

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 220**

21 Número de solicitud: 202490024

51 Int. Cl.:

- A23L 33/105** (2006.01)
- A23L 33/115** (2006.01)
- A61K 31/05** (2006.01)
- A61K 31/7028** (2006.01)
- A61K 36/87** (2006.01)
- A61K 8/34** (2006.01)
- A61P 17/16** (2006.01)
- A61Q 19/00** (2006.01)
- C12N 5/071** (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación: 14.10.2022 30 Prioridad: 15.10.2021 JP 2021169620 10.06.2022 JP 2022094514 43 Fecha de publicación de la solicitud: 26.07.2024	71 Solicitantes: PHARMA FOODS INTERNATIONAL CO., LTD. (100.0%) 1-49, Goryo-Ohara, Nishikyo-ku, Kyoto-shi 6158245 Kyoto JP 72 Inventor/es: KIM, Yugweng; YAMADA, Hiroaki; SANJAYA, Angga; KIM, Youngil; YAMATSU, Atsushi y KIM, Mujo 74 Agente/Representante: MENDIGUTÍA GÓMEZ, María Manuela
---	--

54 Título: **Composición que contiene ceramidas y método para producir la misma**

57 Resumen:

La presente solicitud proporciona una composición que contiene una ceramida derivada de productos naturales. La presente invención proporciona una composición que contiene un polifenol y una ceramida. La presente invención proporciona una composición que contiene ceramidas derivada de torta de fermentación de vino. Además, se proporciona un método para producir una composición que contiene ceramidas, el método incluye: una etapa de lavar la torta de fermentación de vino; y una etapa de extraer un residuo obtenido mediante el lavado con el solvente polar.



ES 2 976 220 A2

DESCRIPCIÓN

Composición que contiene ceramidas y método para producir la misma

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición que contiene una ceramida. Más específicamente, la presente invención se refiere a una composición que contiene un polifenol y una ceramida, particularmente una ceramida libre, y un método para producir la misma.

Técnica antecedente

10 La ceramida es un tipo de esfingolípido, y es un componente principal del lípido intercelular de la capa córnea. Se espera que las ceramidas tengan efectos tales como un efecto de barrera cutánea (protección de la superficie), un efecto humectante, control de la humedad, retención de la elasticidad, protección del colágeno y prevención de la oxidación cuando se aplican a la piel o se ingieren por vía oral, por lo que se han proporcionado muchos cosméticos y alimentos funcionales que contienen ceramidas.

15 Entre las ceramidas, las materias primas para una ceramida de origen vegetal se han puesto en práctica a partir de muchas plantas, tales como el konjac y el arroz, y todas ellas contienen una glucosilceramida (ceramida de azúcar) como componente principal y se utilizan principalmente como materia prima para alimentos.

20 Por otro lado, estas glucosilceramidas son ceramidas no humanas y difieren en estructura de las ceramidas humanas. Además, una ceramida humana toma una forma libre a la que no se une azúcar ni ácido fosfórico (ceramida libre) y no está contenida en las células vivas normales. De acuerdo con lo anterior, una ceramida humana es un componente que apenas está presente en la naturaleza. Por lo tanto, se requiere el desarrollo de una ceramida libre derivada de productos naturales.

Divulgación de la invención

25 Soluciones a los problemas

30 Los inventores actuales han encontrado una composición novedosa útil para la salud y/o la belleza, la composición que contiene un polifenol y una ceramida (en particular, ceramidas libres). Los inventores actuales también han descubierto que se puede obtener una composición que contiene una ceramida (en particular, ceramidas libres) además de un polifenol al someter la torta de fermentación producida durante la elaboración del vino a un tratamiento específico. Por lo tanto, la presente invención proporciona dicha composición derivada de un producto natural y que contiene un polifenol y una ceramida, y un método para producir la composición.

35 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto principal de la presente invención, se proporcionan las siguientes invenciones.

(Ítem 1)

Una composición cosmética y/u oral que incluye un polifenol y una ceramida.

(Ítem 2)

40 La composición de acuerdo con el Ítem anterior, en la que la ceramida incluye una ceramida libre y una glucosilceramida.

(Ítem 3)

La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición contiene una ceramida libre en al menos aproximadamente 1 % en peso.

(Ítem 4)

- 5 La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición contiene una glucosilceramida en al menos aproximadamente 1 % en peso.

(Ítem 5)

La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición contiene un polifenol en al menos aproximadamente 1 % en peso.

(Ítem 6)

- 10 La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición contiene una ceramida libre, una glucosilceramida, y un polifenol en una relación en peso de aproximadamente 0.7 a aproximadamente 2.4: aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.4 a aproximadamente 11.0.

(Ítem 7)

- 15 La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición contiene una ceramida libre, una glucosilceramida, y un polifenol en una relación en peso de aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.0.

(Ítem 8)

- 20 La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición tiene un pH de menos de aproximadamente 5.

(Ítem 9)

La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, que contiene resveratrol en al menos aproximadamente 10 mg por aproximadamente 100 g del mismo.

(Ítem 10)

- 25 La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición es para alimentos.

(Ítem 11)

La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición es para cosméticos.

- 30 (Ítem 12)

La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que el polifenol y la ceramida se derivan de torta de fermentación de vino.

(Ítem 13)

- 35 La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición es para promover la diferenciación de queratinocitos.

(Ítem 14)

La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición es para promover la síntesis de una ceramida.

(Ítem A1)

Una composición que contiene ceramidas derivada de torta de fermentación de vino.

(Ítem A2)

- 5 La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición que contiene ceramidas contiene una ceramida libre en al menos aproximadamente 1 % en peso.

(Ítem A3)

- 10 La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición que contiene ceramidas contiene una glucosilceramida en al menos aproximadamente 1 % en peso.

(Ítem A4)

La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición que contiene ceramidas contiene un polifenol en al menos aproximadamente 1 % en peso.

- 15 (Ítem A5)

La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición contiene una ceramida libre, una glucosilceramida, y un polifenol en una relación en peso de aproximadamente 0.7 a aproximadamente 2.4: aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.4 a aproximadamente 11.0.

- 20 (Ítem A6)

La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición que contiene ceramidas contiene una ceramida libre, una glucosilceramida, y un polifenol en una relación en peso de aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.0.

- 25 (Ítem A7)

La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición que contiene ceramidas tiene un pH de menos de aproximadamente 5.

(Ítem A8)

- 30 La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, que contiene resveratrol en al menos aproximadamente 10 mg por aproximadamente 100 g del mismo.

(Ítem A9)

La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición es para alimentos.

(Ítem A10)

- 35 La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición es para cosméticos.

(Ítem A11)

La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición es para promover la diferenciación de queratinocitos.

(Ítem A12)

La composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en la que la composición es para promover la síntesis de una ceramida.

(Ítem B1)

- 5 Un método para producir una composición que contiene ceramidas, el método incluye:
una etapa de lavar la torta de fermentación de vino; y
una etapa de extraer un residuo obtenido mediante el lavado con un solvente polar.

(Ítem B2)

El método de acuerdo con el Ítem anterior, en el que el solvente polar incluye etanol.

- 10 (Ítem B3)

El método de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en el que el etanol tiene una concentración de aproximadamente 95 %.

(Ítem B4)

- 15 El método de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en el que la etapa de lavado se realiza con agua.

(Ítem B5)

El método de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, además incluye una etapa de realizar un ajuste de pH para un extracto obtenido en la etapa de extracción.

(Ítem B6)

- 20 El método de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores, en el que el ajuste de pH se realiza con ácido tartárico o ácido cítrico.

(Ítem C1)

Un método para promocionar la diferenciación de queratinocitos, el método incluye una etapa de administrar la composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores.

- 25 (Ítem C2)

Un método para promocionar la síntesis de una ceramida, el método incluye una etapa de administrar la composición de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems anteriores.

- 30 En la presente divulgación, se pretende que una o más características descritas anteriormente se puedan proporcionar en una combinación adicional además de la combinación especificada. Se debe tener en cuenta que las realizaciones y ventajas adicionales de la presente divulgación serán apreciadas por aquellos expertos en la técnica al leer y comprender la siguiente descripción detallada según sea necesario.

- 35 Tenga en cuenta que las características y las operaciones y efectos notables de la presente divulgación, distintos de los descritos anteriormente, serán evidentes para los expertos en la técnica con referencia a las siguientes realizaciones y dibujos de la invención.

Ventajas de la invención

Por el método de la presente invención, se puede obtener una composición que contiene un polifenol y una ceramida, particularmente una ceramida libre humana. Además, cuando se

obtiene dicha composición a partir de la torta de fermentación de vino, especialmente, se utiliza la torta de fermentación de vino, un material natural altamente seguro. Por lo tanto, la composición es excelente en seguridad y muy valiosa en uso, sin afectar negativamente al cuerpo humano, incluso cuando se mezcla con alimentos funcionales, cosméticos y similares.

5 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico de una realización que muestra la diferencia entre la formulación de especies moleculares de ceramidas en un precipitado de vino y la formulación de especies moleculares de ceramidas en soja.

10 La Fig. 2 es un gráfico de una realización que muestra la diferencia entre la cantidad de ceramida obtenida de un extracto de precipitado de vino y la cantidad de ceramida obtenida del vino.

15 La Fig. 3 es una vista esquemática que muestra un flujo de producción de una composición que contiene ceramidas utilizada para examinar una etapa de lavado en un método de producción de la composición que contiene ceramidas. A la izquierda de la Fig. 3 se muestra un caso en el que se extrajo un extracto de ceramida de un precipitado de vino de materia prima con etanol al 95 %, y a la derecha de la Fig. 3 se muestra un caso en el que se lavó un precipitado de vino de materia prima con etanol al 50 %, respectivamente.

20 La Fig. 4 es un gráfico de una realización que muestra la diferencia en la formulación de una composición que contiene ceramidas debido a la diferencia en la etapa de lavado. La Fig. 4 muestra el contenido (mg) de cada componente.

25 La Fig. 5 es un gráfico de una realización que muestra la diferencia en la formulación de una composición que contiene ceramidas debido a la diferencia en la etapa de lavado (cuando se extrajo un extracto de ceramida de un precipitado de vino de materia prima con etanol al 95 %, y cuando un precipitado de vino de materia prima se lavó con etanol al 50 %). La Fig. 5 muestra la relación de cada componente.

La Fig. 6 es una vista esquemática que muestra un flujo de producción de una composición que contiene ceramidas utilizada para examinar una etapa de lavado en un método de producción de la composición que contiene ceramidas. La Fig. 6 muestra casos en los que un precipitado de vino de materia prima se lavó con agua, o etanol al 10 %, 30 % o 50 %.

30 La Fig. 7 es un gráfico de una realización que muestra la diferencia en la formulación de una composición que contiene ceramidas debido a la diferencia en la etapa de lavado (cuando un precipitado de vino de materia prima se lavó con agua, o etanol al 10 %, 30 % o 50 %). La izquierda de la Fig. 7 muestra la relación de cada componente, y la derecha de la Fig. 7 muestra el contenido (mg) de cada componente, respectivamente.

35 La Fig. 8 es una vista esquemática que muestra un flujo de producción de una composición que contiene ceramidas utilizada para examinar una etapa de lavado en un método de producción de la composición que contiene ceramidas. La Fig. 8 muestra un caso en el que un precipitado de vino de materia prima se lavó con agua a 40 °C o 60 °C.

40 La Fig. 9 es un gráfico de una realización que muestra la diferencia en la formulación de una composición que contiene ceramidas debido a la diferencia en la etapa de lavado (cuando un precipitado de vino de materia prima se lavó con agua a 40 °C o 60 °C). La izquierda de la Fig. 9 muestra la relación de cada componente, y la derecha de la Fig. 9 muestra el contenido (mg) de cada componente, respectivamente.

45 La Fig. 10 es una vista esquemática que muestra un flujo de producción de una composición que contiene ceramidas utilizada para examinar una etapa de lavado en un método de

producción de la composición que contiene ceramidas. La Fig. 10 muestra un caso en el que el precipitado de vino de una materia prima se lavó con agua durante 30, 60 o 180 minutos.

La Fig. 11 es un gráfico de una realización que muestra la diferencia en la formulación de una composición que contiene ceramidas debido a la diferencia en la etapa de lavado (cuando un precipitado de vino de materia prima se lavó con agua durante 30, 60 o 180 minutos). La izquierda de la Fig. 11 muestra la relación de cada componente, y la derecha de la Fig. 11 muestra el contenido (mg) de cada componente, respectivamente.

La Fig. 12 es una vista esquemática que muestra un flujo de producción de una composición que contiene ceramidas utilizada para examinar una etapa de lavado en un método de producción de la composición que contiene ceramidas. La Fig. 12 muestra un caso en el que un precipitado de vino de materia prima se lavó con agua en una cantidad adicional de 10 veces, 8.3 veces y 6.7 veces.

La Fig. 13 es un gráfico de una realización que muestra la diferencia en la formulación de una composición que contiene ceramidas debido a la diferencia en la etapa de lavado (cuando un precipitado de vino de materia prima se lavó con agua en una cantidad adicional de 10 veces, 8.3 veces y 6.7 veces). La izquierda de la Fig. 11 muestra la relación de cada componente, y la derecha de la Fig. 11 muestra el contenido (mg) de cada componente, respectivamente.

