztraminer, Kerner, Colombard, Koshu, Sultana, Sangiovese, Chardonnay, Chenin Blanc, Syrah, Zinfandel, Semillon, Sauvignon Blanc, Tannat, Zweigelt, Tempranillo, Trebbiano, Nebbiolo, Nero D'Avola, Barbera, Pinotage, Pinot Noir, Pinot Gris, Pinot Blanc, Petit Verdot, Black Queen, Muscat Bailey A, Malbec, Muller-Thurgau, Mourvedre, Meunier, Melon de Bourgogne, Merlot, Moscato, Yama-Sauvignon, Riesling y Ruby Cabernet. En particular, Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah y Pinot Noir son más preferentes.

En la presente memoria descriptiva, "forzar la germinación" significa forzar una pepita de uva al estado en el que la pepita comienza a germinar. Más específicamente, significa el estado en el que la parte embrionaria de la pepita de uva se abombó e hinchó ligeramente.

El grado de abombamiento es, pero sin limitarse a, por ejemplo, el estado en el que la superficie de la parte embrionaria se abombó 1-2 mm más que la pepita de uva antes de forzar la germinación.

Además, en la presente invención, la pepita de uva en un estado de germinación en el que la pepita de uva forme una yema no es preferente porque tiene una baja tendencia a un efecto antienviejecimiento en comparación con la pepita de uva en un estado de germinación forzada.

En la presente invención, un procedimiento de pretratamiento de una pepita de uva para forzar la germinación de la pepita de uva incluye, pero sin limitarse a, cualquier procedimiento usado convencionalmente para forzar la germinación de semillas de plantas, por ejemplo, procedimientos físicos, tales como procesamiento a baja temperatura, procesamiento por baño caliente y destrucción mecánica, y procedimientos químicos, tales como procesamiento con gas (acetileno, éter, gas hidrógeno, etc.), procesamiento con auxina y procesamiento con giberelina.

Como se describe anteriormente, en la presente invención, el procedimiento de pretratamiento de una pepita de uva para forzar la germinación de la pepita de uva no está particularmente limitado. Por ejemplo, más específicamente, es posible forzar la germinación de la pepita de uva por el siguiente procedimiento de pretratamiento.

En primer lugar, se sumerge una pepita de uva en agua a 30-60 °C.

El tiempo de inmersión es preferentemente, pero sin limitarse a, de 20 a 80 horas.

En segundo lugar, la pepita de uva sumergida en agua a 30-60 °C se saca del agua y se seca al aire de forma natural. La temperatura de secado natural es preferentemente, pero sin limitarse a, de 10 a 50 °C. El tiempo de secado natural es preferentemente, pero sin limitarse a, de 1 a 10 horas.

A continuación, la pepita de uva secada al aire de forma natural se sumerge en agua a 15-45 °C.

El tiempo de inmersión es preferentemente, pero sin limitarse a, de 10 a 200 minutos.

En segundo lugar, la pepita de uva sumergida en agua a 15-45 °C se saca del agua y se seca al aire de forma natural.

La temperatura de secado natural es preferentemente, pero sin limitarse a, de 10 a 50 °C.

El tiempo de secado natural es preferentemente, pero sin limitarse a, de 3 a 12 horas.

La etapa de sumergir la pepita de uva en agua a 15-45 °C y la etapa de secar al aire de forma natural (es decir, sumergir de forma intermitente la pepita de uva en agua) se repiten hasta que la parte embrionaria de la pepita de uva se abombe e hinche ligeramente después del secado natural.

Cuando la parte embrionaria de la pepita de uva se abombó e hinchó ligeramente después del secado natural, la pepita de uva se saca y seca además durante de 2 a 5 días a la temperatura suficiente para esterilizar diversos gérmenes (80 °C o menos).

Este tiempo de secado se puede cambiar apropiadamente dependiendo de la estación, temperatura ambiente o humedad.

Esta estimulación del procesamiento por germinación forzada exfolia la molécula de fenol de una fina capa de fenol en la pepita de uva. A continuación, la molécula se une de forma múltiple para producir polifenol.

Aunque el resveratrol, un tipo de polifenol, tiene un peso molecular de aproximadamente 250, este ingrediente recién producido se caracteriza por una estructura de polímero grande que contiene el ingrediente con el peso molecular de 4000.

<Etapa 2>

La etapa 2 es reducir a polvo la pepita de uva en un estado de germinación forzada secada en la etapa 1.

El procedimiento de reducción a polvo puede utilizar, pero sin limitarse a, procedimientos estándar, tales como reducción a polvo con un molino.

5 <Etapa 3>

La etapa 3 es extraer la pepita de uva en polvo con un disolvente.

Por esta etapa 3 es posible obtener un ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva que consiste en polifenol derivado de pepitas de uva.

Como disolvente se puede usar agua, etanol o un disolvente mixto de agua y etanol.

10 La extracción se puede realizar añadiendo un disolvente de 50-1000 partes en peso a la pepita de uva en polvo de 100 partes en peso.

Como se describe anteriormente, el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva que consiste en polifenol derivado de pepitas de uva contiene un ingrediente polimérico con un peso molecular de aproximadamente 4000 (3500-4500).

15 <Etapa 4>

A continuación, se seca y proporciona el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva que consiste en polifenol derivado de pepitas de uva obtenido en la etapa 3.

Un procedimiento de secado usa preferentemente, pero sin limitarse a, secado por descompresión.

20 El procedimiento de reducción a polvo puede utilizar, pero sin limitarse a, procedimientos estándar, tales como reducción a polvo con un molino.

Las etapas anteriores pueden proporcionar un ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva que consista en polifenol derivado de una pepita de uva en polvo.

El ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva obtenido por las etapas anteriores contiene un 50-80 % en peso de polifenol purificado en crudo.

25 Desde el punto de vista de proporcionar un notable efecto antienviejecimiento, el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva contiene deseablemente un 60 % en peso o más de polifenol purificado en crudo.

El polifenol contenido en el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva es polifenol contenido en la pepita de cada cultivar de uva, por ejemplo, resveratrol, tanino o similares. Un 50-80 % en peso del polifenol contenido en el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva es polímero proantocianidina.

30 Los autores de la invención confirmaron que el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva que contiene el ingrediente anterior proporciona un efecto antienviejecimiento.

El término "purificado en crudo" en el presente documento significa un estado en el que un extracto solo se seca y reduce a polvo, las sustancias extrañas se retienen, y no se realiza su procesamiento, tal como concentración. El ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva obtenido en las etapas 1-4 se purifica en crudo.

35 Contener el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva en el alimento dietético puede proporcionar el alimento dietético antienviejecimiento de la presente invención.

Con el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva contenido en el alimento dietético es posible tomar el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva fácilmente y de forma rutinaria.

40 El alimento dietético antienviejecimiento de la presente invención se puede fabricar de la manera habitual añadiendo apropiadamente agentes aditivos usados como materia prima alimentaria común, por ejemplo, glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, esteviosido, rubusósido, jarabe de maíz, lactosa, ácido citrato, ácido tartárico, ácido málico, ácido succínico, ácido láctico, ácido L-ascórbico, DL-alfa-tocoferol, eritorbato de sodio, glicerina, propilenglicol, éster de ácido graso de glicerol, éster de ácido graso de poliglicerol, éster de ácido graso de sacarosa, éster de ácido graso de sorbitano, éster de ácido graso de propilenglicol, goma arábica, carragenina, caseína, gelatina, pectina, agar, vitamina B, amida de ácido nicotínico, pantotenato de calcio, aminoácido, sal de calcio, pigmento, agente saborizante y conservante.

45

Contener el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva en un cosmético puede proporcionar el cosmético antienviejecimiento de la presente invención.

Con el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva contenido en un cosmético, es posible aplicar el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de forma rutinaria.

5 La forma de un ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva contenido en el cosmético antienvjecimiento de acuerdo con la presente invención es preferentemente, pero sin limitarse a, una microcápsula que tiene una multicapa, desde el punto de vista de facilitar la penetración en la piel.

El cosmético antienvjecimiento de la presente invención se puede fabricar de la manera habitual añadiendo apropiadamente agentes aditivos usados comúnmente, tales como agente blanqueador, eliminador con oxígeno activo, antioxidante, inhibidor ultravioleta, etc.

