

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 939**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 8/98 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61P 17/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2018 PCT/KR2018/007369**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2019 WO19004757**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2018 E 18822756 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2023 EP 3646877**

54 Título: **Composición que comprende un exosoma derivado de células madre como ingrediente eficaz para su utilización en la prevención o alivio de prurito**

30 Prioridad:

30.06.2017 KR 20170083508

02.06.2018 KR 20180063921

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

17.04.2024

73 Titular/es:

EXOCOBIO INC. (100.0%)

**Suite 306, 19 Gasan digital 1-ro, Geumcheon-gu
Seoul 08594, KR**

72 Inventor/es:

**YI, YONG WEON y
CHO, BYONG SEUNG**

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 965 939 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

Composición que comprende un exosoma derivado de células madre como ingrediente eficaz para su utilización en la prevención o alivio de prurito

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a una composición que incluye exosomas derivados de células madre como principio activo para su utilización en la prevención, supresión, alivio, mejora o tratamiento del prurito inducido por la linfopoyetina estromal tímica (TSLP, *thymic stromal lymphopoietin*).

[0002] Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o un preparado externa para la piel que incluye exosomas derivados de células madre para su utilización en la prevención, supresión, alivio, mejora o tratamiento del prurito inducido por linfopoyetina estromal tímica (TSLP).

[0003] Además, la presente invención se refiere a una tecnología clínica y comercialmente relevante capaz de obtener una gran cantidad de exosomas derivados de células madre que son clínicamente aplicables para la prevención, supresión, alivio, mejora y tratamiento del prurito y tienen una alta pureza y una distribución uniforme del tamaño de partícula, en la que la tecnología puede proporcionar una composición para su utilización de la presente invención, teniendo los exosomas derivados de células madre obtenidos una excelente actividad funcional, en grandes cantidades a bajo coste.

TÉCNICA ANTERIOR

[0004] El picor o prurito es un síntoma caracterizado porque el picor en sí se considera una enfermedad. El prurito es un síntoma desagradable que aparece en diversas afecciones y trastornos. En particular, es un síntoma que se puede encontrar a menudo en enfermedades de la piel y enfermedades sistémicas. El prurito es una sensación que suele presentarse en la mayoría de enfermedades de la piel con dolor, y se define clínicamente como una sensación desagradable que provoca el deseo de rascarse o frotarse la piel.

[0005] Rascarse la piel debido al prurito provoca heridas y provoca infección bacteriana e inflamación. Debido a dicha infección e inflamación bacteriana, las células inmunes, tales como las células T y los macrófagos se activan y se secretan diversas citocinas, lo que exacerba aún más el prurito. Los pacientes con prurito se rasan la zona afectada de forma consciente o inconsciente. Cuando se rasca o frota intensamente la zona afectada, los rasguños pueden seguir siendo severos o pueden aparecer diversos efectos secundarios, tales como eritema, grietas, úlcera, urticaria o pigmentación.

[0006] Las causas conocidas de prurito incluyen causas dermatológicas, causas sistémicas, causas neuropáticas y causas psicógenas. Además, el prurito puede ser causado o empeorado por diversos estímulos, incluidos factores físicos, mecánicos, químicos o biológicos. Por ejemplo, el prurito puede ser causado por desencadenantes ambientales, incluido el clima, partículas, detergentes, infecciones cutáneas fúngicas o bacterianas, picaduras de insectos e invasores del cuerpo; enfermedades, incluidas diabetes, uremia, atresia biliar, tumores malignos, enfermedades hepáticas, insuficiencia renal, gota, enfermedades de la tiroides, trastornos sanguíneos, deficiencia de hierro, parasitosis delirantes, policitemia rubra vera, colestasis y enfermedad de Hodgkin; factores farmacéuticos o psicógenos. Se cree que la sensación de picazón se produce porque un estímulo de picazón actúa sobre las terminaciones nerviosas que responden a la estimulación múltiple (receptores de picazón) presentes en la interfaz epidérmica-dermis y el impulso resultante llega al tálamo espinal, el tálamo y la corteza cerebral en este orden (Miyachi Yoshiki, Approach to the Treatment of Skin Pruritus, pág. 22, 1996, Sendan Igakusha).

[0007] El prurito se clasifica por causas en: 1) prurito paroxístico que se presenta de forma paroxística; 2) prurito cutáneo que incluye prurito inercial, picazón anal (prurito anal), prurito vulvar (picazón en la vulva), tiña inguinal (tinea cruris), prurito acuagénico y prurito del cuero cabelludo; 3) prurito asociado con enfermedades internas, incluido prurito colestásico, insuficiencia renal crónica, tumores malignos, anemia por deficiencia de hierro, policitemia rubra vera, hipertiroidismo, hipotiroidismo, diabetes y síndrome de inmunodeficiencia adquirida; 4) prurito asociado con trastornos mentales de la piel, incluidos liquen simple crónico, prurigo, tricotilomanía, rasguños nerviosos, trastornos del comportamiento que afectan la piel y parasitosis delirantes; y 5) prurito nasal y picazón de garganta asociados con gripe o similares, prurito ocular asociado con enfermedades oculares, tales como conjuntivitis, prurito oral asociado con enfermedades dentales, etc.

[0008] Según los resultados de las investigaciones reportadas hasta la fecha, se sabe que los mediadores del prurito provocan prurito en diversas enfermedades de la piel. En concreto, se sabe que diversas citocinas (IL-4, IL-13, IL-31, etc.) e histaminas secretadas por las células inmunitarias (células T, macrófagos, etc.) provocan prurito. Además, en los últimos años se ha sabido que la TSLP (linfopoyetina estromal tímica) se asocia con la gravedad de la dermatitis y provoca síntomas de picazón (Wilson SR et al., The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP enable neurons to induce itch. Cell. 2013; 155(2):285-95).

[0009] Según el Portal Nacional de Información Médica sobre Salud (<http://health.mw.go.kr>), se sabe que los mediadores que inducen el prurito incluyen histaminas, serotonina, prostaglandina E, taquiquinina, citocinas, proteasas, péptidos opioides, factores activadores de plaquetas, etc.