La Fig. 14 es una vista esquemática que muestra un flujo de producción de una composición que contiene ceramidas utilizada para examinar el ajuste del pH en un método de producción de la composición que contiene ceramidas. La Fig. 14 muestra un caso en el que se agregó ácido tartárico, ácido cítrico o carbonato de sodio a un extracto de ceramida extraído de un precipitado de vino de materia prima.

La Fig. 15 es una fotografía de una realización que muestra la diferencia de color de una composición que contiene ceramidas debido a la diferencia en pH.

La Fig. 16 es un gráfico de una realización que muestra la influencia de una composición que contiene ceramidas en la proliferación de células epidérmicas humanas. Cuando se cultivaron células epidérmicas humanas (células Hacat) en un medio al que se había agregado la composición que contenía ceramidas a diferentes concentraciones, la actividad de proliferación celular aumentó notablemente en un grupo tratado con la composición que contenía ceramidas en comparación con un medio sin aditivo.

La Fig. 17 es un gráfico de una realización que muestra la cantidad de resveratrol contenida en el vino tinto, el precipitado de vino (cristal de vino) y una composición que contiene ceramidas (ceramida de vino).

La Fig. 18 es un gráfico que muestra la cantidad de expresión de ARNm para marcadores de diferenciación (Pro-Filaggrina y Loricrina) cuando se agregó una estirpe celular Hacat de queratinocitos epidérmicos humanos con una ceramida de vino de una realización de la presente invención y se cultivó durante 72 horas.

La Fig. 19 es un gráfico que muestra la cantidad de expresión de ARNm para un marcador de la vía de síntesis de ceramidas (SPT: Serina-Palmitoil Transferasa) cuando se añade una estirpe celular Hacat de queratinocitos epidérmicos humanos con una ceramida de vino de una realización de la presente invención y se cultiva durante 72 horas.

La Fig. 20 es un gráfico que muestra la cantidad de expresión de ARNm para un marcador de diferenciación (Pro-Filaggrina) y un marcador de la vía de síntesis de ceramidas (SPT) cuando se agregó una estirpe celular Hacat de queratinocitos epidérmicos humanos con una ceramida de vino de una realización de la presente invención, una glucosilceramida y una ceramida libre, y se cultivó durante 72 horas.

La Fig. 21 es un gráfico que muestra la cantidad de expresión de ARNm para un marcador de diferenciación (Pro-Filaggrina) y un marcador de la vía de síntesis de ceramidas (SPT) cuando se agregó una estirpe celular Hacat de queratinocitos epidérmicos humanos con una ceramida de vino de una realización de la presente invención y cada ceramida obtenida a partir de una materia prima distinta del vino (ceramida de arroz, ceramida de pino y ceramida de konjac) y se cultivó durante 72 horas.

La Fig. 22 es una fotografía de sección celular en la que se agregó una ceramida de vino de una realización de la presente invención a un queratinocito cultivado en 3D y se cultivó durante 48 horas. La cantidad de ceramidas en la sección celular se observó bajo un microscopio de contraste de fase, tiñendo con hematoxilina y eosina. El gráfico muestra el valor medio $\pm$ DE del grosor de la piel en μm ($N = 4$). La ceramida de vino de una realización de la presente invención aumentó significativamente el grosor de la epidermis.

La Fig. 23 es una fotografía de sección celular en la que se agregó una ceramida de vino de una realización de la presente invención a un queratinocito cultivado en 3D y se cultivó durante 48 horas. La cantidad de ceramidas en la sección celular se observó bajo un microscopio de contraste de fase, inmunotinción con un anticuerpo anti-ceramida. El gráfico muestra el valor medio $\pm$ DE de la densidad de fluorescencia relativa en queratinocitos cultivados en 3D ($N = 4$). La cantidad de ceramida en la piel se incrementó significativamente con la ceramida de vino de una realización de la presente invención.

Modo de realización de la invención

A continuación, se describirá la presente divulgación mostrando el mejor modo. Se debe entender que a lo largo de la especificación, una expresión de forma singular también incluye el concepto de las formas plurales de la misma, a menos que se indique lo contrario. Por lo tanto, se debe entender que el artículo en forma singular (por ejemplo, en inglés, se utilizan “un”, “una”, “el” y similares) también incluye el concepto de las formas plurales de la misma, a menos que se indique lo contrario. También se debe entender que los términos utilizados en la especificación se utilizan en un sentido comúnmente utilizado en la técnica, a menos que se indique lo contrario. Por lo tanto, a menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la especificación tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto con conocimientos básicos en la técnica a la que pertenece esta divulgación. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación (que incluye las definiciones).

A continuación, se describirán según corresponda las definiciones y/o el contenido técnico básico de los términos particularmente utilizados en la presente especificación.

Como se utiliza en la especificación, “aproximadamente” significa $\pm 10\%$ del valor numérico subsiguiente.

En la especificación, “ceramida” es un tipo de esfingolípido y se refiere a un grupo de compuestos en los que la esfingosina y un ácido graso están unidos a amidas. En la presente especificación, la “ceramida” también incluye derivados de la ceramida. La ceramida es un compuesto que tiene una estructura (-NH-CO-) en la que un grupo carboxilo (-COOH) de un ácido graso está unido a un grupo amino (-NH₂) de una base esfingoide. Los grupos polares, como el azúcar y el ácido fosfórico, se unen además al grupo hidroxilo alcoholico (-OH) de la base esfingoide de una ceramida para formar glicosfingolípidos y esfingofosfolípidos, respectivamente. En el presente documento, aquellos a los que se une un azúcar se conocen particularmente como glicosilceramidas, y particularmente cuando el azúcar es glucosa, se denominan glucosilceramidas. Una ceramida que no tiene azúcar, ácido fosfórico o algo similar unido a ellos se llama ceramida libre. La ceramida libre es generalmente un metabolito intermedio en el sistema de síntesis de esfingolípidos y, por lo tanto, está presente solo en una cantidad traza, particularmente en animales y plantas. Una ceramida que tiene un azúcar

o un ácido fosfórico unido a ella, como galactosilceramida, glucosilceramida y esfingomielina, se extrae de animales y plantas, pero es diferente de la ceramida libre en la orientación en el lípido intercelular debido al azúcar o al ácido fosfórico unido a este.

5 En la especificación, “polifenol” se refiere a un término genérico para compuestos que tienen una pluralidad de grupos hidroxilo fenólicos en la molécula, y ejemplos específicos de los mismos incluyen flavonol, flavona, isoflavona, tanino, catequina, quercetina, antocianina, antocianidina, leucoantocianidina, proancianidina, galato de propilo, catequina, rutina, quercetina, ácido ferúlico, resveratrol, procianidina, teaflavina, curcumina, picrogenol, ácido rosmarínico, ácido elágico, ácido quínico, ácido clorogénico, e hidroxitirosol.

10 En la especificación, “lavado” se refiere a mezclar la torta de fermentación de vino (precipitado de vino) y un líquido al agitar para lavar y eliminar las impurezas.

En la especificación, “extracción” significa separar un analito contenido en una solución de otras impurezas, y también se conoce como extracción con solvente o extracción líquido-líquido.

15 (Realizaciones preferidas)

Las realizaciones preferidas de la presente divulgación se describirán a continuación. Las realizaciones a continuación se proporcionan para una mejor comprensión de la presente divulgación, y el alcance de la presente divulgación no se debe limitar a la siguiente descripción. Por lo tanto, es evidente que los expertos en la técnica pueden realizar
20 adecuadamente modificaciones dentro del alcance de la presente divulgación a la vista de la descripción en la especificación. Además, las siguientes realizaciones de la presente divulgación se pueden utilizar solas o en combinación de las mismas.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición cosmética y/u oral que incluye un polifenol y una ceramida. En otro aspecto de la presente divulgación, se
25 proporciona una composición que contiene ceramidas derivada de la torta de fermentación de vino. La composición cosmética y/u oral que incluye un polifenol y una ceramida, y la composición que contiene ceramidas derivada de la torta de fermentación de vino son composiciones que contienen una ceramida. Por lo tanto, se pueden denominar colectivamente “composición que contiene ceramidas” en la especificación, a menos que se
30 especifique lo contrario. Además, en la especificación, la composición que contiene ceramidas de la presente invención se puede denominar “ceramida de vino”.

La ceramida es un tipo de esfingolípido, e incluye un grupo de compuestos en los que la esfingosina y un ácido graso están unidos a amidas. Además, la ceramida puede ser una
35 sustancia anfifílica no iónica que tiene uno o más grupos alquilo o alquenilo lineales y/o ramificados de cadena larga, además, al menos dos o más grupos hidroxilo y uno o más grupos amida (y/o grupos amino) en la molécula. Además, la ceramida puede ser una sustancia en la que un residuo de fosfatidilcolina o un residuo de azúcar se une a un grupo hidroxilo de la sustancia anfifílica no iónica (un tipo de derivado de ceramida).

En una realización, la ceramida incluye una ceramida libre y una glucosilceramida. Por
40 ejemplo, en una realización preferida, la ceramida incluye una ceramida derivada de plantas, y preferiblemente incluye una ceramida derivada de la torta de fermentación de vino.

La ceramida libre no está particularmente limitada siempre que se pueda utilizar para cosméticos, preparaciones externas para la piel o alimentos, y ejemplos de las mismas incluyen ceramidas libres naturales tal como ceramida 1, ceramida 2, ceramida 3, ceramida
45 3B, ceramida 4, ceramida 5, ceramida 6, ceramida 6I y ceramida 6II. Dado que la composición que contiene ceramidas de la presente invención se puede obtener utilizando un material que no afecta negativamente al cuerpo humano, la composición que contiene ceramidas es eficaz

como materia prima para aplicaciones en las que la seguridad se considera importante, incluida la aplicación en alimentos y piel. La composición que contiene ceramidas contiene una ceramida libre humana y, por lo tanto, también es adecuada como materia prima para alimentos tales como alimentos saludables. En una realización de la presente divulgación, la composición que contiene ceramidas de la presente invención puede contener solo una de estas ceramidas libres, o una combinación de dos o más de las mismas en una relación de mezcla arbitraria.

La ceramida en la composición que contiene ceramidas de la presente invención tiene varias funciones tales como una función de barrera que no evapora la humedad en la piel, una función de restauración de la función de barrera, una función de impartir tensión y resistencia al cabello, una función de promover la exfoliación de queratina y suavizar la piel, una función de exhibir un efecto hidratante cuando la composición se aplica a la piel o al cabello, y la función de exhibir un efecto promotor de la producción de ceramidas. Sin embargo, la función de la composición que contiene ceramidas de la presente invención no se limita a una o dos o más de estas funciones, y la composición puede tener una función como ceramida distinta de estas funciones.

En una realización de la presente invención, la composición que contiene ceramidas de la presente invención se puede aplicar a la piel o utilizar para la alimentación. En cualquier caso, se puede disfrutar de las funciones anteriores, que incluyen la hidratación de la piel, mejora de manchas y arrugas, medidas contra los rayos ultravioleta y similares.

En una realización de la presente invención, la composición que contiene ceramidas de la presente invención se puede aplicar a la piel y/o tomar como alimento, promoviendo de esta manera la diferenciación de queratinocitos en la piel y/o promoviendo la síntesis De novo de una ceramida. La composición que contiene ceramidas de la presente invención puede aumentar, por ejemplo, la expresión génica de un marcador de diferenciación de queratinocitos. El marcador de diferenciación de los queratinocitos no se limita particularmente siempre que se pueda confirmar la diferenciación de los queratinocitos, pero preferiblemente incluye un marcador genético y, por ejemplo, Pro-Filaggrina (una proteína que forma el estrato córneo de la piel y sirve como materia prima de un factor hidratante natural (NMF)) y Loricrina (una proteína que sirve como marco para formar normalmente el estrato córneo).

Además, la composición que contiene ceramidas de la presente invención puede promover la síntesis de una ceramida, por ejemplo, al potenciar la expresión de genes relacionados con la síntesis de ceramidas en la vía de síntesis de ceramidas. Para la síntesis De novo de ceramidas, se ha conocido la ruta de Serina + Palmitoil CoA $\rightarrow$ 3-ceto-esfinganina $\rightarrow$ Esfinganina $\rightarrow$ Dihidroceramida $\rightarrow$ Ceramida.

El marcador de diferenciación de la vía de síntesis de ceramidas no se limita particularmente siempre que esté involucrado en la vía de síntesis de ceramidas, pero preferiblemente incluye un marcador genético y, por ejemplo, SPT: Serina-Palmitoil Transferasa (una enzima para la vía de síntesis de ceramidas de novo) y similares. SPT cataliza la conversión de Serina + Palmitoil CoA a 3-ceto-esfinganina en la vía de síntesis de ceramidas.

Además, la composición que contiene ceramidas de la presente invención puede aumentar el grosor de la piel y promover el recambio de la piel al promover el aumento y la diferenciación de los queratinocitos.