10 La ingesta del ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva en el alimento dietético y cosmético antienvjecimiento de la presente invención es preferentemente, pero sin limitarse a, de al menos 50 mg o más de ingesta por día, desde el punto de vista de proporcionar un notable efecto antienvjecimiento.

Si la ingesta del ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva en el alimento dietético y cosmético antienvjecimiento de la presente invención es menor de 50 mg por día, el efecto antienvjecimiento no se puede ejercer lo suficiente y, por tanto, la ingesta no es deseable.

15 Además, incluso si la ingesta del ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva en el alimento dietético y cosmético antienvjecimiento de la presente invención es mayor de 7500 mg por día (por peso corporal de 60 kg), la tasa de incremento del efecto es pequeña.

Por lo tanto, la ingesta del ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva en el alimento dietético y cosmético antienvjecimiento de la presente invención es preferentemente de 50-7500 mg por día.

20 Dependiendo de la aplicación, se puede añadir adecuadamente un excipiente, un ajustador de pH, un conservante, un agente quelante, un estabilizador o similares al alimento dietético y cosmético antienvjecimiento de la presente invención.

25 Además, la ingesta del ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva contenido en el alimento dietético y cosmético antienvjecimiento de la presente invención es preferentemente, pero sin limitarse a, por ejemplo, de 0,8-125 mg/kg/día, desde el punto de vista de proporcionar un notable efecto antienvjecimiento.

Si la ingesta del ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva en el alimento dietético y cosmético antienvjecimiento de la presente invención es menor de 0,8 mg/kg/día por día, el efecto antienvjecimiento no se puede ejercer lo suficiente y, por tanto, la ingesta no es deseable.

30 Además, incluso si la ingesta del ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva en el alimento dietético y cosmético antienvjecimiento de la presente invención es mayor de 125 mg/kg/día, no se puede ejercer un efecto adicional.

Por lo tanto, la ingesta del ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva en el alimento dietético y cosmético antienvjecimiento de la presente invención es preferentemente de 0,8-125 mg/kg/día.

[EJEMPLO]

35 El alimento dietético y cosmético antienvjecimiento, y el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención se describen en detalle en base a los siguientes ejemplos, pero un procedimiento de fabricación del alimento dietético y cosmético antienvjecimiento, y del ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención no está limitado a los ejemplos.

40 <Ejemplo 1: fabricación de un ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva>

Se sumergió una pepita de Cabernet Sauvignon en agua a aproximadamente 40 °C durante de 45 a 60 horas, a continuación, esta pepita de uva se sacó del agua y se secó al aire de forma natural a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante de 3 a 5 horas (almacenada en una habitación).

45 La pepita de uva secada de forma natural se sumergió en agua a 25-30 °C durante de 60 a 80 minutos, a continuación, esta pepita de uva se sacó del agua y se secó al aire de forma natural a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 3 horas (almacenada en una habitación).

50 La inmersión en agua a 30 °C y el secado natural durante 3 horas se repitieron 3 veces, a continuación, se observó la pepita de uva secada. Se confirmó que aproximadamente un 5-15 % de la porción embrionaria de la pepita de uva se abombó aproximadamente 1 mm. Los procedimientos mencionados anteriormente se denominan procesamiento por germinación forzada.

El procedimiento de germinación forzada se finalizó cuando se confirmó el abombamiento de la parte embrionaria de la pepita de uva, y la pepita de uva se secó además a 45 °C durante 3 días con un secador de radiación en el infrarrojo lejano.

5 Después de secar la pepita de uva durante 3 días, la pepita se redujo a polvo con un molino para producir una pepita de uva en polvo.

Posteriormente, la pepita de uva en polvo de 50 partes en peso se añadió a agua de 100 partes en peso, y la fracción disuelta en agua se extrajo para proporcionar un ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva.

10 Después del secado por descompresión del ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva obtenido, se redujo a polvo con un molino para proporcionar un ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva en polvo.

Se cuantificó la cantidad total de polifenol contenido en el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva en polvo.

15 La cuantificación se realizó usando el procedimiento oficial de AOAC International (procedimiento oficial de AOAC 952.03, 15.^a ed) (también denominado procedimiento de Folin-Denis).

El procedimiento de Folin-Denis cuantifica la cantidad total de polifenol midiendo el color azul (longitud de onda de 700-770 nm) con un espectrofotómetro, en el que el color azul se obtiene reduciendo ácido fosfotúngstico y ácido molíbdico con hidroxilo fenólico en condiciones alcalinas.

20 Como resultado de la cuantificación, se descubrió que el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva contiene un 69 % en peso de polifenol.

Además, se confirmó que un 71 % en peso del polifenol contenido en el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva (es decir, un 49 % en peso del ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva) era un polímero proantocianidina.

25 A continuación, en el presente documento, el ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva preparado de acuerdo con este ejemplo se denomina ejemplo, y el resveratrol (fabricado por SIGMA, producto n.º: R5010) usado como objetivo de comparación se denomina ejemplo comparativo.

En los siguientes ejemplos 3-5, se examinó el efecto antienviejecimiento del ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención.

<Ejemplo 2: preparación de fibroblastos humanos normales, ejemplo y ejemplo comparativo>

30 • Preparación de fibroblastos humanos normales

En primer lugar, se prepararon fibroblastos humanos normales para cada prueba.

Posteriormente a la iniciación, se cultivaron fibroblastos humanos normales (KURABO INDUSTRIES LTD., producto n.º: KF-4109) en un medio base (DMEM (Nacalai Tesque, Inc., producto n.º: 08456-65)), FBS al 10 % (BioWest, producto n.º: S1820, lote n.º 516536), y antibiótico al 1 % (solución mixta de penicilina-estreptomina (Nacalai Tesque, Inc., producto n.º: 26253-84)) en una estufa de incubación con CO₂ (un 5 % de CO₂, 37 °C) hasta obtener un número requerido de células.

Después del cultivo, los fibroblastos humanos normales se liberaron por tripsina/EDTA (solución de 2,5 g/1-tripsina/1 mmol/1-EDTA (Nacalai Tesque, Inc., producto n.º: 32777-44), y se usaron para cada prueba después de calcular el número de células.

40 • Preparación de ejemplo y ejemplo comparativo

A continuación, se prepararon el ejemplo y ejemplo comparativo.

El ejemplo y ejemplo comparativo se midieron respectivamente y se separaron en un medio base para convertirse en una concentración de un 1 % (p/v).

Después de la separación, el ejemplo y ejemplo comparativo separados en un medio base se centrifugaron respectivamente (120.000 rpm (2000 s⁻¹), 10 minutos) para eliminar los materiales insolubles.

Después de la separación centrífuga, el sobrenadante se recogió, filtró y esterilizó a través de un filtro esterilizador que se va a usar para cada prueba.

<Ejemplo 3: prueba para confirmar el efecto antienviejecimiento>

El efecto antienviejecimiento del ejemplo y ejemplo comparativo se sometió a prueba midiendo una actividad de β -galactosidasa (β -galactosidasa asociada con senescencia; SA- β -gal) usada, en general, como marcador de envejecimiento celular.

- 5 Se confirmó la sobreexpresión de SA- β -gal en células senescentes. Se ha confirmado que no solo se produce un proceso de envejecimiento de las células medido por el marcador de envejecimiento en células cultivadas, sino también en un organismo.

La cantidad de células senescentes reconocidas por la prueba para confirmar el efecto antienviejecimiento indica más específicamente el efecto antienviejecimiento, como un parámetro exhaustivo.

10 (Procedimiento de prueba)

Se sembraron fibroblastos humanos normales preparados con un medio base en una placa de 96 pocillos para obtener 1×10^4 células/0,1 ml/pocillo (placa negra para observación de fluorescencia (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., producto n.º: MS-8096F)) y se cultivaron durante 24 horas.

- 15 Después del cultivo, los sobrenadantes de cultivo se reemplazaron respectivamente con los medios a continuación con diferentes condiciones, y los fibroblastos humanos normales se cultivaron de nuevo.

Las condiciones para cada medio son como sigue. Cada célula cultivada con medios con cada condición se denomina ejemplos 1-3, ejemplo comparativo 1 y control respectivamente.