5 [0010] Entre las sustancias que inducen prurito, las citocinas son proteínas de bajo peso molecular producidas por todo tipo de células eucariotas, interactúan con receptores de la superficie celular e incluyen interleucinas, quimiocinas, interferones y similares. Entre ellas, IL-4, IL-13, IL-31, TSLP y similares se conocen como citocinas representativas que inducen prurito.

10 [0011] Como tratamientos para el prurito, que se han descrito hasta la fecha, existen diversos tratamientos, incluidos antihistamínicos, esteroides, antibióticos, agentes antivirales, agentes antifúngicos, anestésicos, probióticos, inmunosupresores, fototerapia y similares. Sin embargo, estos tratamientos tienen el problema de que tienen efectos terapéuticos temporales o limitados y muestran especificidad según el tipo de prurito. Además, las hormonas adrenocorticales y los corticosteroides tienen el problema de que solo deben usarse en casos agudos o graves durante
15 un corto período de tiempo debido a sus efectos secundarios.

[0012] A la vista de estos problemas, se han realizado activamente estudios para suprimir o aliviar el prurito utilizando sustancias naturales. En el caso de composiciones para suprimir o aliviar el prurito, que se basan en estas sustancias naturales, el contenido de un principio activo en el extracto natural es bajo y, por tanto, es necesario utilizar una gran
20 cantidad del extracto natural para obtener el efecto de suprimir o aliviar el prurito. En la mayoría de los casos, en la comercialización se ha enfatizado el hecho de que estas composiciones se basan en sustancias naturales, pero es necesario realizar más investigaciones científicas sobre los efectos prácticos de las sustancias naturales en la supresión o el alivio del prurito.

25 [0013] Paralelamente, se han propuesto procedimientos para mejorar o tratar afecciones o enfermedades de la piel utilizando células madre. Las células madre embrionarias o las células madre derivadas de tejido fetal tienen una excelente capacidad de diferenciación y excelentes capacidades de regeneración y tratamiento, y causan menos rechazo, pero estas células madre no son clínicamente aplicables debido a cuestiones éticas y al riesgo potencial de formación de tumores. Como alternativa a esto, se han propuesto procedimientos para mejorar o tratar afecciones o
30 enfermedades de la piel utilizando células madre adultas. Sin embargo, la utilización de células madre adultas alogénicas, no de células madre adultas autólogas del paciente, puede suponer un riesgo de causar enfermedad de injerto contra huésped. Cuando se utilizan células madre adultas autólogas para el tratamiento, surge el problema de que es necesario un proceso de cultivo de células madre adultas aisladas de un paciente, lo cual es complicado y costoso.

35 [0014] En los últimos años, en vista de los problemas de las células madre descritos anteriormente, se han realizado intentos para mejorar o tratar afecciones o enfermedades de la piel utilizando medios acondicionados obtenidos por cultivo de células madre adultas. Sin embargo, los medios acondicionados de las células madre adultas contienen no sólo diversas proteínas, citocinas y factores de crecimiento secretados por las células madre adultas, sino también
40 componentes, tales como productos de desecho secretados durante el crecimiento de las células, antibióticos añadidos para evitar la contaminación, suero de origen animal y similares. Por lo tanto, cuando los medios acondicionados se utilizan sobre la piel, es muy probable que la piel quede expuesta a diversos riesgos.

[0015] Recientemente, ha habido informes de que los secretomas celulares contienen varias moléculas bioactivas que regulan los comportamientos celulares. En particular, los secretomas celulares contienen 'exosomas' que tienen funciones de señalización intercelular y, de este modo, se han realizado activamente estudios sobre sus componentes
45 y funciones.

[0016] Las células arrojan varias vesículas membranosas a su entorno extracelular, y estas vesículas liberadas generalmente se denominan vesículas extracelulares (EV). La vesícula extracelular también se denomina vesícula derivada de la membrana celular, ectosoma, vesícula de desprendimiento, micropartícula, exosoma, etc., y en algunos casos también se utiliza de forma diferenciada del exosoma.

[0017] El exosoma es una vesícula de decenas a cientos de nanómetros de tamaño, que consiste en una membrana bicapa de fosfolípidos que tiene la misma estructura que la membrana celular. Este exosoma contiene proteínas, ácidos nucleicos (ARNm, miARN, etc.) y similares que se denominan carga de exosoma. Se sabe que la carga del exosoma incluye una amplia gama de factores de señalización, y estos factores de señalización son específicos de los tipos de células y se regulan de manera diferente según el entorno de las células secretoras. Se sabe que el exosoma es un mediador de señalización intercelular secretado por las células, y varias señales celulares transmitidas
55 a través de él regulan los comportamientos celulares, incluida la activación, el crecimiento, la migración, la diferenciación, la desdiferenciación, la apoptosis y la necrosis de las células diana. El exosoma contiene materiales genéticos específicos y factores bioactivos según la naturaleza y el estado de las células de las que se derivó el exosoma. El exosoma derivado de células madre en proliferación regula los comportamientos celulares, tales como la migración, proliferación y diferenciación celular, y recapitula las características de las células madre implicadas en la
60 regeneración de tejidos (Nature Review Immunology 2002 (2) 569-579).

[0018] Sin embargo, aunque se han realizado varios estudios que sugieren una posibilidad para el tratamiento de algunas enfermedades utilizando exosomas, se requieren estudios clínicos y no clínicos más detallados, y en particular, existe la necesidad de desarrollar una tecnología que utilice exosomas, que pueda aplicarse para el tratamiento de una variedad de enfermedades, mediante la identificación científica de una variedad de dianas sobre las cuales actúan los exosomas.

[0019] Los presentes inventores han realizado esfuerzos para desarrollar una composición para suprimir y aliviar el prurito, que sea superior y más segura que los agentes terapéuticos convencionales conocidos con respecto al prurito. En consecuencia, los presentes inventores han realizado estudios extensos sobre el nuevo utilización de exosomas derivados de células madre y, como resultado, han descubierto que los exosomas aislados del medio acondicionado de células madre pueden resolver los problemas de seguridad de las propias células madre o del medio acondicionado, tal como se describe anteriormente, y es eficaz para la prevención, supresión, alivio, mejora o tratamiento del prurito, completando así la presente invención.