En una realización de la presente invención, la composición que contiene ceramidas de la presente invención contiene una ceramida libre en al menos aproximadamente 0.01 % en peso o más, preferiblemente al menos aproximadamente 0.1 % en peso o más, al menos aproximadamente 0.3 % en peso o más, al menos aproximadamente 0.5 % en peso o más, o al menos aproximadamente 0.8 % en peso o más, y más preferiblemente al menos aproximadamente 1 % en peso o más.

En una realización de la presente invención, la composición que contiene ceramidas de la presente invención contiene una glucosilceramida en al menos aproximadamente 0.01 % en peso o más, preferiblemente al menos aproximadamente 0.1 % en peso o más, al menos aproximadamente 0.3 % en peso o más, al menos aproximadamente 0.5 % en peso o más, o al menos aproximadamente 0.8 % en peso o más, y más preferiblemente al menos aproximadamente 1 % en peso o más.

El polifenol es un compuesto que tiene una pluralidad de grupos hidroxilo fenólicos en la molécula, y el tipo de polifenol contenido en la composición de la presente invención no se limita particularmente, y los ejemplos de los mismos incluyen flavonol, flavona, isoflavona, tanino, catequina, quercetina, antocianina, antocianidina, leucoantocianidina, proantocianidina, galato de propilo, catequina, rutina, quercetina, ácido ferúlico, resveratrol, procianidina, teaflavina, curcumina, picnogenol, ácido rosmarínico, ácido elágico, ácido quínico, ácido clorogénico e hidroxitirosol. En la composición de la presente invención, estos polifenoles pueden estar contenidos solos, o pueden estar contenidos en combinación de dos o más de los mismos.

En una realización, la composición de la presente invención contiene un polifenol en al menos aproximadamente 0.01 % en peso o más, preferiblemente al menos aproximadamente 0.1 % en peso o más, al menos aproximadamente 0.3 % en peso o más, al menos aproximadamente 0.5 % en peso o más, o al menos aproximadamente 0.8 % en peso o más, y más preferiblemente al menos aproximadamente 1 % en peso o más.

En una realización de la presente invención, la composición de la presente invención puede contener resveratrol como el polifenol. El resveratrol puede estar contenido en al menos aproximadamente 1 mg, al menos aproximadamente 3 mg, al menos aproximadamente 5 mg, al menos aproximadamente 7 mg, o al menos aproximadamente 10 mg por aproximadamente 100 g de la composición de la presente invención.

En una realización de la presente invención, la composición de la presente invención puede contener una glucosilceramida, una ceramida libre, y un polifenol como se describió anteriormente en una relación en peso de glucosilceramida: ceramida libre: polifenol = aproximadamente 1.0: aproximadamente 0.5 a aproximadamente 3.0: aproximadamente 1.0 a aproximadamente 15.0, preferiblemente aproximadamente 1.0: aproximadamente 0.7 a aproximadamente 2.4: aproximadamente 1.4 a aproximadamente 11.0, más preferiblemente aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.0. En cuanto a las ceramidas como materias primas alimentarias, se producen ceramidas derivadas de muchas plantas tales como el konjac y arroz, pero todas ellas contienen una glucosilceramida como componente principal. Por lo tanto, la composición que contiene ceramidas de la presente invención es útil en la medida en que contiene una ceramida libre en una cantidad igual o mayor que una glucosilceramida.

En otras realizaciones, la composición de la presente invención puede contener una ceramida y un polifenol en una relación en peso de total ceramida: polifenol = aproximadamente 1.0: aproximadamente 0.5 a aproximadamente 5.0, preferiblemente aproximadamente 1.0: aproximadamente 0.7 a aproximadamente 4.0.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir una composición que contiene ceramidas, el método incluye: una etapa de lavar la torta de fermentación de vino; y una etapa de extraer un residuo obtenido mediante el lavado con un solvente polar.

El método para producir una composición que contiene ceramidas de la presente invención se caracteriza por el lavado de la torta de fermentación de vino (precipitado) (Bitartrato) obtenida durante la elaboración del vino, y luego la extracción de un residuo con un solvente polar para obtener un extracto del producto de fermentación. Como las materias primas de la

torta de fermentación de vino, la variedad de uva, el tipo de levadura y el método de producción del vino no son particularmente limitados. Independientemente de la variedad de uva y del método de producción que se vaya a utilizar, por ejemplo, los sedimentos acumulados en el fondo o en la superficie de la pared de un barril de vino se pueden utilizar como torta de fermentación de vino para la presente invención. La levadura de vino utilizada en la fermentación del vino no se limita particularmente, pero se puede utilizar una levadura natural o una levadura cultivada. Por lo tanto, independientemente de un tipo de precipitado de vino como material de partida, es posible obtener una composición que contenga una ceramida y una glucosilceramida en gran cantidad a través del método para producir la composición que contiene ceramidas de la presente invención.

En una realización, como solvente polar, se puede utilizar un solvente polar tal como agua, metanol, etanol, alcohol isopropílico, 1,3-butilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, glicerina o acetato de etilo. Se pueden mezclar dos o más de estos solventes. Preferiblemente, cuando se utiliza etanol o etanol hidratado, que es una mezcla de etanol y agua, como solvente polar, se puede extraer eficientemente la composición que contiene ceramidas de la presente invención.

Cuando se utiliza etanol hidratado como solvente polar, la concentración de etanol no se limita particularmente y, por ejemplo, la concentración de etanol puede ser de aproximadamente 10 % a aproximadamente 99 % (p/p), y preferiblemente la concentración de etanol puede ser de al menos aproximadamente 70 % o más, aproximadamente 75 % o más, aproximadamente 80 % o más, aproximadamente 85 % o más, aproximadamente 90 % o más, aproximadamente 93 % o más, aproximadamente 95 % o más, aproximadamente 98 % o más, o aproximadamente 99 % o más (p/p).

En una realización, la temperatura de extracción puede ser de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 80 °C, preferiblemente aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C en la etapa de extracción. El tiempo de extracción puede ser de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 8 horas, preferiblemente aproximadamente 3 horas a aproximadamente 6 horas.

Como método de extracción, se puede emplear cualquier método, tal como la extracción por agitación, extracción continua, extracción por inmersión, extracción a contracorriente o extracción supercrítica, y cualquier aparato se puede utilizar a temperatura ambiente o bajo calentamiento por reflujo. Preferiblemente, como el método de extracción en el método de la presente invención, la extracción por agitación se puede realizar utilizando un agitador de tipo remo o de hélice. En una realización, cuando se realiza la extracción por agitación, el precipitado de vino y un solvente (etanol o similar) se agitan en un tanque de extracción mientras se calientan a una temperatura predeterminada para la extracción. La mezcla se agita durante un tiempo predeterminado, y luego se filtra, y el filtrado se puede convertir en una fracción de ceramida (composición que contiene ceramidas de la presente invención). La escala de extracción se puede ajustar adecuadamente. Por lo tanto, en otra realización, se coloca un vaso de precipitados en un baño de agua, y el precipitado de vino y un solvente (etanol o similar) se agitan en el vaso de precipitados para realizar la extracción.

En una realización, en la etapa de lavado, la torta de fermentación de vino (precipitado de vino) se puede lavar con agua. En una realización, en la etapa de lavado, la torta de fermentación de vino y el agua se pueden lavar mientras se agitan utilizando un agitador de tipo remo o de tipo hélice. En una realización, cuando se mezclan la torta de fermentación de vino y el agua, la mezcla se puede agitar mientras se calienta. La mezcla se agita durante un tiempo predeterminado y luego se filtra, y el residuo se puede utilizar en la etapa de extracción. Ejemplos de agua incluyen agua purificada, agua esterilizada, agua del grifo y similares, y el agua purificada o el agua esterilizada es preferible desde el punto de vista de una pequeña cantidad de impurezas. En este caso, la temperatura de lavado puede ser de

aproximadamente 30 °C a aproximadamente 80 °C, preferiblemente aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C. El tiempo de lavado puede ser de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 6 horas, preferiblemente aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas.

- 5 En una realización de la presente invención, el método para producir la composición que contiene ceramidas de la presente invención puede incluir la realización de un ajuste de pH para un extracto obtenido en la etapa de extracción con un solvente polar. Mediante dicho ajuste de pH, la composición obtenida que contiene ceramidas puede tener un color ajustado y, preferiblemente, tiene un color de vino deseable. Dicho ajuste del pH se puede realizar con
10 un ácido o un álcali, y el tipo de ácido o álcali no se limita particularmente siempre que se utilice en cosméticos, alimentos y bebidas, alimentos saludables, alimentos con reivindicaciones de función, alimentos para usos específicos para la salud, suplementos, productos farmacéuticos, cuasifármacos, o preparaciones externas para la piel, dentro de un rango en el que el efecto de la composición que contiene ceramidas de la presente invención
15 no se vea afectado, pero el ajuste del pH se puede realizar, por ejemplo, con ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido cítrico, carbonato de sodio o similares.

En una realización, la composición que contiene ceramidas de la presente invención se puede someter a un ajuste de pH para tener un color de acuerdo con un uso deseado, y la composición que contiene ceramidas puede tener un pH de, por ejemplo, menos de
20 aproximadamente 5, menos de aproximadamente 4.8, menos de aproximadamente 4.0, o menos de aproximadamente 3.5 para un ajuste de pH como se describió anteriormente.

Además, en la extracción, separación, purificación, identificación y similares de la composición que contiene ceramidas de la presente invención, las operaciones ordinarias se pueden aplicar ampliamente, y por ejemplo, la composición que contiene ceramidas obtenida en la
25 etapa de extracción como se describió anteriormente se puede ajustar en pH según sea necesario, mezclarse aún más con un excipiente deseado según sea necesario y someterse a concentración, esterilización por calor, liofilización y similares.

En una realización preferida de la presente invención, la composición que contiene ceramidas de la presente invención se puede obtener al lavar la torta de fermentación de vino (precipitado
30 de vino) preferiblemente con agua en aproximadamente 10 veces la cantidad a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 1 hora, y luego extraer el residuo, preferiblemente con aproximadamente 95 % de solución de etanol, a aproximadamente 40 °C durante aproximadamente 6 horas. En una realización preferida de la presente invención, en la composición que contiene ceramidas de la presente invención, el extracto obtenido como
35 se describió anteriormente puede tener un pH ajustado a menos de aproximadamente 4.0. Además, en una realización preferida de la presente invención, la composición que contiene ceramidas de la presente invención se puede mezclar con un excipiente tal como ciclodextrina, concentrar aún más al sustituir el etanol con agua, esterilizar térmicamente a unos 120 °C y liofilizar hasta convertirlo en polvo.

40 En una realización preferida de la presente invención, la composición que contiene ceramidas de la presente invención puede contener una glucosilceramida, una ceramida libre, y un polifenol en una relación en peso de aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.0 cuando se obtiene mediante el método de producción como se describió anteriormente.

45 En una realización preferida de la presente invención, la composición que contiene ceramidas de la presente invención puede contener resveratrol en al menos aproximadamente 10 mg por aproximadamente 100 g de la composición de la presente invención cuando se obtiene mediante el método de producción como se describió anteriormente.

La composición que contiene ceramidas producida por el método de la presente invención se puede aplicar o mezclarse en diversas aplicaciones. Ejemplos de aplicación son los cosméticos, los productos farmacéuticos, los reactivos y las composiciones orales (por ejemplo, alimentos saludables, alimentos con reivindicaciones de función, alimentos para usos específicos para la salud, suplementos y alimentos para uso específico, y similares).

En una realización, el producto que contiene la composición que contiene ceramidas de la presente invención puede contener un excipiente, un portador, un aditivo o similares, y el tipo de los mismos no se limita particularmente siempre que sea de uso común y farmacéuticamente aceptable, y la cantidad de mezcla del mismo también se pueda cambiar apropiadamente. Ejemplos del excipiente incluyen cloruro de sodio y citrato de sodio, ejemplos del portador incluyen agua esterilizada, solución salina fisiológica y varios tampones, y ejemplos del aditivo incluyen un espesante, un tampón, un conservante y un antiséptico.

En una realización, la forma de dosificación del producto farmacéutico que contiene la composición que contiene ceramidas de la presente invención no se limita particularmente, y se puede seleccionar apropiadamente según sea necesario, y los ejemplos de la misma incluyen una preparación oral tal como un comprimido, una cápsula, un gránulo, un gránulo fino o un polvo, o una preparación parenteral tal como una inyección, un supositorio o un agente de recubrimiento. La cantidad de mezcla de la composición que contiene ceramidas de la presente invención en estos productos farmacéuticos no se limita particularmente, y se puede establecer adecuadamente de acuerdo con el tipo y uso de los productos farmacéuticos.

En una realización, la composición oral (por ejemplo, alimentos saludables, alimentos con reivindicaciones de función, alimentos para usos específicos para la salud, suplementos y alimentos para uso específico, y similares) que contiene la composición que contiene ceramidas de la presente invención se puede producir al mezclar la composición que contiene ceramidas de la presente invención junto con un excipiente tal como dextrina, lactosa, o almidón, una fragancia, un colorante, gelatina o similares, según sea necesario. La cantidad de la composición que contiene ceramidas de la presente invención mezclada en estas composiciones orales no se limita particularmente, y se puede establecer adecuadamente de acuerdo con el tipo y uso de la composición oral. En una realización, estas composiciones orales pueden contener varios componentes dependiendo del tipo de las mismas. En una realización, la composición que contiene ceramidas de la presente invención también se puede agregar a los alimentos y bebidas que se consumen habitualmente.