Ejemplo 1: un medio base que comprende un 0,002 % en peso de ingredientes antienviejecimiento derivados de pepitas de uva de la presente invención.

- 20 Ejemplo 2: un medio base que comprende un 0,01 % en peso de ingredientes antienviejecimiento derivados de pepitas de uva de la presente invención.

Ejemplo 3: un medio base que comprende un 0,05 % en peso de ingredientes antienviejecimiento derivados de pepitas de uva de la presente invención.

- 25 Ejemplo comparativo 1: un medio base que contiene un 0,0023 % en peso de resveratrol. Control: un medio base (que no comprende ningún ingrediente antienviejecimiento derivado de pepitas de uva de la presente invención ni resveratrol).

A continuación, en el presente documento, los ejemplos 1-3, ejemplo comparativo 1 y control mencionados anteriormente también se usaron en los ejemplos 4-5.

- 30 La concentración de resveratrol en el ejemplo comparativo 1 se estableció para que fuera de un 0,0023 % en peso, porque las células necróticas se incrementan demasiado, de modo que sería difícil una medición correcta en una prueba de medición de necrosis mencionada a continuación si la concentración de resveratrol se estableciera para que fuera de más de un 0,0023 % en peso.

Se cultivaron fibroblastos humanos normales respectivamente con las condiciones durante hasta 21 días.

Los medios se intercambiaron cada de 2 a 3 días.

- 35 Después del cultivo, se eliminaron los sobrenadantes de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., producto n.º: 05913).

A los fibroblastos humanos normales lavados se les añadió un medio base que contenía bafilomicina diluida 1000 veces, y los fibroblastos humanos normales se cultivaron a 37 °C durante 60 minutos.

- 40 A continuación, a la solución de cultivo se le añadió un medio base que comprendía una solución de trabajo SPiDER- β Gal diluida 1000 veces y una solución de Hoechst 33342 diluida 100 veces (DOJINDO LABORATORIES, producto n.º: 346-07951) como reactivo de tinción de núcleos, y se cultivaron además los fibroblastos humanos normales a 37 °C durante 30 minutos.

Después del cultivo, los fibroblastos humanos normales se lavaron en un medio base.

- 45 Después del lavado, el medio base se añadió a fibroblastos humanos normales y se tomaron tinciones de núcleos (células vivas) e imágenes teñidas de las células senescentes por un microscopio de fluorescencia (Keyence Corporation, producto n.º: BZ-X7000).

La cantidad de células senescentes se calculó en base a las imágenes fluorescentes respectivas.

La bafilomicina A1 y la solución de trabajo SPiDER-β Gal procedían del Cellular Senescence Detection Kit-SPiDER-βGal (DOJINDO LABORATORIES, producto n.º: SG03).

(Resultados)

5 La fig. 1 muestra un gráfico que indica la cantidad de células senescentes calculada para los ejemplos 1-3, ejemplo comparativo 1 y control.

En la fig. 1, (a) muestra la cantidad de células senescentes entre las células cultivadas durante 7 días, (b) muestra la cantidad de células senescentes entre las células cultivadas durante 14 días, y (c) muestra la cantidad de células senescentes entre células cultivadas durante 21 días.

10 En la fig. 1, suponiendo que la cantidad de células senescentes en un control sea de un 100 %, las cantidades de células senescentes en los ejemplos 1-3 y ejemplo comparativo 1 se muestran en una proporción con respecto a la cantidad de células senescentes en el control.

La cantidad de células senescentes en el ejemplo comparativo 1 cultivadas durante 7 días fue de un 519 % en relación con el control (véase la fig. 1(a)).

15 La cantidad de células senescentes en el ejemplo 1 cultivadas durante 7 días fue de un 85 %, la cantidad de células senescentes en el ejemplo 2 fue de un 137 % y la cantidad de células senescentes en el ejemplo 3 fue de un 73 %, en relación con el control (véase la fig. 1(a)).

La cantidad de células senescentes en el ejemplo comparativo 1 cultivadas durante 14 días fue de un 102 % en relación con el control (véase la fig. 1(b)).

20 La cantidad de células senescentes en el ejemplo 1 cultivadas durante 14 días fue de un 11 %, la cantidad de células senescentes en el ejemplo 2 fue de un 9 % y la cantidad de células senescentes en el ejemplo 3 fue de un 7 %, en relación con el control (véase la fig. 1(b)).

La cantidad de células senescentes en el ejemplo comparativo 1 cultivadas durante 21 días fue de un 64 % en relación con el control (véase la fig. 1(c)).

25 La cantidad de células senescentes en el ejemplo 1 cultivadas durante 21 días fue de un 4 %, la cantidad de células senescentes en el ejemplo 2 fue de un 3 % y la cantidad de células senescentes en el ejemplo 3 fue de un 2 %, en relación con el control (véase la fig. 1(c)).

De acuerdo con estos resultados, resultó que el resveratrol tenía más células senescentes entre las células cultivadas durante 7 días que el control y promovió el envejecimiento de las células. Por lo tanto, se considera que el resveratrol tiene un efecto de promoción del envejecimiento a corto plazo.

30 Además, resultó que la cantidad de células senescentes en las células del día 21 de cultivo se suprimió alrededor de un 64 % en relación con el control, suprimiendo, por tanto, el envejecimiento de las células.

35 Aunque los ingredientes antienvjecimiento derivados de pepitas de uva de la presente invención representaron casi la misma cantidad de células senescentes que el control en células cultivadas durante 7 días en promedio, suprimió la cantidad de células senescentes en las células del día 21 de cultivo aproximadamente de un 2 % a un 4 % en relación con el control, suprimiendo, por tanto, el envejecimiento de las células mucho más que el resveratrol.

Por lo tanto, los ingredientes antienvjecimiento derivados de pepitas de uva tienen un mejor efecto antienvjecimiento que el resveratrol, y el alimento dietético y cosmético antienvjecimiento que comprenden estos ingredientes antienvjecimiento derivados de pepitas de uva también tienen un notable efecto antienvjecimiento.

40 <Ejemplo 4: prueba para medir la cantidad de mitocondrias y una carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias>

Después de la prueba para confirmar el efecto antienvjecimiento, se confirmó un efecto del ejemplo y ejemplo comparativo con respecto a la cantidad de mitocondrias y una carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en las células.

45 Convencionalmente, se ha considerado que el resveratrol tiene un efecto sobre la cantidad de mitocondrias o una carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias para proporcionar su efecto antienvjecimiento. De ahí que se confirmara el efecto de los ingredientes antienvjecimiento derivados de pepitas de uva sobre la cantidad de mitocondrias o una carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias.

50 La cantidad de mitocondrias se midió usando sondas selectivas para Mito Tracker Mitochondrion (Invitrogen, producto n.º: M7512) que puede marcar selectivamente las mitocondrias en una célula.

La carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias se midió por el ensayo de MTT. Puesto que el único objetivo del ensayo de MTT es la actividad deshidrogenasa de las mitocondrias, el resultado del ensayo de MTT refleja la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias.

(Procedimiento de prueba)

- 5 Después de eliminar los sobrenadantes de cultivo de fibroblastos humanos normales cultivados en el ejemplo 2, los fibroblastos humanos normales se lavaron dos veces con PBS (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., producto n.º: 05913).

10 A las células lavadas se les añadió un medio base que comprendía una solución de Hoechst 33342 diluida 1000 veces (DOJINDO LABORATORIES, producto n.º: 346-07951) y sondas selectivas para Mito Tracker Mitochondrion diluidas 2000 veces (Invitrogen, producto n.º: M7512), y se cultivaron fibroblastos humanos normales a 37 °C durante 30 minutos.

Después del cultivo, se eliminaron los sobrenadantes de cultivo y los fibroblastos humanos normales se lavaron dos veces con PBS (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., producto n.º: 05913).

- 15 Después del lavado, se añadió nuevamente PBS (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., producto n.º: 05913) a los fibroblastos humanos normales, y se tomaron tinciones de núcleos (células vivas) e imágenes teñidas de mitocondrias por un microscopio de fluorescencia (Keyence Corporation, producto n.º: BZ-X7000).