[0020] Paralelamente, debe entenderse que la materia descrita como antecedentes técnicos pretende simplemente ayudar en la comprensión de los antecedentes de la presente invención y no se admite como estado de la técnica frente a la presente invención.

[0021] Byong Seung Cho et al. (Stem Cell Research & Therapy, 2018-07-11, vol. 9, no. 1, páginas 1-5) describen exosomas derivados de células madre de tejido adiposo humano para su utilización en el tratamiento de la dermatitis atópica en un modelo de ratón *in vivo*.

[0022] El documento KR-B-101686064 describe exosomas derivados de coágulos sanguíneos bovinos para su utilización en el tratamiento de enfermedades inmunes o inflamatorias.

[0023] El documento US-A-2015125950 describe exosomas derivados de células madre umbilicales para su utilización en el tratamiento de isquemia miocárdica y lesión por reperfusión.

[0024] El documento KR-A-20100122087 describe exosomas derivados de células madre embrionarias humanas para su utilización en el tratamiento de isquemia miocárdica y lesión por reperfusión.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0025] Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición que incluye exosomas derivados de células madre como principio activo para su utilización en la prevención, supresión, alivio, mejora o tratamiento del prurito inducido por linfopoyetina estromal tímica (TSLP), según reivindicación 7.

[0026] Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica, según la reivindicación 1, o un preparado externo para la piel, según la reivindicación 3, que incluye exosomas derivados de células madre para su utilización para prevenir, suprimir, aliviar, mejorar o tratar el prurito inducido por la linfopoyetina estromal tímica (TSLP).

[0027] Aún otro objetivo de la presente invención es obtener una gran cantidad de exosomas derivados de células madre que tengan alta pureza y una distribución uniforme del tamaño de partícula y proporcionar una composición para la utilización de la presente invención, teniendo los exosomas derivados de células madre obtenidos una excelente actividad funcional.

[0028] Se describe y no se reivindica *per se* un procedimiento para prevenir, suprimir, aliviar, mejorar o tratar el prurito usando la composición.

[0029] Se describe y no se reivindica *per se* un procedimiento cosmético para regular las afecciones de la piel de los mamíferos, excepto con fines de tratamiento, mediante la utilización de la composición.

[0030] Sin embargo, los objetivos de la presente invención, tal como se describen anteriormente, son ilustrativos y el alcance de la presente invención no se limita a los mismos. Además, otros objetivos y ventajas de la presente invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas y los dibujos adjuntos.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0031] Para lograr los objetivos anteriores, la presente invención proporciona una composición para su utilización en la prevención, supresión, alivio, mejora o tratamiento del prurito inducido por la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), incluyendo exosomas derivados de células madre como principio activo.

[0032] La presente invención también proporciona una nueva tecnología clínica y comercialmente relevante capaz de obtener una gran cantidad de exosomas derivados de células madre que son clínicamente aplicables para la prevención, supresión, alivio, mejora y tratamiento del prurito y tienen alta pureza y una distribución uniforme del

tamaño de partícula, en la que la tecnología puede proporcionar una composición para la utilización de la presente invención, teniendo los exosomas derivados de células madre obtenidos una excelente actividad funcional, en grandes cantidades a bajo coste.

[0033] Tal como se usa en el presente documento, el término "exosomas" se refiere a vesículas de decenas a cientos de nanómetros de tamaño (preferiblemente, aproximadamente de 30 a 200 nm), que consisten en una membrana bicapa de fosfolípidos que tiene la misma estructura que la de la membrana celular (sin embargo, el tamaño de partícula de los exosomas es variable dependiendo del tipo de célula de la que se aíslan los exosomas, un procedimiento de aislamiento y un procedimiento de medición) (Vasily S. Chernyshev et al., "Size and Shape Characterization of Hydrated and Desiccated Exosomes", Anal Bioanal Chem, (2015) DOI 10.1007/s00216-015-8535-3). Estos exosomas contienen proteínas, ácidos nucleicos (ARNm, miARN, etc.) y similares que se denominan carga de exosomas. Se sabe que la carga de exosomas incluye una amplia gama de factores de señalización, y estos factores de señalización son específicos de los tipos de células y se regulan de manera diferente según el entorno de las células secretoras. Se sabe que los exosomas son mediadores de señalización intercelular secretados por las células, y diversas señales celulares transmitidas a través de ellos comportamientos celulares, incluida la activación, el crecimiento, la migración, la diferenciación, la desdiferenciación, la apoptosis y la necrosis de las células diana.

[0034] Tal como se utiliza en este documento, el término "picazón" o "prurito" no está particularmente limitado. Entre los ejemplos de prurito se incluyen prurito paroxístico, picazón invernal, picazón anal (prurito anal), prurito vulvar (picazón en la vulva), tiña inguinal (tinea cruris), prurito acuagénico, prurito del cuero cabelludo, prurito nasal, picazón de garganta, prurito oral y prurito ocular; prurito asociado con enfermedades internas, incluyendo prurito colestático, insuficiencia renal crónica, tumores malignos, anemia por deficiencia de hierro, policitemia rubra vera, hipertiroidismo, hipotiroidismo, diabetes y síndrome de inmunodeficiencia adquirida; y prurito asociado con trastornos mentales de la piel, incluido el liquen simple crónico, prurigo, tricotilomanía, rasguños nerviosos, trastornos del comportamiento que afectan la piel y parasitosis delirantes. Sin embargo, debe entenderse que en la presente invención no se excluye el prurito por diversas causas distintas del prurito mencionado anteriormente. Por ejemplo, la presente invención puede incluir todos los pruritos conocidos en la técnica, por ejemplo prurito de causas dermatológicas, causas sistémicas, causas neuropáticas y causas psicógenas.