En una realización, la composición que contiene ceramidas de la presente invención también se puede mezclar en una preparación externa para la piel, que incluyen cosméticos, productos farmacéuticos y cuasifármacos. Por ejemplo, la composición que contiene ceramidas de la presente invención se puede mezclar, por ejemplo, en un tónico para la piel, una emulsión, una crema, una loción, un jabón, un limpiador facial, un agente de baño, agua de colonia, un aceite cosmético, una loción de protección solar, un polvo, una base, un perfume, una mascarilla, una crema para los ojos, una sombra de ojos, una máscara de pestañas, un delineador de ojos, un lápiz labial, una crema labial, un champú, un enjuague, un tinte para el cabello, un ungüento, un agente en crema, un líquido externo o similar.

En una realización de la presente invención, la preparación externa para la piel que contiene la composición que contiene ceramidas de la presente invención (que incluye cosméticos, productos farmacéuticos y cuasifármacos) puede contener varios componentes utilizados para preparaciones externas normales para la piel, por ejemplo, tensioactivos, agentes emolientes, agentes protectores del cabello, agentes humectantes, polímeros, absorbentes ultravioleta, agentes secuestrantes de metales, solventes, ajustadores de pH, vitaminas, antioxidantes, coadyuvantes antioxidantes, conservantes, fragancias, componentes oleosos, alcoholes superiores, ácidos grasos, lípidos polares, componentes antibacterianos,

modificadores de viscosidad, pigmentos y similares, siempre que no se vea afectada la acción de la composición que contiene ceramidas de la presente invención.

En una realización de la presente invención, la composición que contiene ceramidas de la presente invención se seca por pulverización, se seca por liofilización o se seca al vacío, y luego se forma en un polvo, un gránulo o una solución. De este modo, la composición que contiene ceramidas se puede incluir fácilmente en una preparación externa para la piel, alimentos o bebidas, un producto farmacéutico o similares.

En la presente especificación, se utiliza “o” cuando se puede emplear “al menos uno o más” de los ítems enumerados en el texto. Lo mismo se aplica a “o”. En la especificación, la frase “dentro de un rango” de “dos valores” significa un rango que incluye los mismos dos valores.

Las referencias tales como literatura científica, patentes, solicitudes de patente y similares citadas en la especificación se incorporan por referencia en la especificación en su totalidad en la misma medida en que cada una se describe específicamente en la presente.

La presente divulgación se ha descrito anteriormente con referencia a las realizaciones preferidas para facilitar su comprensión. De aquí en adelante, la presente divulgación se describirá sobre la base de ejemplos, pero la descripción anterior y los siguientes ejemplos se proporcionan solo con el propósito de la descripción y no con el propósito de limitar la presente divulgación. De acuerdo con lo anterior, el alcance de la presente divulgación no se limita a las realizaciones o ejemplos específicamente descritos en la especificación, sino que está limitado solo por las reivindicaciones.

Ejemplos

(Ejemplo 1: Especies moleculares de ceramidas en precipitado de vino)

Cincuenta gramos de precipitado de vino (Bitartrato) se lavaron con agua a 60 °C durante 1 hora para obtener un residuo. Este residuo se extrajo con etanol al 95 % a 40 °C durante 6 horas. Las especies moleculares de ceramidas en este extracto se compararon con las especies moleculares de ceramidas obtenidas de la soja de la misma manera en su formulación. Los resultados se muestran en la Fig. 1. Visto a partir de los resultados, la ceramida obtenida de la soja es solo una glucosilceramida y no incluye una ceramida libre, mientras que la ceramida obtenida del precipitado de vino incluye tanto una glucosilceramida como una ceramida libre. Como ceramida de soja, se utilizó una glucosilceramida pura derivada de la soja fabricada por Nagara Science Co., Ltd.

La Fig. 2 muestra los resultados de que se confirmaron las especies moleculares de ceramidas y la cantidad de las mismas contenidas en el extracto de precipitado de vino y en el vino mismo. A partir de este resultado, se encuentra que el vino en sí mismo no contiene ni una ceramida libre ni una glucosilceramida, pero el extracto obtenido del precipitado de vino contiene tanto una ceramida libre como una glucosilceramida.

(Ejemplo 2: Examen 1 de la etapa de lavado)

En el ejemplo, se examinó la etapa de lavado del precipitado de vino de la materia prima para obtener un extracto del precipitado de vino. La Fig. 3 muestra el método de producción del extracto de precipitado de vino (en la figura “Extracto de ceramida W”) examinado en el ejemplo. A la izquierda de la Fig. 3, el extracto de ceramida W se extrajo del precipitado de vino utilizando etanol al 95 % (60 °C, 6 h), y luego el extracto de ceramida W se extrajo del residuo utilizando etanol al 60 % (60 °C, 3 h). A la derecha de la Fig. 3, el precipitado de vino se lavó con etanol al 50 % (40 °C, 1 h), y luego se extrajo aún más el extracto de ceramida W del residuo lavado con etanol al 95 % (60 °C, 6 h). Los resultados se muestran en las Figs. 4 y 5. La Fig. 4 muestra el contenido (mg) de cada componente, y la Fig. 5 muestra la relación de cada componente.

Visto a partir de esta figura, cuando la extracción con etanol al 95 % es seguida por la extracción con etanol al 60 %, queda una gran cantidad de impurezas. Por otro lado, cuando el precipitado de vino se lavó primero con etanol al 50 % y posteriormente se sometió a extracción con etanol al 95 %, se redujeron las impurezas.

5 **(Ejemplo 3: Examen 2 de la etapa de lavado)**

En el Ejemplo 2, se encontró que el primer lavado del precipitado de vino puede eliminar más impurezas que la primera extracción con etanol. Posteriormente, se examinó la solución de lavado. En este ejemplo, el precipitado de vino se lavó utilizando agua, etanol al 10 %, etanol al 30 % o etanol al 50 % (todo a 40 °C durante 3 h), y luego se extrajo el extracto de ceramida W del residuo lavado utilizando etanol al 95 % (40 °C, 6 h) (Fig. 6). Los resultados se muestran en la Fig. 7.

Visto a partir de esta figura, el lavado con etanol al 50 % redujo significativamente las impurezas, pero también redujo la cantidad de ceramida y la cantidad de polifenol. A través del lavado con etanol al 50 %, el extracto de ceramida W obtenido no mostró color vino (no se muestra). Por otro lado, a través del lavado con agua, hubo una gran cantidad de impurezas en comparación con el lavado con etanol al 50 %, pero quedó una gran cantidad de ceramida y polifenol. Además, las impurezas se redujeron aún más en comparación con el lavado con etanol al 10 % o 30 %. A partir de lo anterior, se encontró que el agua es óptima como solución de lavado.

20 **(Ejemplo 4: Examen de la temperatura de lavado)**

En el Ejemplo 3, se encontró que el lavado con agua es óptimo. Posteriormente, se examinó la temperatura de lavado. En el ejemplo, el precipitado de vino se lavó con agua a 40 °C o 60 °C (ambos a 500 ml, 3 h), y luego se extrajo el extracto de ceramida W del residuo lavado utilizando etanol al 95 % (40 °C, 6 h) (Fig. 8). Los resultados se muestran en la Fig. 9.

25 Visto a partir de esta figura, cuando el lavado se realizó a 60 °C, las impurezas (en la figura, indicadas con "otros") se redujeron significativamente en comparación con el lavado a 40 °C.

(Ejemplo 5: Examen del tiempo de lavado)

En el Ejemplo 4, se encontró que la temperatura óptima es de 60 °C cuando el precipitado de vino se lavó con agua. Posteriormente, se examinó el tiempo de lavado. En este ejemplo, el precipitado de vino se lavó durante 30 minutos, 60 minutos y 180 minutos (tanto a 500 ml como a 60 °C), y luego se extrajo el extracto de ceramida W del residuo lavado utilizando etanol al 95 % (40 °C, 6 h) (Fig. 10). Los resultados se muestran en la Fig. 11.

Visto a partir de esta figura, las impurezas se eliminaron más cuando el lavado se realizó con agua durante 30 minutos. Por otro lado, cuando se realizó el lavado con agua durante 60 minutos, la glucosilceramida y la ceramida libre se contuvieron en la mayor relación mientras que las impurezas se eliminaron. A partir de lo anterior, se encontró que el tiempo óptimo de lavado es de 60 minutos.

(Ejemplo 6: Examen de la cantidad de adición de agua)

En los Ejemplos 4 y 5, se encontró que el precipitado del vino se lava de manera óptima con agua a 60 °C durante 60 minutos. Posteriormente, se examinó la cantidad de adición de agua durante el lavado. En el ejemplo, se lavaron 50 g, 60 g o 75 g de precipitado de vino con 500 ml de agua (10 veces la adición de agua, 8.3 veces la adición de agua y 6.7 veces la adición de agua, respectivamente, y cada una durante 1 h a 60 °C), y luego se extrajo el extracto de ceramida W del residuo lavado utilizando etanol al 95 % (40 °C, 6 h) (Fig. 12). Los resultados se muestran en la Fig. 13.

Visto a partir de esta figura, el lavado con 10 veces la adición de agua (50 g de precipitado de vino, 500 ml de agua) redujo significativamente las impurezas (en la figura, indicada con “otros”), en comparación con el lavado con 8.3 veces la adición de agua (60 g de precipitado de vino, 500 ml de agua) y el lavado con 6.7 veces la adición de agua (75 g de precipitado de vino, 500 ml de agua).

(Ejemplo 7: Examen del ajuste del pH)

Los ejemplos 2 a 6 demostraron que era óptimo lavar el precipitado de vino con agua en 10 veces la adición de agua a 60 °C durante 60 minutos cuando se obtuvo un extracto de ceramidas del precipitado de vino. Posteriormente, se examinó el pH del extracto de ceramida W obtenido a través de la extracción con etanol. En el ejemplo, el extracto de ceramida W obtenido por extracción con etanol se agregó con ácido tartárico, ácido cítrico o carbonato de sodio, se agregó además con un excipiente (ciclodextrina) y luego se liofilizó para obtener un polvo. Se comprobó el color del polvo (Fig. 14). Los resultados se muestran en la Fig. 15.

Visto en la Fig. 15, se encontró que el ajuste del pH del extracto permite que el polvo se ajuste para tener un color deseable. En particular, cuando el pH se ajustó a 4.0 o 3.5 con ácido cítrico o ácido tartárico, se obtuvo con éxito un polvo de color vino.

(Ejemplo 8: Prueba de proliferación celular)

Con el fin de examinar el efecto de proliferación celular de la composición que contiene ceramidas de la presente invención, se realizó una prueba de proliferación celular utilizando células epidérmicas humanas (células HaCaT). Las células epidérmicas humanas (células HaCaT) se sembraron en una placa de 96 pocillos, y 24 horas después de la siembra, se cultivaron en un medio que contenía los extractos de ceramidas con diferentes concentraciones que se obtuvieron del precipitado de vino. La proliferación celular se midió después de tres horas de cultivo. La proliferación celular se midió utilizando el Kit Cell Counting 8 (fabricado por DOJINDO LABORATORIES). Los resultados se muestran en la Fig. 16.

Por lo tanto, se encontró que el extracto de ceramida obtenido del precipitado de vino promueve la proliferación celular en las células de los queratinocitos (células HaCaT) (ver el grupo de adición de 0.01 a 1 µg/ml en la Fig. 16).

(Ejemplo 9: Medición de la cantidad de resveratrol)

En el ejemplo, se midió la cantidad de resveratrol en la composición que contiene ceramidas de la presente invención. El resveratrol es un tipo de polifenol que tiene una acción antioxidante, y se conoce como un componente contenido en el vino tinto. Al tomar resveratrol, se esperan efectos como prevenir la oxidación celular y mejorar la elasticidad de la piel. En el ejemplo, la cantidad de resveratrol contenida en el vino tinto, el precipitado de vino (cristal de vino) y la composición que contiene ceramidas (ceramida de vino) se midió mediante HPLC. Los resultados se muestran en la Fig. 17.

Como es evidente a partir de esta figura, se encuentra que la cantidad de resveratrol contenida en la composición que contiene ceramida (ceramida de vino) de la presente invención se incrementa significativamente en comparación con la cantidad de resveratrol contenida en el vino tinto o en el precipitado de vino (cristal de vino).

(Ejemplo 10: Efecto de la potenciación de la expresión de varios marcadores genéticos por la ceramida del vino)

Se sembró una estirpe celular de queratinocitos humanos (HaCaT) con un número de células de 1×10^5 células/pocillo en una placa de 12 pocillos y se cultivó en un medio DMEM que contenía FBS al 10 % (37 °C, CO₂ al 5 %). Después de cultivarse durante la noche, las células

se cultivaron durante 72 horas en un medio DMEM (libre de FBS) al que se le agregó la ceramida de vino disuelta en DMSO y ceramidas derivadas de otras materias primas (Tabla 1) a una concentración predeterminada (la concentración final de DMSO fue de 0.1 %). Como ceramidas derivadas de otras materias primas, se utilizaron las compradas a cada fabricante que se muestra en la Tabla 1. La ceramida del vino se extrajo por el método óptimo (lavado con agua en 10 veces adición de agua a 60 °C durante 60 min, y extracción con etanol al 95 % a 40 °C durante 6 h), que se muestra en los Ejemplos 2 a 6.