20 Posteriormente, cada intensidad de fluorescencia se midió usando un lector de placas fluorescentes (Thermo Fisher Scientific, producto n.º: VARIOSKAN FLASH) (Hoechst: longitud de onda de excitación 356 nm, longitud de onda de fluorescencia 465 nm, Mito Tracker: longitud de onda de excitación 579 nm, longitud de onda de fluorescencia 599 nm).

Después de medir la intensidad de fluorescencia, se eliminaron los sobrenadantes y los fibroblastos humanos normales se lavaron una vez con PBS (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., producto n.º: 05913).

- 25 Después de lavar los fibroblastos humanos normales, se reemplazaron con PBS (100 µl/pocillo) que comprendía 0,5 mg/ml de MTT (bromuro de tiazolil-tetrazolio azul (SIGMA, producto n.º: M5655-1G)) y se hizo reaccionar a 37 °C durante 5 horas.

Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 100 µl de HCl 0,01 M (SIGMA, producto n.º: 13-1690) y SDS al 10 % (Wako Pure Chemical Corporation, producto n.º: 191-07145) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Después de la reacción, se separó el formazán de MTT.

- 30 Después de separar el formazán, se midió la absorbancia usando un lector de placas (Thermo Fisher Scientific, producto n.º: VARIOSKAN FLASH) (longitud de onda de medición 550 nm, longitud de onda de referencia 660 nm).

(Resultados)

La fig. 2 muestra un gráfico que indica la cantidad de mitocondrias medida en los ejemplos 1-3, ejemplo comparativo 1 y control.

- 35 En la fig. 2, (a) muestra la cantidad de mitocondrias en células cultivadas durante 7 días, (b) muestra la cantidad de mitocondrias en células cultivadas durante 14 días y (c) muestra la cantidad de mitocondrias en células cultivadas durante 21 días.

40 En la fig. 2, suponiendo que la cantidad de mitocondrias en un control sea de un 100 %, las cantidades de mitocondrias en los ejemplos 1-3 y ejemplo comparativo 1 se muestran en una proporción con respecto a la cantidad de mitocondrias en el control.

En el ejemplo comparativo 1 cultivado durante 7 días, la cantidad de mitocondrias fue de un 191 % en relación con el control (véase la fig. 2(a)).

- 45 La cantidad de mitocondrias en el ejemplo 1 cultivadas durante 7 días fue de un 116 % en relación con el control, la cantidad de mitocondrias en el ejemplo 2 fue de un 126 % y la cantidad de mitocondrias en el ejemplo 3 fue de un 143 % (véase la fig. 2(a)).

La cantidad de mitocondrias en el ejemplo comparativo 1 cultivadas durante 14 días fue de un 228 % en relación con el control (véase la fig. 2(b)).

- 50 La cantidad de mitocondrias en el ejemplo 1 cultivadas durante 14 días fue de un 123 %, la cantidad de mitocondrias en el ejemplo 2 fue de un 128 % y la cantidad de mitocondrias en el ejemplo 3 fue de un 172 %, en relación con el control (véase la fig. 2(b)).

La cantidad de mitocondrias en el ejemplo 1 cultivadas durante 21 días fue de un 246 % en relación con el control (véase la fig. 2(c)).

5 La cantidad de mitocondrias en el ejemplo 1 cultivadas durante 21 días fue de un 115 %, la cantidad de mitocondrias en el ejemplo 2 fue de un 124 % y la cantidad de mitocondrias en el ejemplo 3 fue de un 178 %, en relación con el control (véase la fig. 2(c)).

De acuerdo con estos resultados, resultó que el resveratrol tiene un efecto de incremento de la cantidad de mitocondrias.

También resultó que los ingredientes antienvjecimiento derivados de pepitas de uva de la presente invención tienen un efecto de incremento de la cantidad de mitocondrias.

10 La fig. 3 muestra un gráfico que indica una carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias medida en los ejemplos 1-3, ejemplo comparativo 1 y control.

15 En la fig. 3, (a) muestra una carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en células cultivadas durante 7 días, (b) muestra una carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en células cultivadas durante 14 días y (c) muestra una carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en células cultivadas durante 21 días.

En la fig. 3, suponiendo que la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en un control sea de un 100 %, la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en los ejemplos 1-3 y ejemplo comparativo 1 se muestra en una proporción con respecto a la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en el control.

20 La carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias fue de un 22 % en relación con el ejemplo comparativo 1 cultivadas durante 7 días (véase la fig. 3(a)).

25 La carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en el ejemplo 1 cultivadas durante 7 días fue de un 74 %, la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en el ejemplo 2 fue de un 58 % y la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias fue de un 38 % en el ejemplo 3, en relación con el control (véase la fig. 3(a)).

La carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en el ejemplo comparativo 1 cultivadas durante 14 días fue de un 20 % en relación con el control (véase la fig. 3(b)).

30 La carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en el ejemplo 1 cultivadas durante 14 días fue de un 77 %, la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en el ejemplo 2 fue de un 63 % y la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en el ejemplo 3 fue de un 34 %, en relación con el control (véase la fig. 3(b)).

La carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en el ejemplo comparativo 1 cultivadas durante 21 días fue de un 49 % en relación con el control (véase la fig. 3(c)).

35 La carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en el ejemplo 1 cultivadas durante 21 días fue de un 88 %, la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en el ejemplo 2 fue de un 76 % y la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias en el ejemplo 3 fue de un 62 %, en relación con el control (véase la fig. 3(c)).

Estos resultados mostraron que el resveratrol tenía un efecto de disminución de la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias.

40 Además, resultó que el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención también tenía el efecto de disminución de la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias.

45 El resultado del ejemplo 4 mostró que el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención tenía el efecto de incremento de la cantidad de mitocondrias y de disminución de la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias.

50 Con el incremento de la cantidad de mitocondrias, disminuye la cantidad de ATP (a saber, la carga de trabajo) que se va a producir en una determinada cantidad de mitocondrias. Se considera que la disminución de la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias, que se confirmó en el ejemplo 4, se debe a la cantidad incrementada de mitocondrias y la cantidad disminuida de producción de ATP por determinada cantidad de mitocondrias.

Esto ahorra la capacidad de procesamiento de las mitocondrias, disminuye la producción de oxígeno activo generado por las mitocondrias e incrementa la producción de superóxido dismutasa (SOD), que es una enzima

para eliminar el oxígeno activo, lo que reduce, de este modo, la cantidad de oxígeno activo que da lugar al daño de las mitocondrias y células. Puesto que aproximadamente un 90 % del oxígeno activo se genera por las mitocondrias, se puede considerar que la disminución de la cantidad de oxígeno activo producido por las mitocondrias con el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención puede proteger a las células y órganos, etc. que consistan en células de un daño y aportar un efecto antienvjecimiento.

<Ejemplo 5: prueba para medir la apoptosis y necrosis>

Luego, se confirmó un efecto sobre la cantidad de células apoptóticas y la cantidad de células necróticas en los ejemplos y ejemplo comparativo.

Convencionalmente, dado que se pensaba que el resveratrol tiene un efecto antienvjecimiento al inducir la apoptosis, se confirmó el efecto del ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención sobre la cantidad de células apoptóticas.

Además, también se confirmó un efecto del ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención sobre la cantidad de células necróticas que es la misma muerte celular que la apoptosis.

La cantidad de células apoptóticas se midió usando anexina V, que se ha usado convencionalmente como un marcador de apoptosis. Con más detalle, la cantidad de células apoptóticas se midió tiñendo selectivamente con fluorescencia las células apoptóticas con anexina V marcada con fluorescencia, usando su propiedad de que la anexina V se une a la fosfatidilserina que, a menudo, aparece en la superficie de las células apoptóticas.

La cantidad de células necróticas se midió usando un homodímero de etidio III (EthD-III) que se ha usado convencionalmente como marcador de necrosis. Con más detalle, EthD-III es una sonda de ácido nucleico impermeable a película y la cantidad de células necróticas se midió usando su propiedad de que ni las células viables ni las células apoptóticas se tiñen, pero las células necróticas se tiñen en rojo intenso con EthD-III.

(Procedimiento experimental)

Después de eliminar el sobrenadante de cultivo de un fibroblasto humano normal cultivado en el ejemplo 2, el fibroblasto humano normal se lavó dos veces con PBS (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD., producto n.º: 05913).