[0035] Se describe y no se reivindica *per se* que el término "iontoforesis" se refiere a un procedimiento para hacer fluir una microcorriente a través de una piel a la que se ha aplicado un principio activo, generando así una diferencia de potencial y cambiando el entorno eléctrico de la piel, y permitiendo así que un principio activo ionizado penetre en la piel por repulsión eléctrica. Se describe y no se reivindica *per se* que los ejemplos de iontoforesis incluyen: un procedimiento para introducir una microcorriente en una piel permitiendo que la microcorriente fluya desde una fuente de energía externa hacia un parche de electrodo en la piel, la microcorriente generada por la fuente de energía externa; un procedimiento para introducir una microcorriente en la piel, la microcorriente generada por una pila proporcionada en un parche de electrodo sobre la piel; y un procedimiento para introducir una microcorriente en la piel a través de un parche en la piel provisto de un dispositivo de electrodiálisis inversa, la microcorriente generada por la diferencia de concentración entre la solución de electrolitos de alta concentración y la solución de electrolitos de baja concentración en el dispositivo de electrodiálisis inversa.

[0036] Paralelamente, se describieron los efectos limitados de los exosomas derivados de células madre sobre la mejora de las arrugas y la regeneración de la piel. Sin embargo, la regeneración de la piel usando exosomas en esta técnica convencional no está dirigida a la prevención, supresión, alivio, mejora o tratamiento del prurito, sino que está dirigida a mejorar las arrugas o restaurar la elasticidad de la piel mediante la regeneración del tejido cutáneo. Además, ha habido intentos de utilizar células madre, medios acondicionados de células madre, etc. para regenerar la capa dérmica de la piel para curar heridas y regenerar el tejido de la piel para mejorar la elasticidad de la piel. Sin embargo, nunca se supo que la utilización de exosomas aislados y purificados a partir de medios acondicionados de células madre fuera eficaz para "la prevención, supresión, alivio, mejora o tratamiento del prurito" definido tal como se describe anteriormente.

[0037] Hasta ahora, no se ha desarrollado un agente terapéutico que permita aplicar clínicamente exosomas para la prevención, supresión, alivio, mejora o tratamiento del prurito, en el que los exosomas se aíslan y purifican de forma económica en una cantidad grande del medio acondicionado de células madre obtenidas después de cultivar células madre que pueden cultivarse en masa. Por ejemplo, las células madre derivadas del tejido adiposo se pueden obtener en grandes cantidades mediante un procedimiento sencillo, tal como la liposucción. El tejido adiposo tiene aproximadamente 40 veces más células madre que tiene la médula ósea, el cordón umbilical o la sangre del cordón umbilical. De este modo, estas células madre derivadas del tejido adiposo tienen el coste comercial más bajo y se obtienen en una cantidad grande. Sin embargo, dado que el tejido adiposo contiene una gran cantidad de impurezas, tales como restos celulares, residuos, proteínas y macropartículas, es difícil aislar económicamente una gran cantidad de exosomas, que tengan una alta pureza y una distribución uniforme del tamaño de partícula, del medio acondicionado de células madre derivadas de tejido adiposo. Por lo tanto, parece que existen barreras técnicas para aislar una cantidad grande de exosomas, que tengan una alta pureza y una distribución uniforme del tamaño de partícula, del medio acondicionado de las células madre en términos de economía.

[0038] Cuando la composición para su utilización de la presente invención se aplica como una composición farmacéutica para su utilización, o un preparado externo para la piel para su utilización según las reivindicaciones 1 o 3, los exosomas derivados de células madre contenidos en la composición como principio activo exhiben efectos significativos en la prevención, supresión, alivio, mejora o tratamiento del prurito, y pueden superar el problema de seguridad de las propias células madre o del medio acondicionado de las células madre. Por tanto, los exosomas derivados de células madre contenidos en la composición para su utilización en prevenir, suprimir, aliviar, mejorar o tratar el prurito, según la presente invención, previenen, suprimen, alivian, mejoran o tratan el prurito mediante un mecanismo que es completamente diferente del mecanismo de mejora limitada de las arrugas y regeneración de la piel conocida en la técnica convencional, y debe entenderse que este efecto no es en absoluto predecible a partir de la técnica convencional.

[0039] Una composición para su utilización en la prevención, supresión, alivio, mejora o tratamiento del prurito inducido por linfopoyetina estromal tímica (TSLP), según la reivindicación 7, incluye exosomas derivados de células madre como principio activo.

[0040] En la composición, según una realización de la presente invención, los exosomas se pueden obtener realizando las siguientes etapas: (a) añadir trehalosa a un medio acondicionado de células madre; (b) filtrar el medio acondicionado al que se le ha añadido trehalosa; (c) aislar exosomas del medio acondicionado filtrado mediante filtración de flujo tangencial (TFF, *tangential flow filtration*); y (d) añadir trehalosa a un tampón para diafiltración y realizar diafiltración sobre los exosomas aislados mediante TFF usando el tampón al que se le ha añadido trehalosa.

[0041] En la composición, según una realización de la presente invención, cuando se añade trehalosa al tampón para la diafiltración en la etapa (d), los exosomas que tienen una distribución uniforme de tamaño de partícula se pueden de manera eficaz (véanse las figuras 6A a 6E).

[0042] Paralelamente, en la presente invención, la trehalosa sirve para discriminar de manera eficaz los exosomas de impurezas, tales como restos celulares, residuos, proteínas y macropartículas.

[0043] En la composición, según una realización de la presente invención, la diafiltración se puede realizar de manera continua o discontinua. La diafiltración se puede realizar usando un tampón que tiene al menos 4 veces, preferiblemente al menos de 6 a 10 veces, más preferiblemente, al menos 12 veces, el volumen de los exosomas aislados.

[0044] En la composición, según una realización de la presente invención, la TFF se puede realizar usando un filtro de TFF que tiene un corte de peso molecular (MWCO) de 100.000 Da (Dalton), 300.000 Da, 500.000 Da o 750.000 Da, o un filtro de 0,05 µm.

[0045] En la composición, según una realización de la presente invención, la etapa (c) puede comprender además concentrar los exosomas aislados hasta un volumen de 1/100 a 1/25 mediante la TFF.