[Tabla 1]

Concentración de cada muestra de ceramida agregada

	Cada materia prima agregada	Glucosilceramida agregada	Ceramida libre agregada	Relación de concentración de glucosil/ceramida libre en la materia prima	Fabricante
	µg/ml	µg/ml	µg/ml		
Ceramida de vino	1.0	0.0075	0.035	Glucosil al 7.5 % Libre al 3.5 %	Pharma Foods International. Co., Ltd.
Ceramida de arroz	1.1	0.11	-	Glucosil al 10 %	Oryza oil % Fat Chemicals Co., Ltd
Ceramida de pino	2.7	0.11	-	Glucosil al 4 %	MARUZEN PHARMACEUTICALS CO., LTD.
Ceramida de konjac	3.7	0.11	-	Glucosil al 3 %	Daicel Corporation

Se utilizó como control un medio DMEM (libre de FBS) al que se le agregó DMSO en una concentración final del 0.1 %. Después de 72 horas de cultivo, se recuperó ARNm de las células para generar ADNc. Esto se utilizó para medir la expresión de ARNm para cada marcador mediante qPCR. Los marcadores evaluados son los siguientes.

- Marcador de diferenciación; Pro-Filaggrina, Loricrina
- Marcador de la vía de síntesis de ceramidas; Serina-Palmitoil Transferasa

Los resultados se muestran en las Fig. 18 a 21. Como se muestra en la Fig. 18, en comparación con el control, la ceramida de vino aumentó la cantidad de expresión de ARNm para Pro-Filaggrina (una proteína que forma el estrato córneo de la piel y sirve como materia prima de un factor humectante natural (NMF)), y Loricrina (una proteína que sirve como marco para formar normalmente el estrato córneo) como marcadores de diferenciación. Esto muestra que la ceramida del vino promueve la diferenciación de los queratinocitos.

Además, como se muestra en la Fig. 19, en comparación con el control, la ceramida de vino aumentó la cantidad de expresión de ARNm para SPT: Serina-Palmitoil Transferasa (enzima para la vía de síntesis de ceramidas de novo), que es un marcador de la vía de síntesis de ceramidas. Como resultado, se encuentra que la ceramida del vino promueve la vía de síntesis de ceramidas.

Además, la Fig. 20 muestra la cantidad de expresión de ARNm para Pro-Filaggrina y la cantidad de expresión de ARNm para SPT en comparación entre la ceramida de vino de la

presente invención, la glucosilceramida y la ceramida libre. Se calculó que la cantidad de adición de la glucosilceramida y la ceramida libre era la misma cantidad que la glucosilceramida y la ceramida libre contenidas en la ceramida del vino. Específicamente, se utilizaron la ceramida de vino: 1 µg/ml, la glucosilceramida: 0.075 µg/ml, y la ceramida libre: 0.035 µg/ml. Al igual que la glucosilceramida y la ceramida libre, se utilizaron los aislados de la ceramida de vino. Visto a partir de esta figura, la ceramida del vino tiene un mayor efecto de aumento de la cantidad de expresión de ARNm para cada uno que solo la glucosilceramida o solo la ceramida libre.

Además, la Fig. 21 muestra la cantidad de expresión de ARNm para Pro-Filaggrina y la cantidad de expresión de ARNm para SPT en comparación entre la ceramida de vino de la presente invención y cada ceramida obtenida de materias primas distintas del vino (ceramida de arroz, ceramida de pino y ceramida de konjac). La formulación de cada ceramida es la como se muestra en la Tabla 1. Visto a partir de esta figura, la ceramida del vino tiene un mayor efecto de aumento de la cantidad de expresión de ARNm para cada uno que el de solo la ceramida de arroz o solo la ceramida de pino.

(Ejemplo 11: Efecto de la ceramida del vino sobre los queratinocitos)

La eficacia de la ceramida de vino se evaluó en un queratinocito primario cultivado en 3D utilizando un transpocillo. Como ceramida de vino, se utilizó la misma que en el Ejemplo 10. Se agregó un medio que contenía la ceramida del vino a cada uno de los lados de la capa córnea (pocillo superior) y del lado de la membrana basal (pocillo inferior) del transpocillo durante un tiempo predeterminado, y se cultivaron las células. Como un grupo control, las células se cultivaron en un medio que contenía 0.1 % de DMSO. Después del cultivo en cada medio, se prepararon secciones congeladas de los queratinocitos cultivados primarios cultivados en 3D, y se realizó la tinción de hematoxilina y eosina y la inmunotinción utilizando un anticuerpo anti-ceramida.

Las secciones teñidas con hematoxilina y eosina se observaron bajo un microscopio de contraste de fase, y los resultados de la medición del grosor de la capa epidérmica se muestran en la Fig. 22. Visto a partir de este resultado, el grosor de la piel se incrementó con el tratamiento con ceramidas de vino. Se sabe que el grosor de la piel se vuelve más delgado a medida que el recambio de la piel disminuye con el envejecimiento. Se considera que el resultado indica que el aumento y diferenciación de los queratinocitos fue promovido por el tratamiento con la ceramida de vino, y también se promovió el recambio de la piel.

Además, se observaron las secciones inmunoteñidas con un anticuerpo anti-ceramida bajo un microscopio de fluorescencia, y se midió el contenido de ceramidas en la capa epidérmica. El resultado se muestra en la Fig. 23. A partir de los resultados, en comparación con el grupo control, la parte inmunoteñida se agrandó y la cantidad de ceramida aumentó en los queratinocitos cultivados en 3D tratados con la ceramida de vino. Como se muestra en el Ejemplo 10, la cantidad de expresión de ARNm para el marcador de la vía de síntesis de ceramidas (SPT) aumentó en el cultivo plano (cultivo 2D), lo que indica que el aumento en la cantidad de ceramida en el ejemplo no solo se debe a la ceramida incorporada, sino también al aumento de la ceramida recién sintetizada.

(Nota)

Aunque la presente divulgación se ha descrito utilizando las realizaciones preferidas de la presente divulgación como se ha indicado anteriormente, se entiende que el alcance de la presente divulgación se debe interpretar únicamente por las reivindicaciones. Queda entendido que las patentes, las solicitudes de patente y otros documentos citados en la especificación se deben incorporar por referencia en la especificación como si su contenido se describiera específicamente en la especificación. La presente solicitud reivindica prioridad a la Solicitud de Patente Japonesa No. 2021-169620 presentada el 15 de octubre de 2021 y

a la Solicitud de Patente Japonesa No. 2022-94514 presentada el 10 de junio de 2022 en la Oficina Japonesa de Patentes, cuyo contenido se incorpora por referencia como si todo el contenido constituyera el contenido de la presente solicitud.

Aplicabilidad industrial

- 5 De acuerdo con la presente invención, es posible proporcionar una composición que contiene ceramidas derivada de la torta de fermentación de vino. Además, de acuerdo con el método de la presente invención, es posible extraer de forma estable una composición de ceramidas de la torta de fermentación de vino como materia prima mientras se eliminan las impurezas, y controlar el color de la composición de ceramidas. Además, la composición de ceramidas de
- 10 la presente invención contiene una ceramida libre y utiliza torta de fermentación de vino, un material natural altamente seguro. La composición es excelente en seguridad sin afectar negativamente al cuerpo humano, incluso cuando se mezcla con alimentos funcionales, cosméticos y similares. Por lo tanto, la composición es útil en los campos de cosméticos, farmacéuticos, cuasifármacos y similares.

15

REIVINDICACIONES

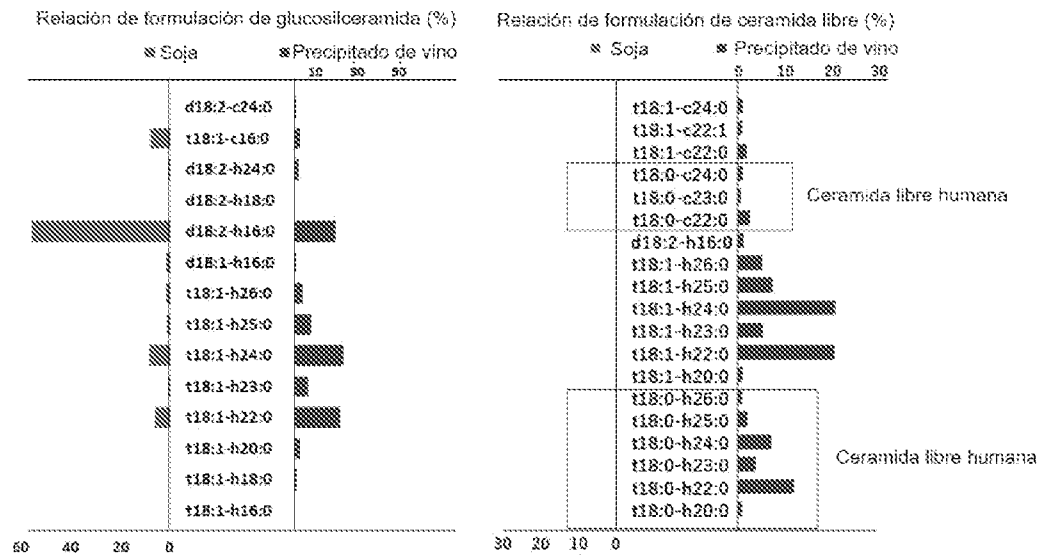
1. Una composición cosmética y/u oral que incluye un polifenol y una ceramida.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la ceramida incluye una ceramida libre y una glucosilceramida.
- 5 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la composición contiene una ceramida libre en al menos aproximadamente 1 % en peso.
4. La composición de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en la que la composición contiene una glucosilceramida en al menos aproximadamente 1 % en peso.
- 10 5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición contiene un polifenol en al menos aproximadamente 1 % en peso.
6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición contiene una ceramida libre, una glucosilceramida, y un polifenol en una relación en peso de aproximadamente 0.7 a aproximadamente 2.4: aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.4 a aproximadamente 11.0.
- 15 7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición contiene una ceramida libre, una glucosilceramida, y un polifenol en una relación en peso de aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.0.
8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición tiene un pH de menos de aproximadamente 5.
- 20 9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que contiene resveratrol en al menos aproximadamente 10 mg por aproximadamente 100 g del mismo.
10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la composición es para alimentos.
11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la composición es para cosméticos.
- 25 12. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el polifenol y la ceramida se derivan de torta de fermentación de vino.
13. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la composición es para promover la diferenciación de queratinocitos.
- 30 14. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que la composición es para promover la síntesis de una ceramida.
15. Una composición que contiene ceramidas derivada de torta de fermentación de vino.
16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la composición que contiene ceramidas contiene una ceramida libre en al menos aproximadamente 1 % en peso.
- 35 17. La composición de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, en la que la composición que contiene ceramidas contiene una glucosilceramida en al menos aproximadamente 1 % en peso.
18. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en la que la composición que contiene ceramidas contiene un polifenol en al menos aproximadamente 1 % en peso.
- 40

19. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en la que la composición contiene una ceramida libre, una glucosilceramida, y un polifenol en una relación en peso de aproximadamente 0.7 a aproximadamente 2.4: aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.4 a aproximadamente 11.0.
- 5 20. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en la que la composición que contiene ceramidas contiene una ceramida libre, una glucosilceramida, y un polifenol en una relación en peso de aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.0: aproximadamente 1.0.
- 10 21. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en la que la composición que contiene ceramidas tiene un pH de menos de aproximadamente 5.
22. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, que contiene resveratrol en al menos aproximadamente 10 mg por aproximadamente 100 g del mismo.
- 15 23. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, en la que la composición es para alimentos.
24. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22, en la que la composición es para cosméticos.
25. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24, en la que la composición es para promover la diferenciación de queratinocitos.
- 20 26. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24, en la que la composición es para promover la síntesis de una ceramida.
27. Un método para producir una composición que contiene ceramidas, el método comprende:
una etapa de lavar la torta de fermentación de vino; y
una etapa de extraer un residuo obtenido mediante el lavado con un solvente polar.
- 25 28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el solvente polar incluye etanol.
29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el etanol tiene una concentración de aproximadamente 95 %.
30. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en el que la etapa de lavado se realiza con agua.
- 30 31. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30, que comprende además una etapa de realizar un ajuste de pH para un extracto obtenido en la etapa de extracción.
32. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en el que el ajuste de pH se realiza con ácido tartárico o ácido cítrico.