Al fibroblasto humano normal lavado se le añadió 1×tampón de unión que contenía una solución de Hoechst 33342 diluida 1000 veces (DOJINDO LABORATORIES, producto n.º: 346-079511), un FITC-anexina V diluido 20 veces y EthD-III diluido 20 veces. A continuación, el fibroblasto humano normal se cultivó a 37 °C durante 30 minutos.

A continuación, después de eliminar el sobrenadante de cultivo, el fibroblasto humano normal se lavó dos veces en el 1×tampón de unión.

Se añadió 1×tampón de unión recién preparado al fibroblasto humano normal después del lavado y se tomaron imágenes de tinción nuclear (célula viable), tinción con anexina V (apoptosis) y tinción con EthD-III (necrosis) por un microscopio de fluorescencia.

La cantidad de células apoptóticas y la cantidad de células necróticas se calcularon a partir de las imágenes de observación fluorescentes.

Además, los FITC-Anexina V, EthD-III y 1×tampón de unión usados en los ejemplos procedían del kit de detección de células sanas/necróticas/apoptóticas (Takara Bio, Inc. producto n.º: D25517).

(Resultado)

La fig. 4 es un gráfico que muestra la cantidad de células apoptóticas medida en los ejemplos 1-3, ejemplo comparativo 1 y un control.

En la fig. 4, (a) muestra la cantidad de células apoptóticas en células cultivadas durante 7 días, (b) muestra la cantidad de células apoptóticas en células cultivadas durante 14 días y (c) muestra la cantidad de células apoptóticas en células cultivadas durante 21 días. Aquí, en la fig. 4, suponiendo que la cantidad de células apoptóticas en el control sea de un 100 %, la cantidad de células apoptóticas en los ejemplos 1-3 y ejemplo comparativo se muestra en una proporción con respecto a la cantidad de células apoptóticas en el control.

En comparación con el control, la cantidad de células apoptóticas cultivadas durante 7 días en el ejemplo comparativo 1 fue de un 2184 % (véase la fig. 4(a)).

Por otra parte, en comparación con el control, la cantidad de células apoptóticas cultivadas durante 7 días en el ejemplo 1 fue de un 164 %, la cantidad de células apoptóticas en el ejemplo 2 fue de un 102 % y la cantidad de células apoptóticas en el ejemplo 3 fue de un 483 % (véase la fig. 4(a)).

En comparación con el control, la cantidad de células apoptóticas cultivadas durante 14 días en el ejemplo comparativo 1 fue de un 1400 % (véase la fig. 4(b)).

Por otra parte, en comparación con el control, la cantidad de células apoptóticas cultivadas durante 14 días en el ejemplo 1 fue de un 107 %, la cantidad de células apoptóticas en el ejemplo 2 fue de un 313 % y la cantidad de células apoptóticas en el ejemplo 3 fue de un 226 % (véase la fig. 4(b)).

En comparación con el control, la cantidad de células apoptóticas en el ejemplo comparativo 1 cultivadas durante 21 días fue de un 4525 % (véase la fig. 4(c)).

Por otra parte, en comparación con el control, la cantidad de células apoptóticas cultivadas durante 21 días en el ejemplo 1 fue de un 59 %, la cantidad de células apoptóticas en el ejemplo 2 fue de un 558 % y la cantidad de células apoptóticas en el ejemplo 3 fue de un 668 % (véase la fig. 4(c)).

Estos resultados mostraron que el resveratrol tenía un efecto de incremento de la cantidad de células apoptóticas.

Además, resultó que el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención también tiene el efecto de incremento de la cantidad de células apoptóticas.

La fig. 5 es un gráfico que muestra la cantidad de células necróticas medida en los ejemplos 1-3, ejemplo comparativo 1 y control.

En la fig. 5, (a) muestra la cantidad de células necróticas en células cultivadas durante 7 días, (b) muestra la cantidad de células necróticas en células cultivadas durante 14 días, y (c) muestra la cantidad de células necróticas en células cultivadas durante 21 días. Además, en la fig. 5, la cantidad de células necróticas en el control es de un 100 %, y la cantidad de células necróticas de los ejemplos 1-3 y el ejemplo comparativo se muestra como un porcentaje de la cantidad de células necróticas en el control.

En comparación con el control, la cantidad de células necróticas cultivadas durante 7 días en el ejemplo comparativo 1 fue de un 125 % (véase la fig. 5(a)).

Por otra parte, en comparación con los controles, la cantidad de células necróticas cultivadas durante 14 días en el ejemplo 1 fue de un 47 %, la cantidad de células necróticas en el ejemplo 2 fue de un 47 % y la cantidad de células necróticas en el ejemplo 3 fue de un 100 % (véase la fig. 5(a)).

En comparación con el control, la cantidad de células necróticas cultivadas durante 14 días en el ejemplo comparativo 1 fue de un 801 % (véase la fig. 5(b)).

Por otra parte, en comparación con el control, la cantidad de células necróticas cultivadas durante 14 días en el ejemplo 1 fue de un 109 %, la cantidad de células necróticas en el ejemplo 2 fue de un 108 % y la cantidad de células necróticas en el ejemplo 3 fue de un 95 % (véase la fig. 5(b)).

En comparación con el control, la cantidad de células necróticas cultivadas durante 21 días en el ejemplo comparativo 1 fue de un 608 % (véase la fig. 5(c)).

Por otra parte, en comparación con el control, la cantidad de células necróticas cultivadas durante 21 días en el ejemplo 1 fue de un 55 %, la cantidad de células necróticas en el examen 2 fue de un 28 % y la cantidad de células necróticas en el ejemplo 3 fue de un 24 % (véase la fig. 5(c)).

Estos resultados mostraron que el resveratrol tiene un efecto de incremento de la cantidad de células necróticas en todos los periodos.

Por otra parte, resultó que el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención tiene el efecto de disminución de la cantidad de células necróticas.

El resultado del ejemplo 5 mostró que el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención tiene un efecto de incremento de la cantidad de células apoptóticas y de disminución de la cantidad de células necróticas.

La apoptosis es un mecanismo que induce la muerte celular a una célula dañina o a una célula innecesaria para un organismo y elimina dichas células, dando lugar, de este modo, a la generación de nuevas células al eliminar rápidamente las células envejecidas y las células inhabilitadas. La apoptosis normalmente funciona para eliminar las células senescentes, lo que da como resultado un incremento de las células sanas a nivel celular. Un órgano que consiste en células sanas es joven.

Además, la apoptosis también da lugar a la eliminación de células inmunitarias que provocan una reacción autoinmunitaria, que es un mecanismo de una enfermedad autoinmunitaria, y se puede esperar que reduzca la enfermedad autoinmunitaria por su correcto funcionamiento.

Por otra parte, la necrosis tiene una influencia negativa, tal como una reacción inflamatoria sobre los tejidos circundantes, puesto que las células explotan sin preprocesar una enzima intracelular, etc., dando como resultado la liberación extracelular de un contenido celular que contiene enzima, etc. Esta influencia negativa promueve el deterioro de las células y provoca inflamación en un cuerpo donde se incrementa a medida que envejece. Por tanto, la necrosis provoca un daño a las células al afectar negativamente a los tejidos circundantes, tal como una reacción inflamatoria.

Por lo tanto, la necrosis promueve el envejecimiento de las células.

En consecuencia, es extremadamente eficaz para promover la apoptosis y suprimir la necrosis, para suprimir el envejecimiento de las células.

Por ese motivo, se entiende que el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención que tiene un efecto de promoción de la apoptosis y supresión de la necrosis tiene un notable efecto antienvjecimiento.

Por otra parte, resultó que el resveratrol no solo promueve la apoptosis, sino también la necrosis.

Como se describe anteriormente, se requiere la supresión de la necrosis para suprimir el envejecimiento de las células. Por lo tanto, se considera que el resveratrol que no solo promueve la apoptosis sino también la necrosis tiene menos efecto antienvjecimiento que el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención.

<Ejemplo 6: prueba de toxicidad >

Para confirmar la toxicidad del ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención, se realizó una prueba de toxicidad oral aguda (prueba límite) (en base a las directrices de la OCDE para someter a prueba productos químicos 420 (2001)) usando ratones hembra.