[0046] En la composición, según una realización de la presente invención, el medio acondicionado filtrado se puede sonicar antes de la TFF.

[0047] En la composición, según una realización de la presente invención, los exosomas pueden disminuir los niveles de expresión de IL-4, IL-31 y TSLP en tejido de la piel y células de la piel.

[0048] En la composición, según una realización de la presente invención, el tipo de células madre no está particularmente limitado, pero las células madre pueden ser preferiblemente células madre mesenquimales, por ejemplo, células madre derivadas de tejido adiposo, médula ósea, cordón umbilical o sangre de cordón umbilical, más preferiblemente células madre derivadas de tejido adiposo. Las células madre derivadas del tejido adiposo no están particularmente limitadas, siempre y cuando no supongan un riesgo de infección con un patógeno y no provoquen rechazo inmunológico, pero son preferiblemente células madre derivadas del tejido adiposo humano.

[0049] La composición, según la presente invención, se puede usar de manera eficaz para la prevención, supresión, alivio, mejora o tratamiento del prurito inducido por linfopoyetina estromal tímica (TSLP).

[0050] La composición farmacéutica, según una realización de la presente invención, puede incluir portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables según un procedimiento convencional. Los portadores, excipientes y diluyentes incluyen, pero sin limitación a los mismos, lactosa, dextrosa, trehalosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato cálcico, carbonato cálcico, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Para su uso, la composición farmacéutica, según una realización de la presente invención, se puede formular como formas de dosificación orales, tales como polvos, píldoras, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes, gránulos, elixires, aerosoles o similares, preparados externos para la piel, supositorios o soluciones inyectables estériles.

[0051] La composición farmacéutica, según una realización de la presente invención, puede incluir portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables según un procedimiento convencional. Los portadores, excipientes y diluyentes incluyen, pero sin limitarse a los mismos, lactosa, dextrosa, trehalosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato cálcico, carbonato cálcico, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Para su uso, la composición farmacéutica, según una realización de la presente invención, se puede formular como formas de dosificación orales, tales como polvos, píldoras, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes, gránulos, elixires, aerosoles o similares, preparados externos para la piel, supositorios o soluciones inyectables estériles.

[0052] La administración de la composición farmacéutica según una realización de la presente invención significa introducir una sustancia deseada en un paciente mediante cualquier procedimiento apropiado, y la composición farmacéutica se puede administrar por cualquier vía general, siempre que la sustancia pueda llegar a un tejido diana. Por ejemplo, la composición farmacéutica, según una realización de la presente invención, se puede administrar por vía oral o parenteral. Las rutas para la administración parenteral pueden incluir administración transdérmica, administración intraperitoneal, administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración subcutánea, administración intradérmica, administración tópica, administración intrarrectal y similares. Sin embargo, el alcance de la presente invención no se limita a las mismas y no se excluyen diversos procedimientos de administración conocidos en la técnica. Además, la composición farmacéutica, según una realización, puede administrarse mediante cualquier dispositivo a través del cual se pueda administrar un principio activo en un tejido o célula diana. Además, la cantidad eficaz de la composición farmacéutica, según una realización de la presente invención, significa la cantidad necesaria para la administración con el fin de lograr el efecto de tratar una enfermedad.

[0053] Las formulaciones para la administración parenteral de la composición farmacéutica, según la presente invención, incluyen soluciones acuosas esterilizadas, soluciones no acuosas, suspensiones, emulsiones, formulaciones liofilizadas o supositorios. Las formulaciones para la administración parenteral de la composición farmacéutica, según una realización de la presente invención, también se pueden preparar como formulaciones inyectables. Las formulaciones inyectables, según una realización de la presente invención, pueden ser formulaciones inyectables acuosas, formulaciones inyectables no acuosas, inyecciones en suspensión acuosa, inyecciones en suspensión no acuosa, formulaciones inyectables sólidas que se usan después de la disolución o suspensión, etc., pero no se limitan a las mismas. Una formulación inyectable, según una realización de la presente invención, puede comprender además al menos uno de agua destilada para inyección, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de maní, aceite de sésamo, aceite de camelia, etc.), monoglicérido, diglicérido, propilenglicol, alcanfor, benzoato de estradiol, subsalicilato de bismuto, arsenobenzol sódico, sulfato de estreptomycin, dependiendo del tipo de los mismos, y opcionalmente puede comprender además un estabilizador o un conservante.

[0054] El contenido de la composición farmacéutica, según una realización en una formulación, se puede seleccionar adecuadamente dependiendo del tipo, cantidad, forma y similares de componentes adicionales, tal como se describe anteriormente. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede estar contenida en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 99 % en peso, preferiblemente de aproximadamente 10 al 90 % en peso, basado en el peso total de una formulación inyectable. Además, la dosis adecuada de la composición farmacéutica, según una realización de la presente invención, se puede ajustar dependiendo del tipo de enfermedad del paciente, la gravedad de la enfermedad, el tipo de formulación, el procedimiento de formulación, la edad, sexo, peso corporal, estado de salud, dieta, tasa de excreción del paciente, el período de administración y el régimen de administración. Por ejemplo, cuando la composición farmacéutica, según una realización de la presente invención, se administra a un adulto, se puede administrar de una a varias veces a una dosis de 0,001 mg/kg a 100 mg/kg por día.

[0055] Paralelamente, cuando la composición, según una realización de la presente invención, se prepara como un preparado externo para la piel para su utilización, según la reivindicación 3, puede contener adecuadamente componentes que se usan generalmente en productos cosméticos o preparados externos para la piel, por ejemplo, humectantes, antioxidantes, componentes oleosos, absorbentes de UV, emulsionantes, tensioactivos, espesantes, alcoholes, componentes en polvo, colorantes, componentes acuosos, agua y diversos nutrientes para la piel, etc. según sea necesario, dentro del rango que no perjudique el efecto de la presente invención.