35

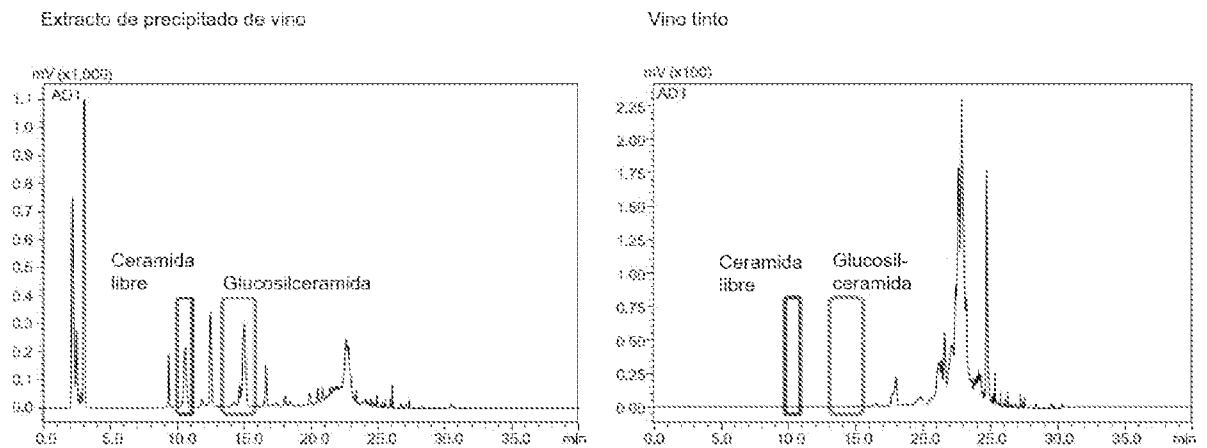
[FIG. 1]

Especies moleculares de ceramida en precipitado de vino

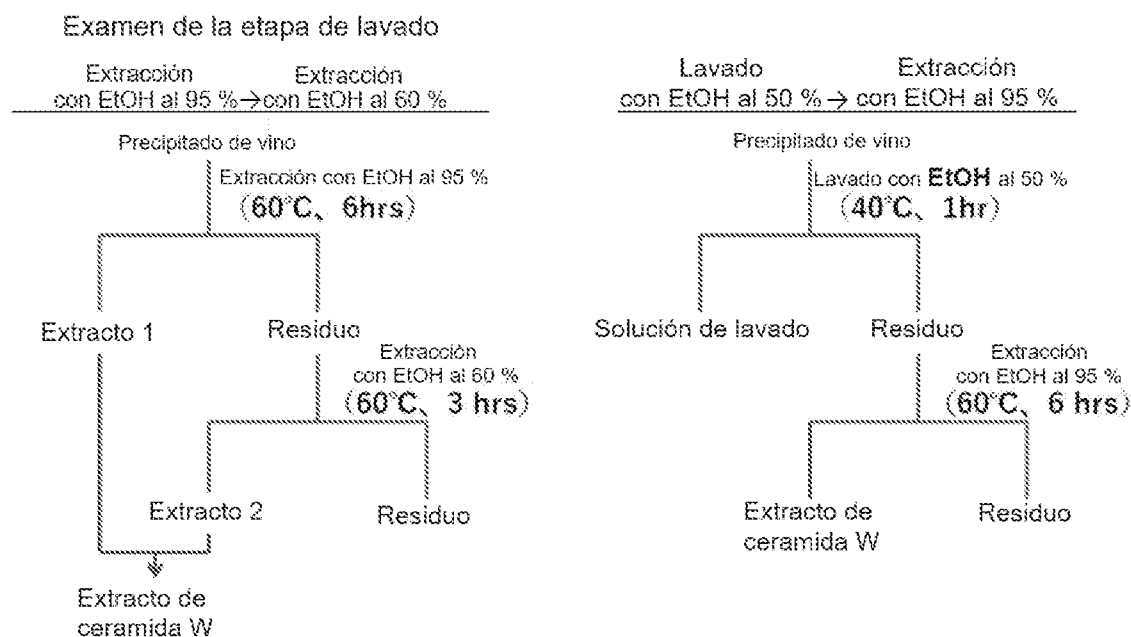


[FIG. 2]

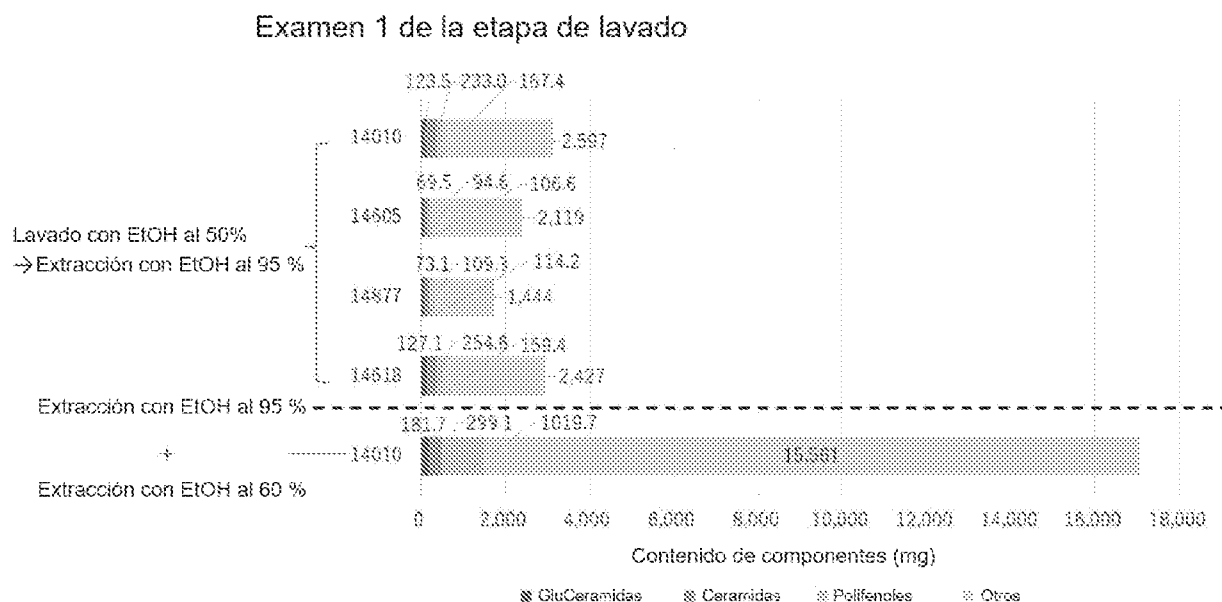
Cantidad de ceramida en vino tinto/extracto de precipitado de vino



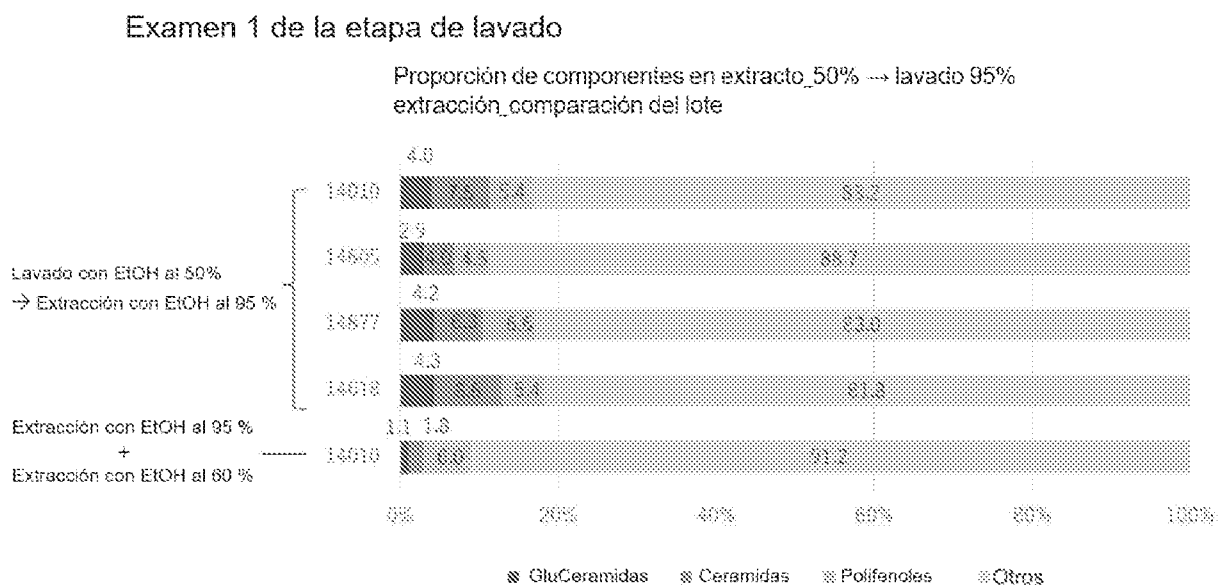
[FIG. 3]



[FIG. 4]

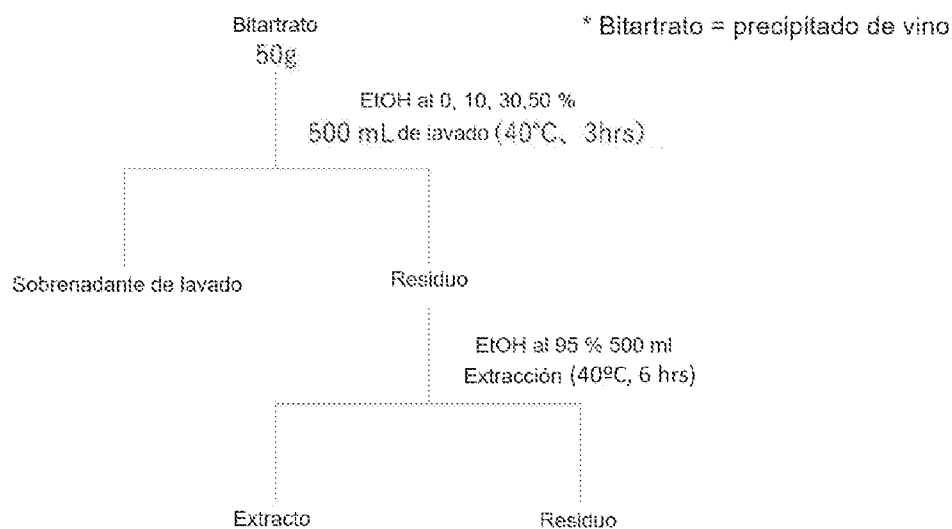


[FIG. 5]



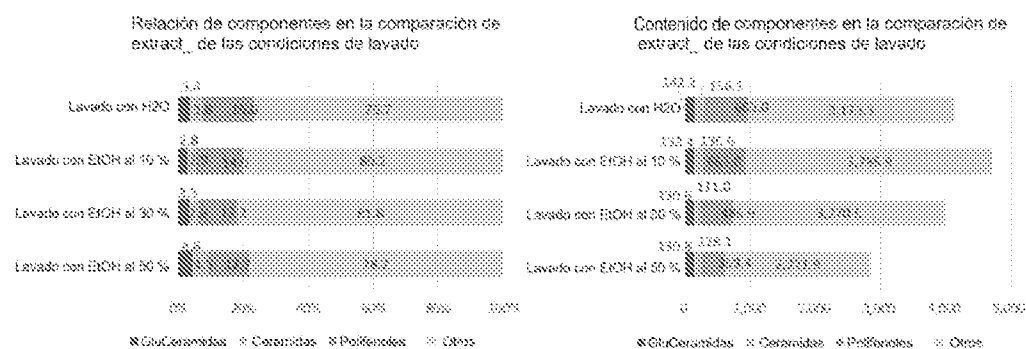
[FIG. 6]

Examen de la etapa de lavado; solución de lavado (agua o EtOH)



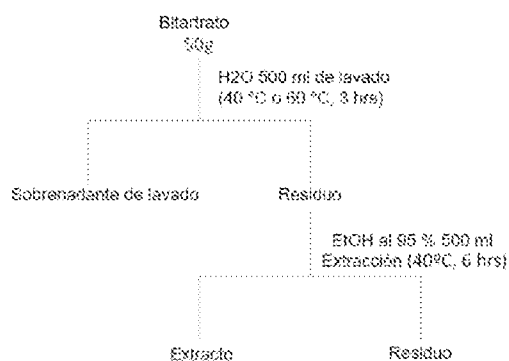
[FIG. 7]

Examen de las condiciones de lavado; solución de lavado (agua o EtOH)



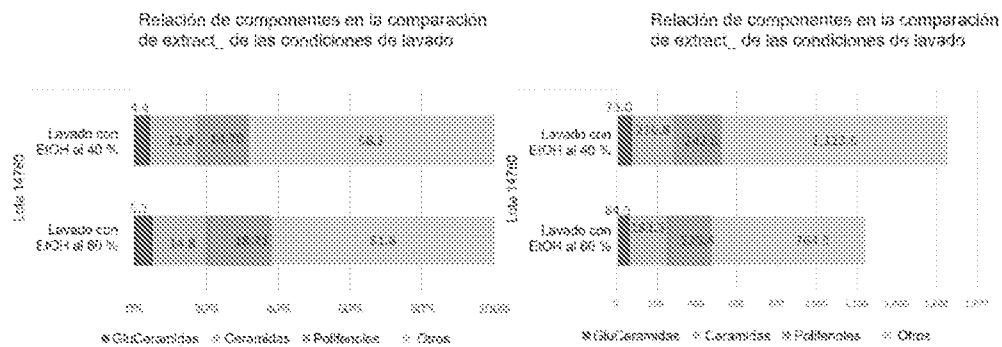
[FIG. 8]