(Procedimiento de prueba)

El ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva en polvo de acuerdo con la presente invención se suspendió con agua para inyectables para preparar una solución de prueba de 100 mg/ml.

Se adquirieron ratones hembra de cinco semanas de edad de la cepa ICR de Japanese SLC, Inc. y se criaron preliminarmente durante aproximadamente una semana. Después de confirmar que no existía ninguna anomalía en el estado general, se usaron para la prueba.

Cinco ratones hembra que se iban a usar para la prueba se alojaron en una jaula de policarbonato, respectivamente, y se les alimentó en una sala de cría establecida a temperatura ambiente (23 °C ±2 °C) y a un tiempo de iluminación de 12 horas/día.

Se alimentó a los ratones con comida de laboratorio (Nosan Corporation, nombre de producto: Lab MR stock (un gránulo para ratón, rata)) y agua potable (agua del grifo).

Se estableció un grupo de prueba al que se le iban a administrar 2000 mg/kg de ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva y el grupo de control al que se le iban a administrar agua para inyectables como control de disolvente, y se usaron cinco ratones hembra para cada grupo respectivamente.

Los ratones hembra usados para la prueba se mantuvieron en ayunas durante aproximadamente 4 horas antes de la administración.

Después de medir el peso de cada ratón hembra, se forzó al grupo de prueba y al grupo de control a recibir la administración oral de solución de prueba y agua para inyectables en una única dosis de 20 ml/kg, respectivamente, usando una sonda nasogástrica.

Los ratones hembra se observaron durante 14 días después de la administración.

Los ratones hembra se observaron con frecuencia el día de la administración y una vez al día a partir del día siguiente.

El peso de los ratones hembra se midió el día 7 y el día 14 después de la administración, y los grupos se compararon por la prueba *t* con un 5 % de nivel de significación.

Se realizó la autopsia de todos los ratones hembra después del final de un periodo de observación.

(Resultado)

En cualquier grupo de administración, no se informó de ninguna muerte durante el periodo de observación.

En ninguno de los grupos de administración, no se encontraron anomalías durante el periodo de observación.

La tabla 1 muestra el resultado del cambio de peso del grupo de prueba y el grupo de control.

En la medición del peso corporal el día 7 y el día 14 después de la administración, resultó que el grupo de prueba no tenía una diferencia significativa de peso en comparación con el grupo de control.

- 5 No se encontró ninguna anomalía en todos los ratones hembra en la autopsia después del final del periodo de observación.

[Tabla 1]

Grupos de tratamiento	Peso antes de la administración	Peso después de la administración	
		Día 7 después de la administración	Día 14 después de la administración
Grupo de prueba	27,4±1,1 (5)	29,0±1,0 (5)	30,8±1,7 (5)
Grupo de control	27,0±1,1 (5)	29,4±2,1 (5)	30,2±2,5 (5)

El peso se muestra en valor promedio ± desviación estándar (unidad: g).

- 10 El número de ratones hembra cuyo peso se midió se muestra entre paréntesis.

Estos resultados mostraron que, en la administración oral en una única dosis a ratones hembra, el valor de DL₅₀ del ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente solicitud superó los 2000 mg/kg en los ratones hembra.

- 15 Los resultados de los ejemplos 3-5 mostraron que el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención incrementa la cantidad de mitocondrias, reduce la carga de trabajo de una determinada cantidad de mitocondrias, incrementa la cantidad de células apoptóticas y disminuye la cantidad de células necróticas y, por tanto, tiene un notable efecto antienvjecimiento.

- 20 Además, como resultado de la comparación con solo el resveratrol, que se esperaba que tuviera un efecto antienvjecimiento, resultó que el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención tenía un efecto antienvjecimiento mucho más notable que solo el resveratrol.

Además, el resultado del ejemplo 6 mostró que el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención tenía una menor citotoxicidad y una seguridad más notable.

Por tanto, el alimento dietético y cosmético que contienen el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva de acuerdo con la presente invención tienen un notable efecto antienvjecimiento y seguridad.

- 25 [APLICABILIDAD INDUSTRIAL]

De acuerdo con la presente invención, puesto que el alimento dietético y cosmético antienvjecimiento contienen el ingrediente antienvjecimiento derivado de pepitas de uva que consiste en un 60 % en peso o más en peso de polifenol derivado de pepitas de uva purificado en crudo, se pueden proporcionar el alimento dietético y cosmético antienvjecimiento que tengan un notable efecto antienvjecimiento.

- 30 Por lo tanto, la presente invención se usa adecuadamente como alimento dietético y cosmético que tienen un efecto antienvjecimiento.

REIVINDICACIONES

1. Alimento dietético y cosmético para incrementar la cantidad de células apoptóticas y disminuir la cantidad de células necróticas, que comprenden un ingrediente derivado de pepitas de uva de germinación forzada que consiste en un 60 % en peso o más de polifenol purificado en crudo derivado de pepitas de uva de germinación forzada.
2. Un procedimiento de fabricación de un ingrediente derivado de pepitas de uva de germinación forzada para incrementar la cantidad de células apoptóticas y disminuir la cantidad de células necróticas, que comprende:
 - (etapa 1) sumergir una o más pepitas de uva seleccionadas de un grupo que consiste en *Vitis vinifera* L., *Vitis labrusca* L., *Vitis coignetiae* L., *Vitis amurensis* L. y *Vitis shiragai* L.
 - en agua a 30 °C - 60 °C durante 20-80 horas;
 - (etapa 2) sacar del agua la pepita de uva sumergida en dicha etapa 1 y secarla al aire de forma natural;
 - (etapa 3) sumergir la pepita de uva secada de forma natural en dicha etapa 2 en agua a 15 °C - 45 °C durante 10-100 minutos;
 - (etapa 4) sacar del agua la pepita de uva sumergida en dicha etapa 3 y secarla al aire de forma natural;
 - (etapa 5) repetir dichas etapas 3 y 4 para forzar la germinación de la pepita de uva hasta que una parte embrionaria de las pepitas de uva secadas de forma natural en dicha etapa 4 se abombe e hinche ligeramente;
 - (etapa 6) secar la pepita de uva de germinación forzada a 35 °C -60 °C;
 - (etapa 7) reducir a polvo la pepita de uva secada en dicha etapa 6;
 - (etapa 8) obtener una fracción extraída que contiene un polifenol derivado de pepitas de uva sumergiendo la pepita de uva en polvo obtenida en dicha etapa 7 en agua, etanol o bien un disolvente mixto de agua y etanol; y
 - (etapa 9) secar y reducir a polvo la fracción extraída que contiene el polifenol derivado de pepitas de uva obtenido en dicha etapa 8.
3. El alimento dietético y cosmético de acuerdo con la reivindicación 1 y el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en los que dicha pepita de uva es una pepita de uno o más cultivares de uva de vinificación seleccionados de un grupo que consiste en: Agiorgitiko, Viognier, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Gamay, Carignan, Carmenere, Xinomavro, Grenache, Gewurztraminer, Kerner, Colombard, Koshu, Sultana, Sangiovese, Chardonnay, Chenin Blanc, Syrah, Zinfandel, Semillon, Sauvignon Blanc, Tannat, Zweigelt, Tempranillo, Trebbiano, Nebbiolo, Nero D'Avola, Barbera, Pinotage, Pinot Noir, Pinot Gris, Pinot Blanc, Petit Verdot, Black Queen, Muscat Bailey A, Malbec, Muller-Thurgau, Mourvedre, Meunier, Melon de Bourgogne, Merlot, Moscato, Yama-Sauvignon, Riesling y Ruby Cabernet.