[0056] Además, el preparado externo para la piel para su utilización, según la reivindicación 3, puede incluir, además de exosomas derivados de células madre, un agente para el tratamiento del prurito y/o un humectante, que se usa en la técnica, dentro del rango que no perjudique el efecto de los exosomas derivados de células madre, es decir, el efecto de prevenir, suprimir, aliviar, mejorar o tratar el prurito. Por ejemplo, los exosomas de la presente invención pueden estar contenidos o mezclados con al menos uno de hidrogel, ácido hialurónico, sal de ácido hialurónico (por ejemplo, hialuronato de sodio, etc.) o gel de hialuronato. En el preparado externo para la piel para su utilización según la reivindicación 3, el tipo de hidrogel no está particularmente limitado, pero el hidrogel se puede obtener preferiblemente dispersando un polímero gelificado en un alcohol polihídrico. El polímero gelificado puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en plurónico, agar purificado, agarosa, goma gellan, ácido alginico, carragenano, goma casia, goma xantana, galactomanano, glucomanano, pectina, celulosa, goma guar y goma de algarroba, y el alcohol polihídrico puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, isobutilenglicol, dipropilenglicol, sorbitol, xilitol y glicerina.

[0057] El preparado externo para la piel para su utilización según la reivindicación 3 se puede usar en diversas formas, por ejemplo, parches, paquetes de mascarillas, láminas de mascarillas, cremas, tónicos, pomadas, suspensiones, emulsiones, pastas, lociones, geles, aceites, paquetes, pulverizadores, aerosoles, vaporizadores, bases, polvos y papeles oleosos. Por ejemplo, el preparado externo para la piel para su utilización se puede aplicar o empapar en al menos una superficie de un parche, un paquete de mascarilla o una lámina de mascarilla.

[0058] Se describe y no se reivindica *per se* que cuando el preparado externo para la piel se prepara como una composición cosmética, se utiliza con el fin de prevenir, suprimir, aliviar o mejorar el prurito, y la composición cosmética se puede preparar como cualquier formulación que se prepara generalmente en la técnica. Por ejemplo, puede formularse como parche, paquete de mascarilla, lámina de mascarilla, suavizante de la piel, nutrición, loción astringente, crema nutritiva, crema de masaje, crema para los ojos, crema limpiadora, esencia, esencia para los ojos, loción limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, protector solar, lápiz labial, jabón, champú, limpiador que contiene tensioactivo, preparado para el baño, loción corporal, crema corporal, aceite corporal, esencia corporal, limpiador corporal, tinte para el cabello, tónico para el cabello, etc., pero no se limita a los mismos.

[0059] El preparado externo para la piel para su utilización según la reivindicación 3 contiene componentes que se usan habitualmente en preparados externos para la piel. Por ejemplo, el preparado externo para la piel para su utilización puede contener adyuvantes y portadores convencionales, tales como antioxidantes, estabilizadores, solubilizantes, vitaminas, pigmentos y fragancias. Además, los expertos en la técnica pueden seleccionar adecuadamente y sin dificultad otros componentes en cada formulación para el preparado externo para la piel para su utilización dependiendo del tipo o utilización prevista del preparado externo de la piel para su utilización.

[0060] Se describe y no se reivindica *per se* un procedimiento cosmético para regular las afecciones de la piel de los mamíferos, excepto con fines de tratamiento, mediante la utilización de la composición cosmética. En el procedimiento cosmético, regular las condiciones de la piel significa mejorar las condiciones de la piel y/o regular de manera profiláctica las condiciones de la piel, y mejorar las condiciones de la piel significa un cambio positivo perceptible visual y/o táctilmente en la apariencia y sensación del tejido de la piel.

[0061] Se describe y no se reivindica *per se* que el procedimiento cosmético incluye: (a) aplicar la composición cosmética directamente a la piel de un mamífero; o (b) poner en contacto o acoplar un parche, un paquete de mascarilla o una lámina de mascarilla, que tiene la composición cosmética aplicada o empapada en el mismo, a la piel del mamífero; o realizar secuencialmente (a) y (b).

[0062] Se describe y no se reivindica *per se* que el procedimiento cosmético puede comprender además realizar iontoforesis permitiendo que una microcorriente fluya a través de la piel del mamífero que tiene la composición cosmética aplicada a la misma. Además, el procedimiento cosmético puede comprender además poner en contacto o acoplar un dispositivo de iontoforesis a la piel del mamífero.

[0063] Se describe y no se reivindica *per se* que en el procedimiento cosmético, el dispositivo de iontoforesis puede incluir al menos una pila seleccionada del grupo que consiste en pilas flexibles, pilas secundarias de iones de litio, pilas alcalinas, pilas secas, pilas de mercurio, pilas de litio, pilas de níquel-cadmio y pilas de electrodiálisis inversa, o pueden incluir un parche, un paquete de mascarilla o una lámina de mascarilla proporcionados con al menos una pila.

[0064] Se describe y no se reivindica *per se* un procedimiento para prevenir, suprimir, aliviar, mejorar o tratar el prurito que comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica.

[0065] Se describe y no se reivindica *per se* que en el procedimiento para prevenir, suprimir, aliviar, mejorar o tratar el prurito, el mamífero puede ser seres humanos, perros, gatos, roedores, caballos, ganado vacuno, monos o cerdos.

EFFECTOS VENTAJOSOS

[0066] Tal como se describió anteriormente, la composición para su utilización de la presente invención puede actuar contra múltiples dianas de citocinas que inducen prurito, por ejemplo, IL-4, IL-31 y TSLP y, por lo tanto, puede aplicarse ampliamente contra el prurito causado por diversos factores y puede suprimir y aliviar eficazmente el prurito. Además, cuando la composición para su utilización de la presente invención se aplica directamente a la piel humana, puede mejorar notablemente las puntuaciones clínicas asociadas al prurito, el eritema y similares. Por tanto, la composición para su utilización de la presente invención es útil como composición farmacéutica o preparado externo para la piel para prevenir, suprimir, aliviar, mejorar o tratar el prurito inducido por la linfopoyetina estromal tímica (TSLP).