Examen de las condiciones de lavado;
temperatura de lavado (40 °C, 60 °C)



[FIG. 9]

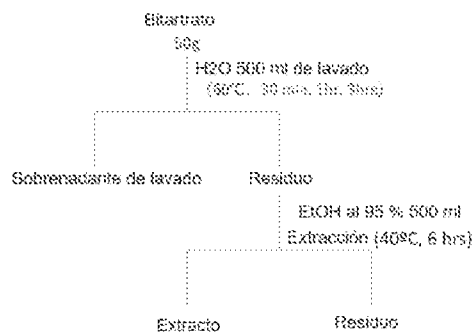
Examen de las condiciones de lavado; temperatura de lavado (40 °C, 60 °C)



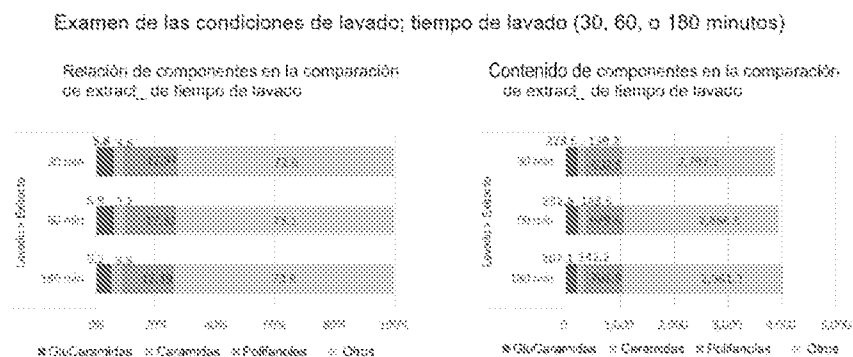
[FIG. 10]

Examen de las condiciones de lavado;
tiempo de lavado (30, 60, o 180 minutos)

Lavado con H₂O → 95 % extracción con EtOH

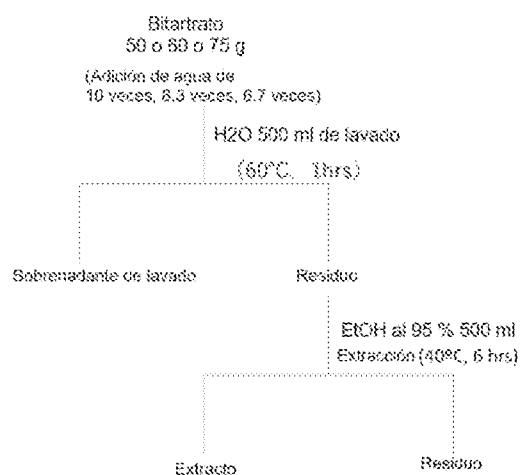


[FIG. 11]



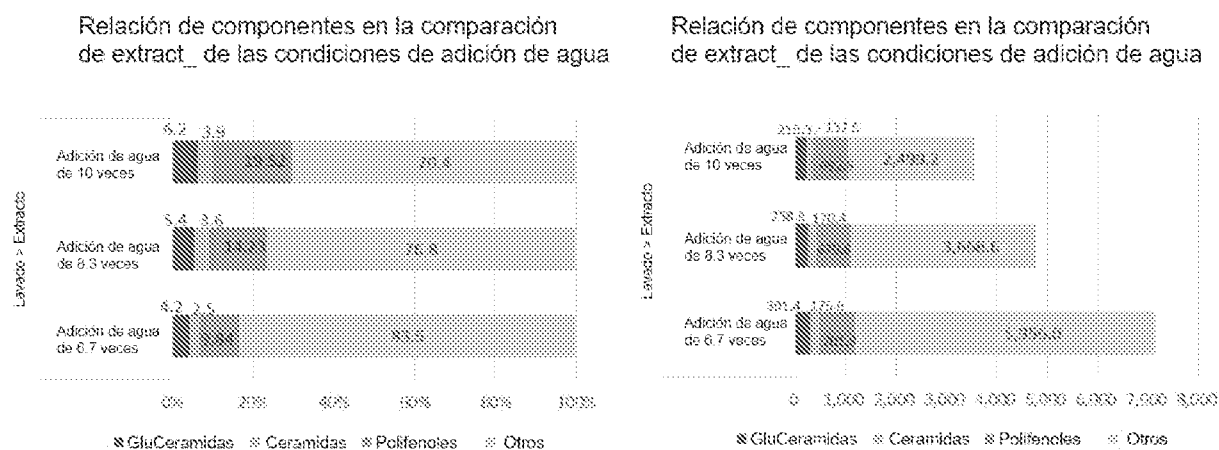
[FIG. 12]

Examen de las condiciones de lavado; cantidad de adición de agua



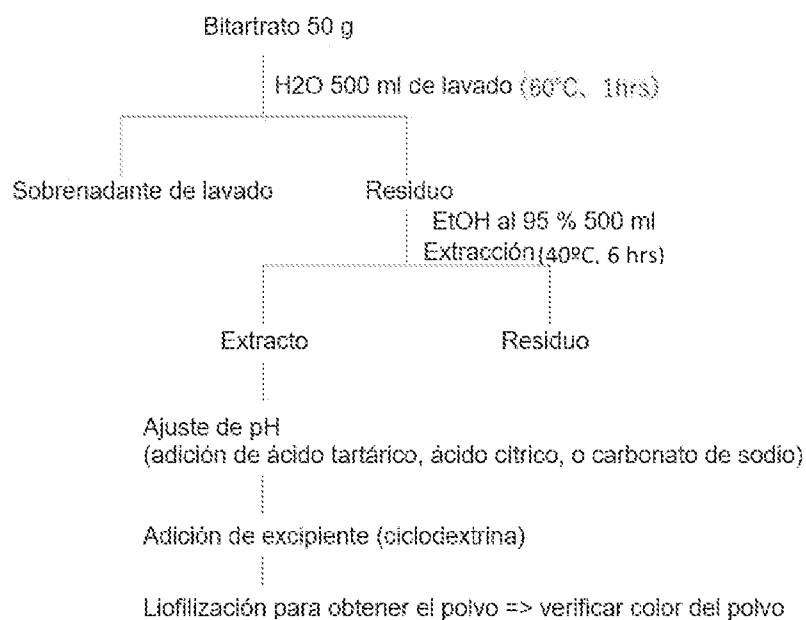
[FIG. 13]

Examen de las condiciones de lavado; cantidad de adición de agua

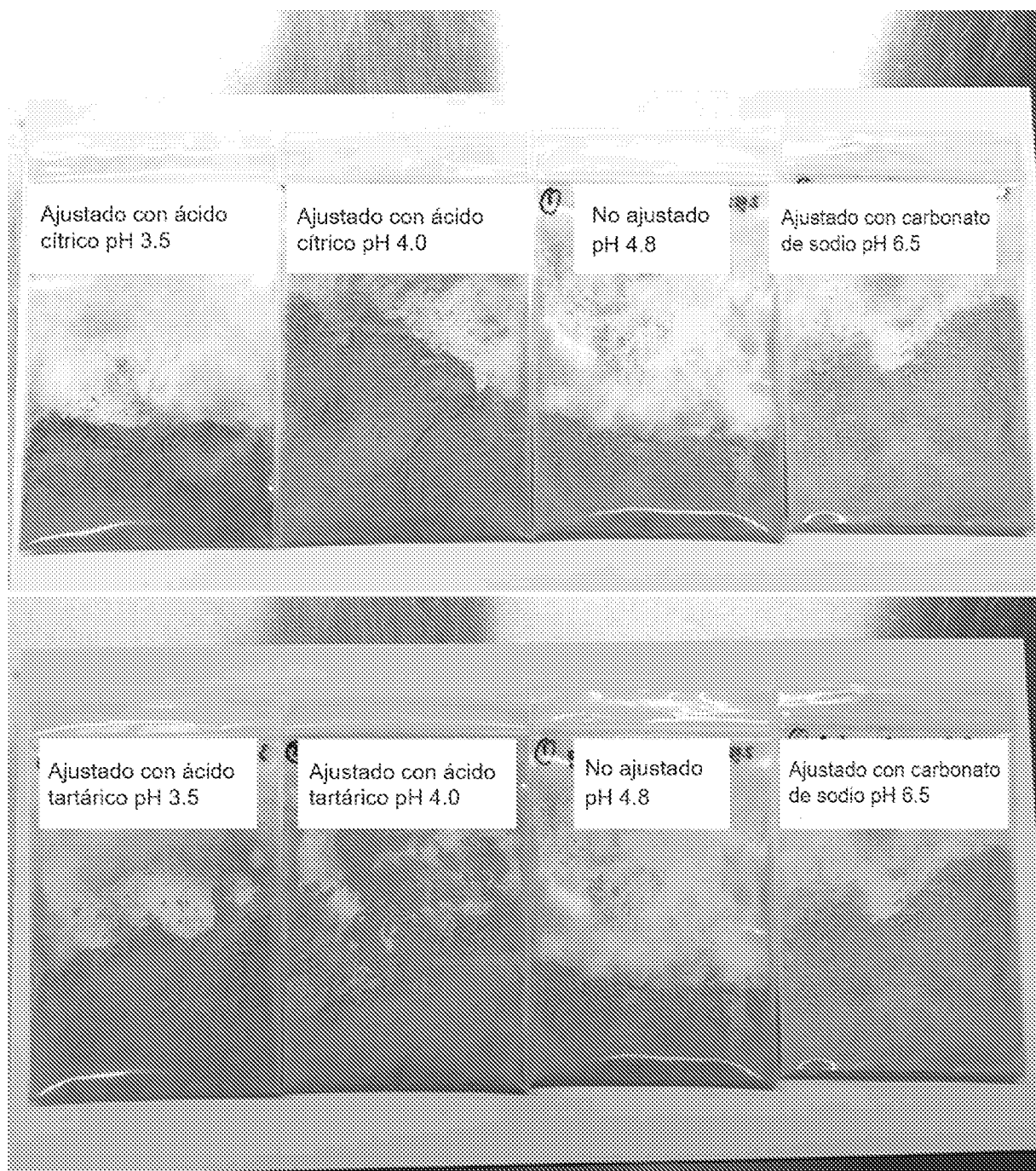


[FIG. 14]

Examen del ajuste de pH

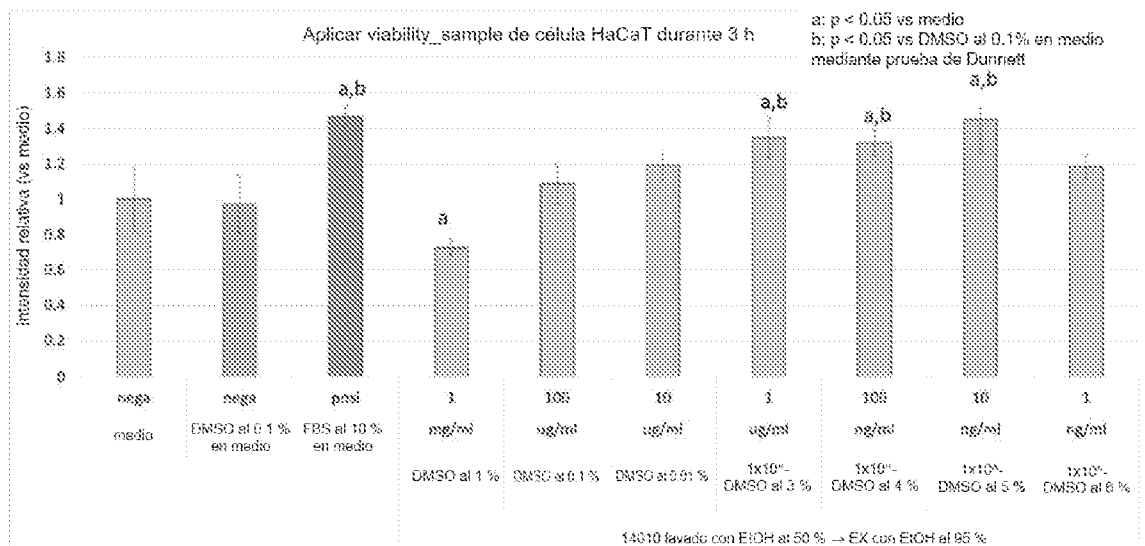


[FIG. 15]