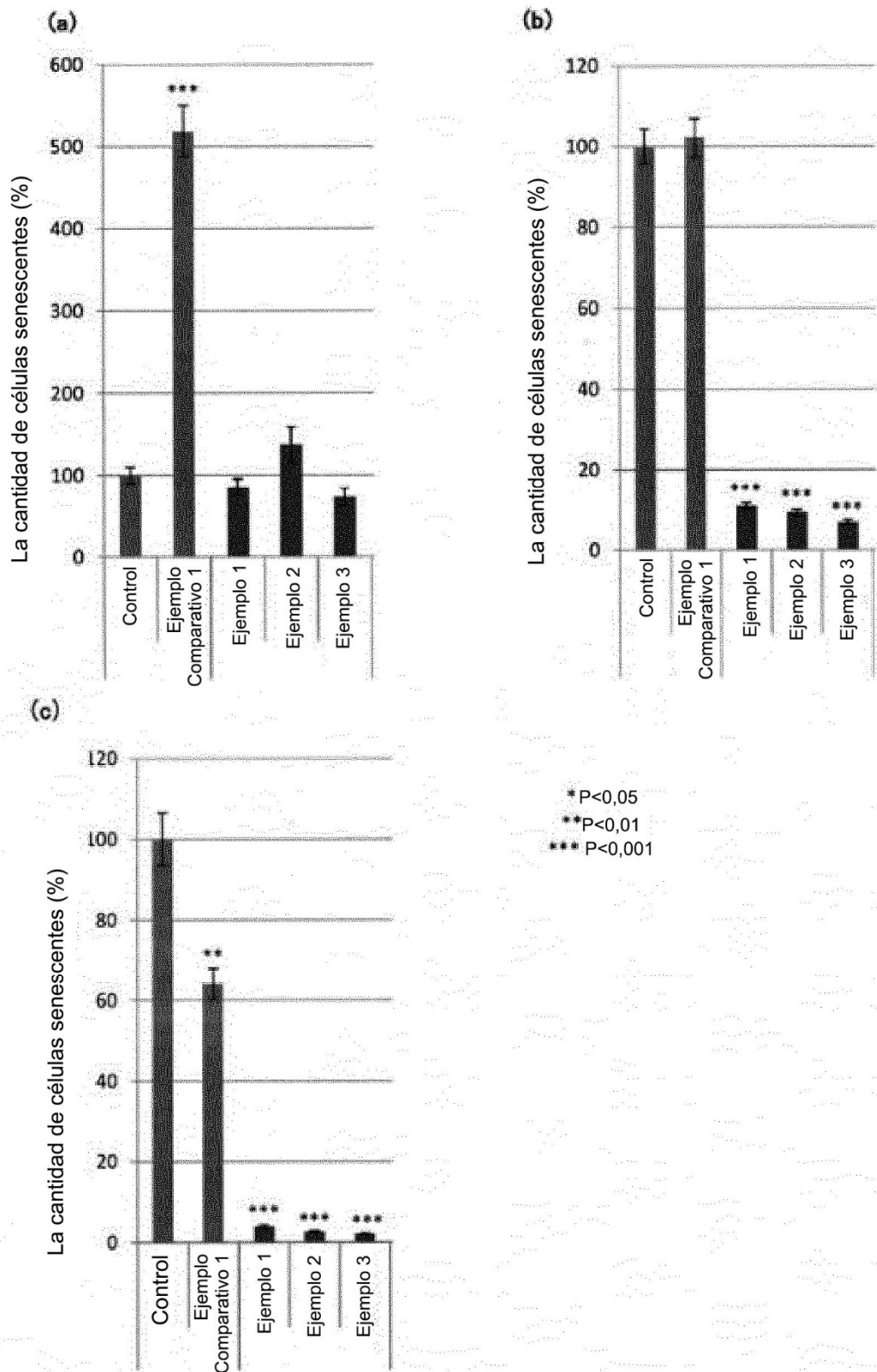


FIG.1

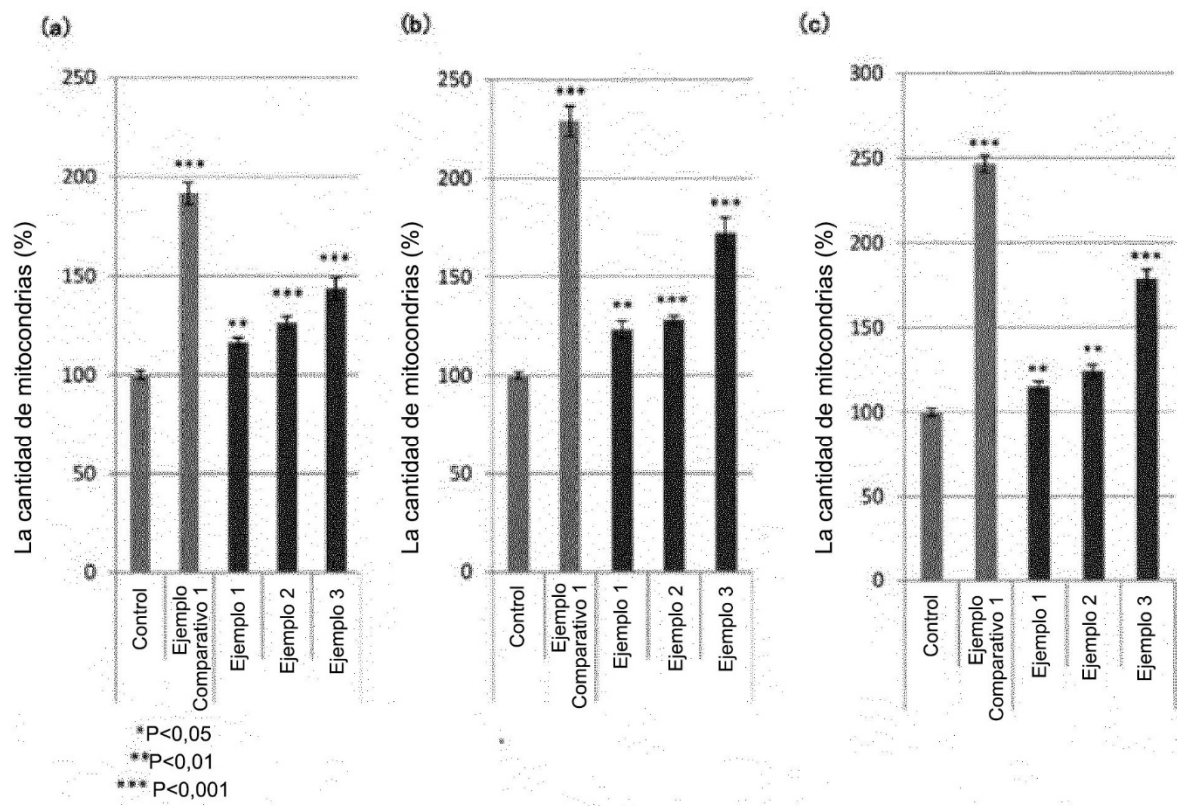


FIG.2

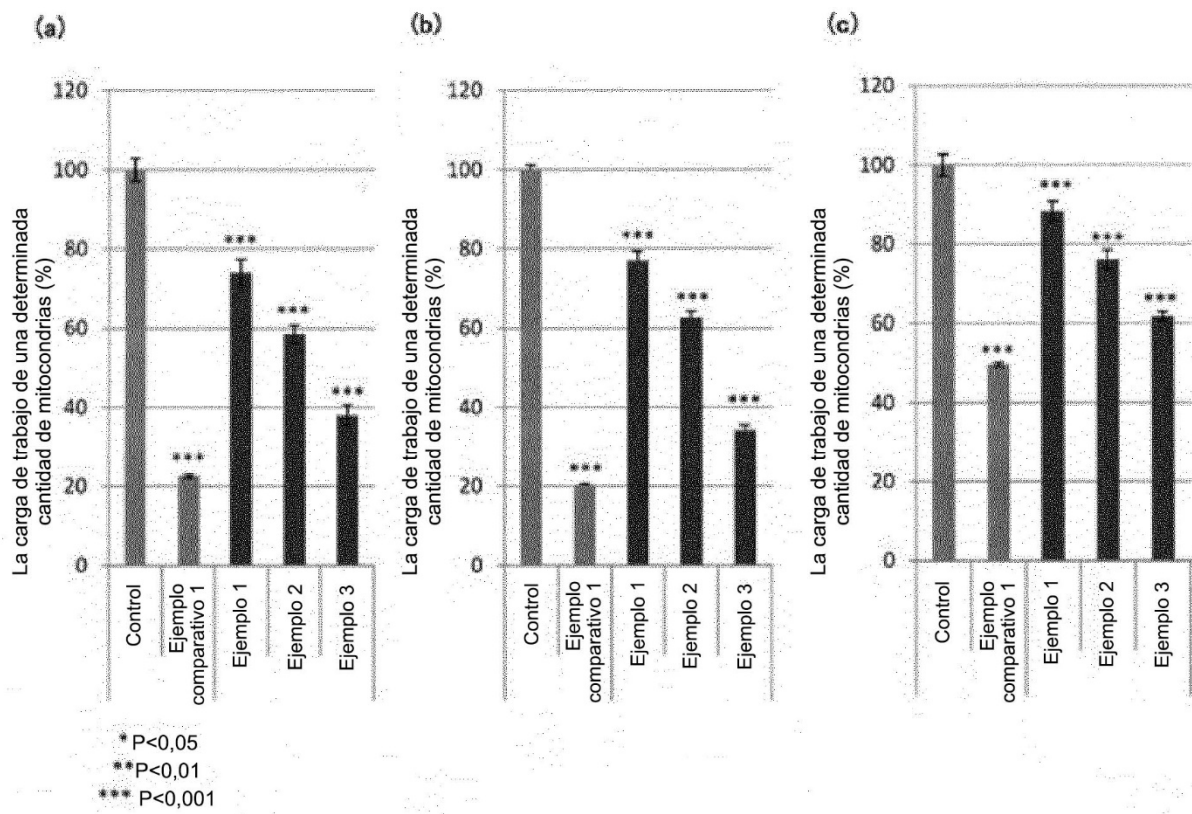


FIG.3

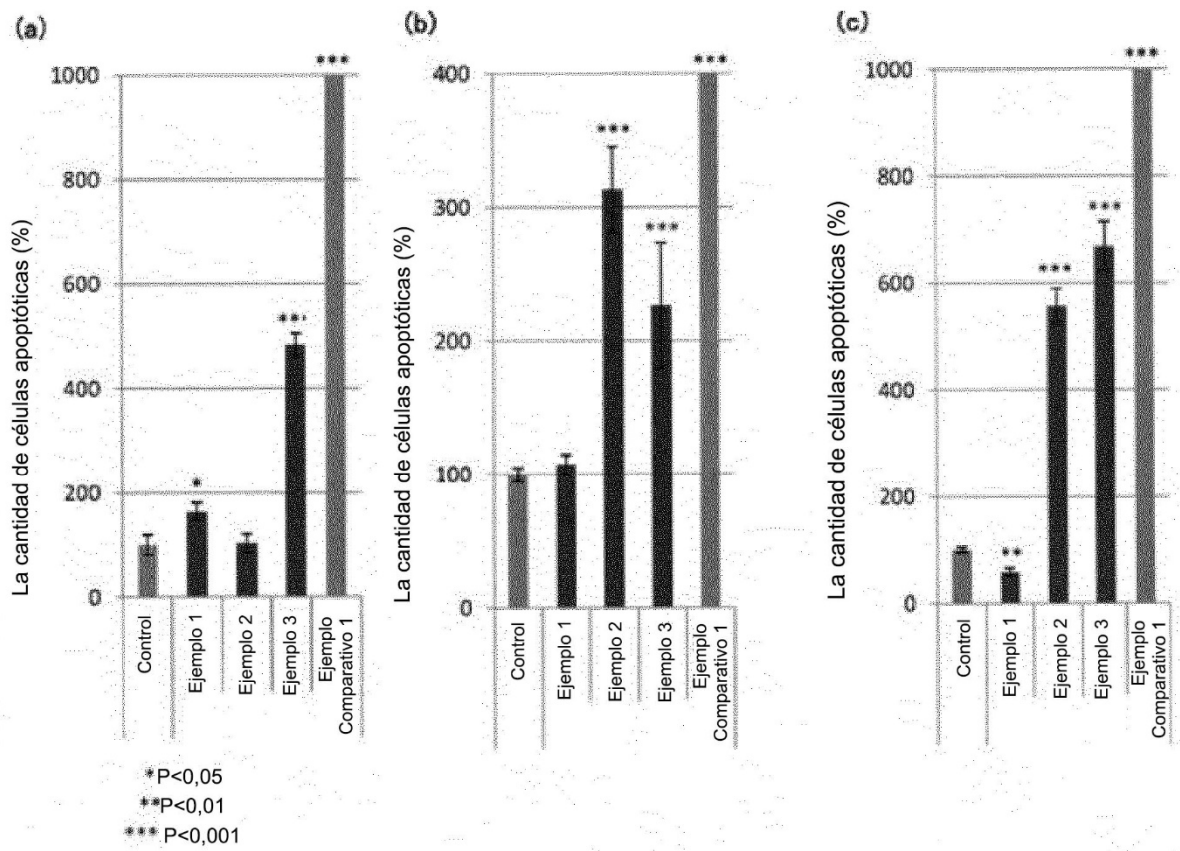


FIG.4

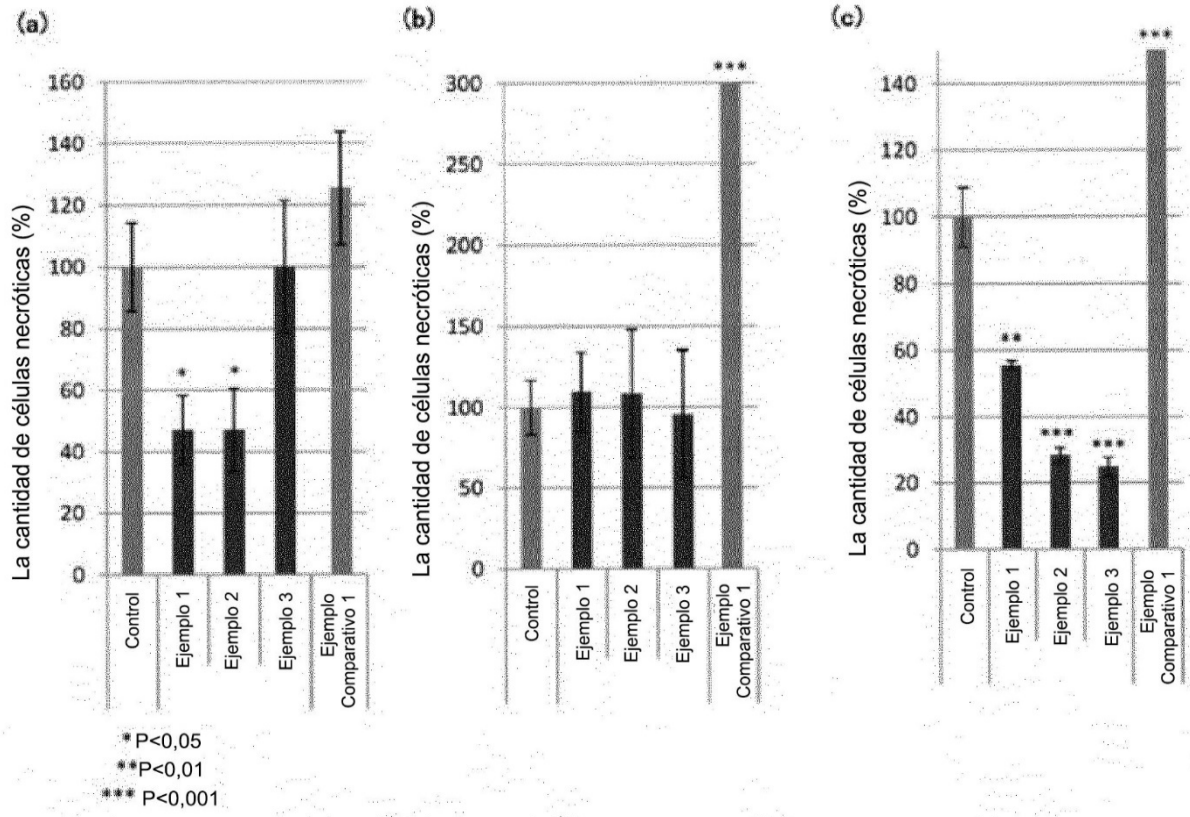


FIG.5

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- JP 2014073988 A [0005] [0006]
- WO 2014140312 A1 [0007]

Literatura no patente citada en la descripción

- KONRAD T. HOWITZ et al. *Nature*, 2003, vol. 425, 191-196 [0003]
- RICHARD A. MILLER et al. *Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES*, 2010, 191-201 [0004]