[0067] Además, según la presente invención, se pueden obtener exosomas derivados de células madre que tienen una distribución uniforme del tamaño de partícula y alta pureza en grandes cantidades a bajo coste. Por lo tanto, la presente invención puede proporcionar una composición que contiene como principio activo exosomas derivados de células madre que tienen una excelente actividad funcional, en grandes cantidades a bajo coste. Además, la presente invención permite escalar los procesos y también es adecuada para las buenas prácticas de fabricación (GMP, *Good manufacturing practice*).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0068] La figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para aislar y purificar exosomas en un procedimiento para preparar exosomas a partir de medio de cultivo de células madre según una realización de la presente invención.

La Figura 2 muestra los resultados de medir la cantidad relativa de proteínas contenidas en una solución en cada etapa de preparación de exosomas a partir de medios de cultivo de células madre según una realización de la presente invención. La cantidad relativa de proteínas en cada etapa se expresó como la relación relativa entre la cantidad total de proteínas en solución de cada etapa y la cantidad total de proteínas en medios acondicionados de células madre. Los resultados experimentales que se muestran son los resultados obtenidos de dos lotes diferentes, respectivamente. La figura 3 muestra los resultados de medir la productividad y pureza de los exosomas obtenidos según una realización de la presente invención. La productividad de los exosomas se calculó como el número de partículas de exosomas obtenidas por ml de medio acondicionado de células madre (CM), y la pureza de los exosomas se calculó como el número de partículas de exosomas por μg de proteínas contenidas en una fracción final. Los resultados experimentales que se muestran son los resultados obtenidos de cinco lotes diferentes, respectivamente.

Las figuras 4A a 4E muestran los resultados del análisis de las propiedades físicas de los exosomas obtenidos según una realización de la presente invención. "Figura 4A" muestra la distribución del tamaño de las partículas y el número de partículas obtenidas mediante el análisis de detección sintonizable de pulsos resistivos (TRPS). "Figura 4B" muestra la distribución del tamaño de partículas y el número de partículas obtenidas mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). "Figura 4C" muestra diferentes aumentos de imágenes de partículas obtenidas mediante análisis de microscopía electrónica transmitida (TEM). "Figura 4D" muestra los resultados del análisis de transferencia Western de exosomas obtenidos según una realización de la presente invención. "Figura 4E" muestra los resultados de la citometría de flujo para CD63 y CD81 en el análisis de marcadores para exosomas obtenidos según una realización de la presente invención.

Las figuras 5A a 5C muestran los resultados del análisis NTA de distribuciones de tamaño de partículas, que indican que mediante la adición de trehalosa se obtienen exosomas que tienen una distribución de tamaño de partículas uniforme y alta pureza. A medida que aumenta la cantidad de trehalosa añadida, se puede obtener una distribución del tamaño de partículas con un solo pico.

Las figuras 6A a 6C muestran los resultados del análisis NTA que indican distribuciones de tamaño de partículas obtenidas dependiendo de si se añadió o no trehalosa en un proceso de preparación de exosomas según una realización de la presente invención. "Figura 6A" muestra los resultados obtenidos cuando se agregó trehalosa durante todo el proceso de preparación; "Figura 6B" muestra los resultados obtenidos en el caso de que los medios acondicionados se almacenara congelados y descongelaran, y a continuación se añadiera trehalosa a los medios descongelados; y "Figura 6C" muestra los resultados obtenidos cuando no se añadió trehalosa. "Figura" muestra los resultados de comparar la productividad relativa y la concentración relativa de exosomas aislados mediante los procedimientos de las figuras 6A a 6C. "Figura 6E" muestra el tamaño medio de los exosomas aislados mediante los procedimientos de las figuras 6A a 6C.

La figura 7 representa gráficos que muestran los resultados de la PCR en tiempo real realizada para examinar cambios en los niveles de expresión de ARNm de IL-4 e IL-31 (que causan prurito) en muestras obtenidas de lesión cutánea del modelo animal 1, después de tratar ratones, en los que se indujo atopía con prurito, con exosomas según una realización de la presente invención.

La figura 8 representa gráficos que muestran los resultados de la PCR en tiempo real realizada para examinar cambios en los niveles de expresión de ARNm de IL-4 e IL-31 (que causan prurito) en muestras obtenidas de lesión cutánea del modelo animal 2, después de tratar ratones, en los que se indujo atopía con prurito, con exosomas según una realización de la presente invención.

Las figuras 9A y 9B muestran resultados que indican que la expresión de ARNm y la producción de proteínas de TSLP disminuyeron cuando se trataron células HaCaT de queratinocitos humanos con exosomas según una realización de la presente invención.

La figura 10 muestra los resultados de medir la intensidad de la fluorescencia para identificar exosomas teñidos con PKH67.

La figura 11 representa imágenes microscópicas de fluorescencia que muestran el grado en que los exosomas teñidos con fluorescencia se administraron en tejido de piel porcina.

La figura 12 representa imágenes microscópicas confocales de fluorescencia que muestran el grado en que los exosomas teñidos con fluorescencia se administraron al tejido de la piel del ratón.

La figura 13 muestra gráficos que comparan la intensidad de fluorescencia total obtenida midiendo la intensidad de fluorescencia en cada imagen de la figura 12.

La figura 14 muestra resultados que indican que los exosomas, según una realización de la presente invención, no eran citotóxicos después de que se trataran células HS68 de fibroblastos humanos con los exosomas.

La figura 15 representa fotografías que comparan condiciones de la piel antes y después del tratamiento de la piel humana con un producto de prueba que contiene exosomas según una realización de la presente invención.

La figura 16 representa fotografías que muestran que el eritema y similares en la piel humana (parte afectada) mejoraron notablemente como resultado de aplicar una composición que incluye exosomas, según una realización de la presente invención, a la piel humana (parte afectada) y, a continuación, realizar una iontoforesis para permitir que una microcorriente fluya a través de la piel humana (parte afectada) a la que se aplicó la composición.