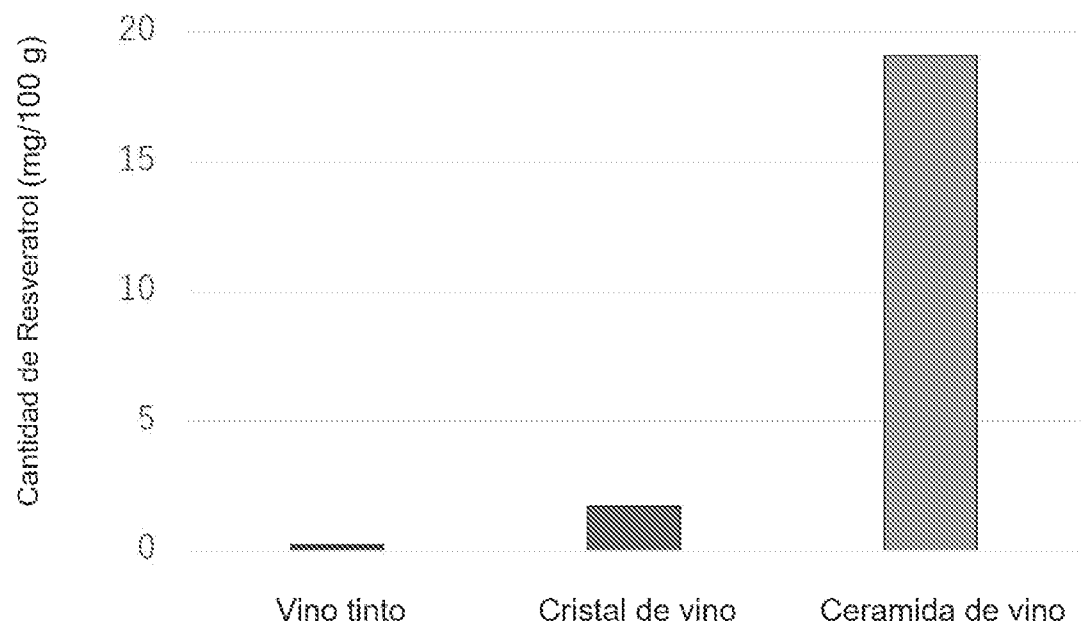
[FIG. 16]

Prueba de proliferación celular de ceramida W

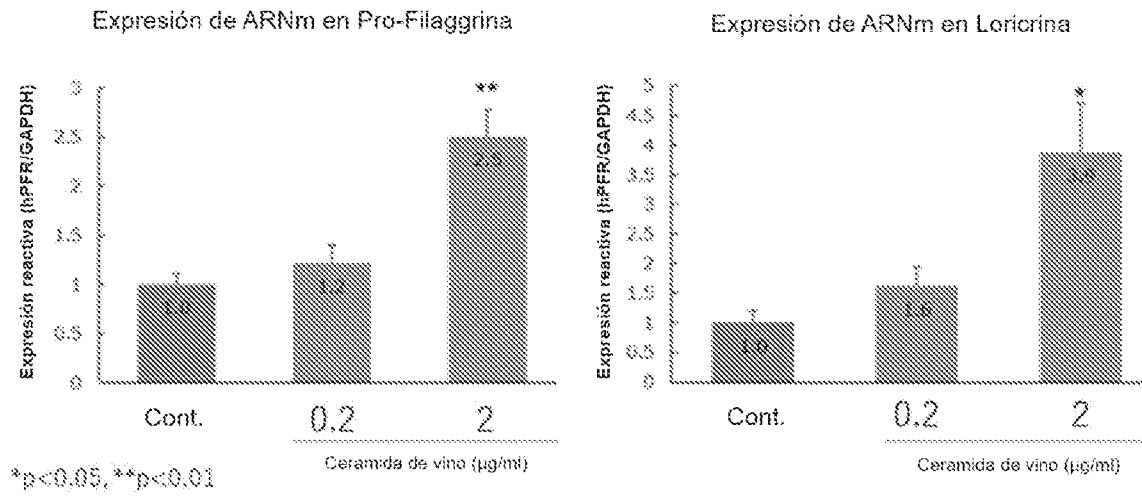


[FIG. 17]

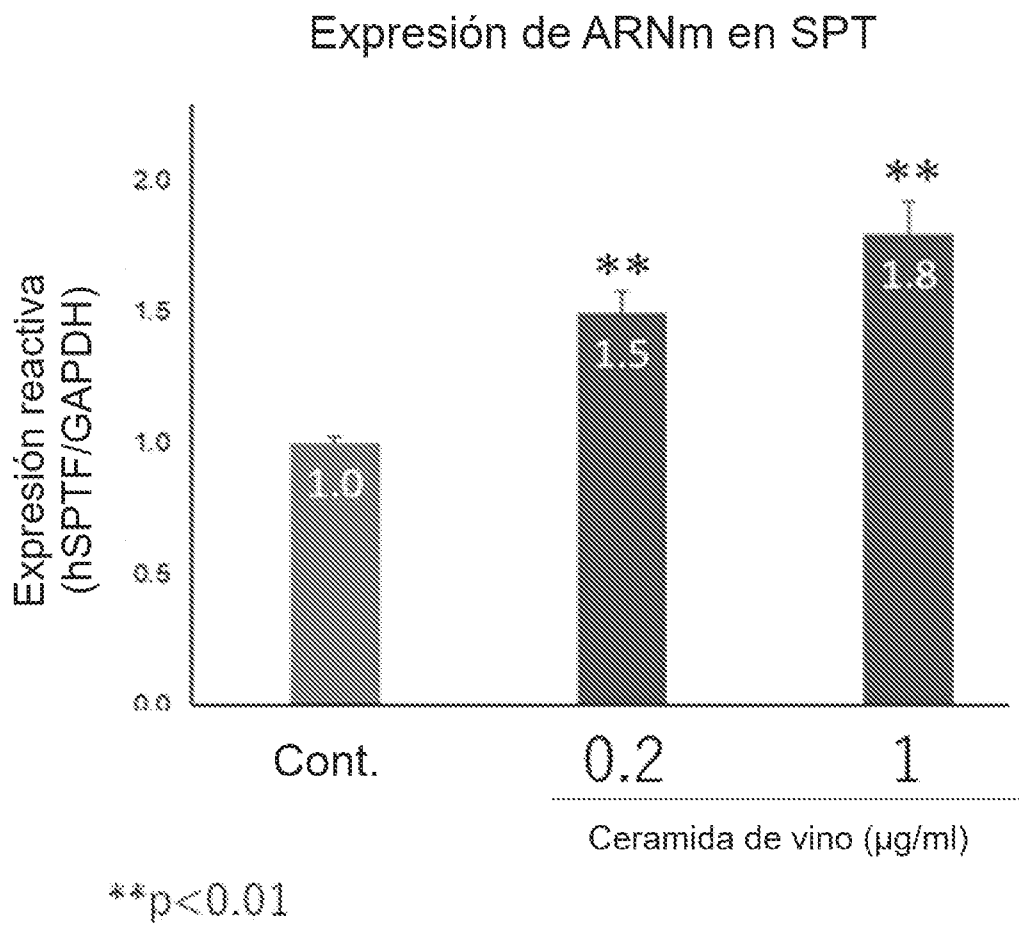
Ceramida de vino; contenido de resveratrol



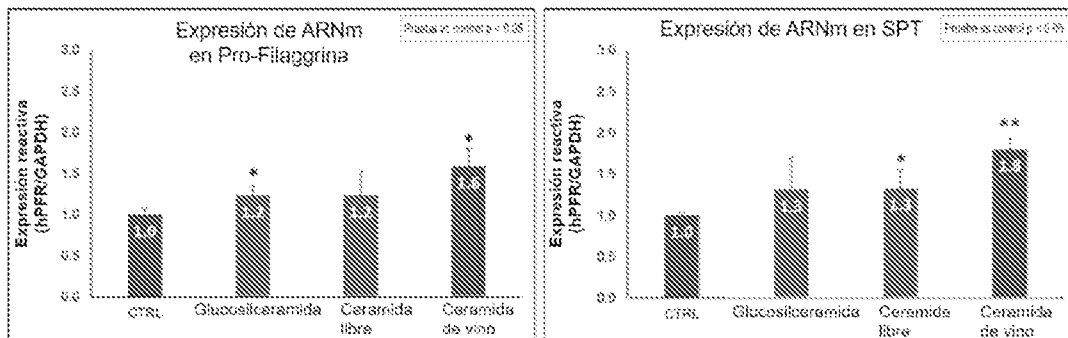
[FIG. 18]



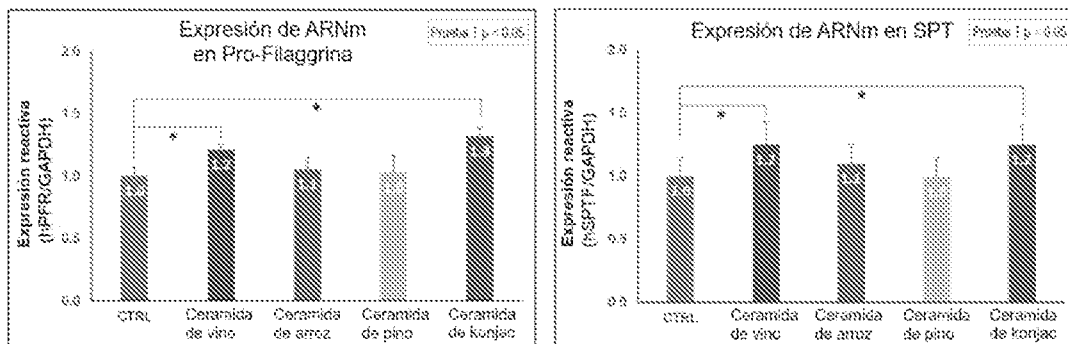
[FIG. 19]



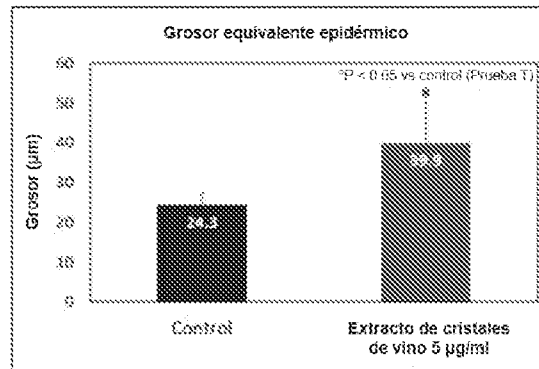
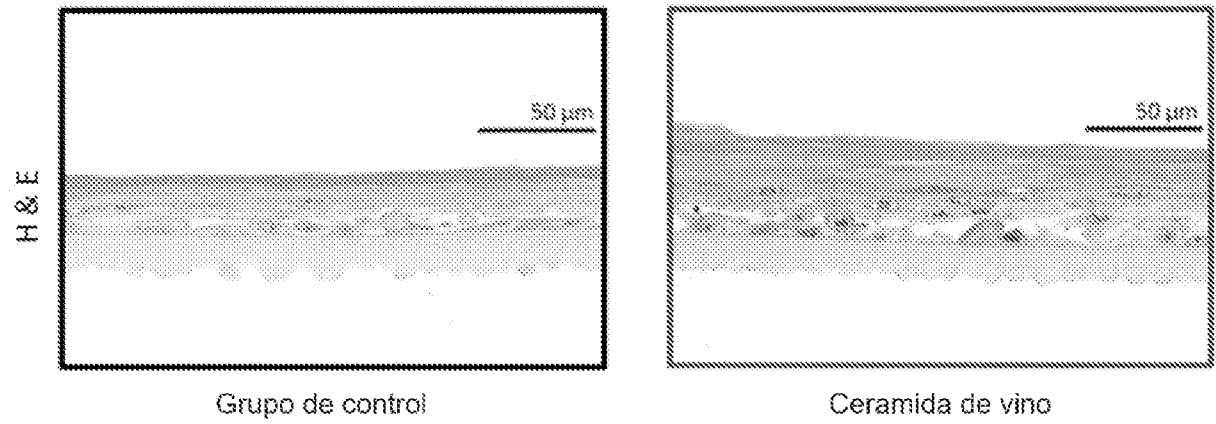
[FIG. 20]



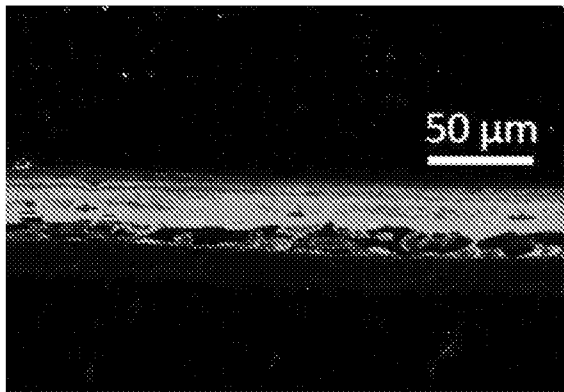
[FIG. 21]



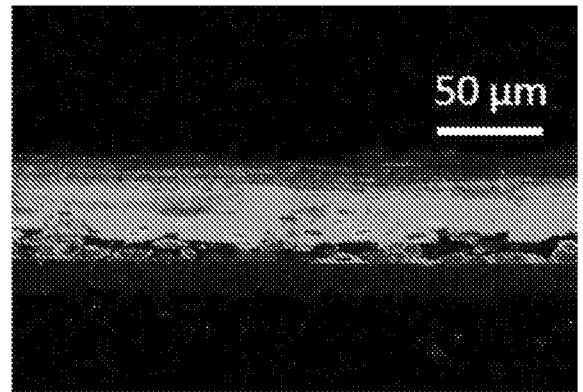
[FIG. 22]



[FIG. 23]



Grupo de control



Cerámica de vino