EJEMPLOS

[0069] En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos son solo para ilustrar la presente invención y no pretenden limitar o restringir el alcance de la presente invención. Los que se pueden deducir fácilmente por un experto en la materia a partir de la descripción detallada y los ejemplos de la presente invención se interpretan que se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

[0070] A lo largo de la presente memoria descriptiva, se debe entender que, cuando se hace referencia a cualquier parte como "que comprende" cualquier componente, no excluye otros componentes, pero puede incluir adicionalmente otros componentes, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1: Cultivo de células

[0071] Se subcultivaron células de fibroblasto dérmico humano HS68 adquiridas de ATCC en medio DMEM (adquirido de ThermoFisher Scientific) que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS; adquirido de ThermoFisher Scientific) y 1% de antibióticos-antimicóticos (adquiridos en ThermoFisher Scientific) a 37 °C bajo 5 % de CO₂. Además, se subcultivaron células HaCaT de queratinocitos humanos en medio DMEM suplementado con FBS al 10 % y 1 % en volumen de penicilina-estreptomina a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂.

[0072] Según un procedimiento de cultivo celular conocido en el campo técnico al que pertenece la presente invención, se cultivaron células madre derivadas de tejido adiposo a 37 °C en CO₂ al 5 %. A continuación, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (adquirida en ThermoFisher Scientific) y a continuación el medio se reemplazó por medio sin suero ni rojo de fenol, y las células se cultivaron durante 1 a 10 días. Se recuperó el sobrenadante (en lo sucesivo, denominado "medio acondicionado").

[0073] Para obtener exosomas que tengan una distribución de tamaño de partícula uniforme y alta pureza en un proceso de aislamiento de exosomas, se añadió 2% en peso de trehalosa al medio acondicionado. Después de la adición de trehalosa, el medio acondicionado se filtró a través de un filtro de 0,22 µm para eliminar impurezas, tales como restos celulares, residuos, macropartículas y similares. Del medio acondicionado filtrado, se aislaron inmediatamente los exosomas. Además, el medio acondicionado filtrado se almacenó en un frigorífico (10 °C o menos) y a continuación se usó para el aislamiento de exosomas. Además, el medio acondicionado filtrado se almacenó congelado en un congelador de temperatura ultrabaja a -60 °C o menos, se descongeló y a continuación se sometió a aislamiento de exosomas. Posteriormente, se aislaron los exosomas del medio acondicionado mediante TFF.

Ejemplo 2: Aislamiento y purificación de exosomas mediante el procedimiento TFF

[0074] Para aislar, concentrar y diafiltrar exosomas del medio acondicionado filtrado a través de un filtro de 0,22 µm en el Ejemplo 1, se utilizó el procedimiento TFF. El medio acondicionado filtrado se sonicó para perder la agregación potencial de exosomas antes de aislar y concentrar los exosomas usando TFF. Como filtro para el procedimiento TFF, se usó un filtro de cartucho (conocido como filtro de fibra hueca; adquirido en GE Healthcare) o un filtro de casete (adquirido en Pall, Sartorius o Merck Millipore). El filtro de TFF se puede seleccionar con varios cortes de peso molecular (MWCO). Utilizando el filtro con MWCO seleccionado, se aislaron y concentraron exosomas y se eliminaron partículas, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, compuestos de bajo peso molecular, etc., que son de menor tamaño que el MWCO.

[0075] Para aislar y concentrar exosomas, se usó un filtro de TFF que tenía MWCO de 100.000 Da (Dalton), 300.000 Da o 500.000 Da. Los exosomas se aislaron del medio acondicionado eliminando sustancias más pequeñas que el MWCO y concentrando el medio acondicionado hasta un volumen de aproximadamente 1/100 a 1/25 mediante el procedimiento TFF.

[0076] La solución aislada y concentrada de exosomas se sometió adicionalmente a diafiltración. La diafiltración se realizó de forma continua (diafiltración continua) o de forma discontinua (diafiltración discontinua), usando un tampón que tenía al menos 4 veces, preferiblemente, al menos 6 a 10 veces, más preferiblemente, al menos 12 veces el volumen de los exosomas aislados. Para obtener exosomas que tuvieran una distribución uniforme del tamaño de partículas y alta pureza, se añadió al tampón un 2 % en peso de trehalosa en PBS. Las figuras 6A a 6E muestran los resultados de que mediante la adición de trehalosa, se pueden obtener con alto rendimiento exosomas que tienen una distribución de tamaño de partícula uniforme y alta pureza.

Ejemplo 3: Análisis de características de exosomas aislados

[0077] Las cantidades de proteínas de los exosomas aislados, el medio acondicionado y las fracciones del proceso de aislamiento de TFF se midieron usando el ensayo colorimétrico BCA (adquirido de ThermoFisher Scientific) o el ensayo de fluorescencia FluoroProfile (adquirido de Sigma). Con respecto a los exosomas aislados y concentrados mediante el procedimiento TFF según una realización, se monitorizó mediante los ensayos de proteínas el grado en que se eliminaron proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, compuestos de bajo peso molecular, etc., y los resultados. de la

monitorización se muestran en la figura 2. Como resultado, se pudo observar que las proteínas presentes en el medio acondicionado se eliminaron de manera muy eficaz mediante el procedimiento TFF según una realización.

[0078] La figura 3 muestra los resultados de comparar la productividad y pureza de los exosomas en cada uno de cinco lotes independientes cuando los exosomas se aislaron mediante el procedimiento TFF según una realización. Se analizaron los resultados obtenidos de los cinco lotes independientes y, como resultado, se confirmó que los exosomas se aislaron de manera muy estable mediante el procedimiento TFF según una realización.

[0079] El tamaño de partícula y la concentración de los exosomas aislados se midieron mediante un instrumento de análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) (adquirido en Malvern) o un instrumento de detección sintonizable de pulsos resistivos (TRPS) (adquirido en Izon Science). La uniformidad y el tamaño de los exosomas aislados se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las figuras 4A a 4C muestran los resultados de TRPS, NTA y TEM de los exosomas aislados mediante el procedimiento de aislamiento según una realización de la presente invención.

[0080] Después de aislar los exosomas, la distribución del tamaño de los exosomas se analizó mediante NTA dependiendo de si se añadió trehalosa. Los resultados del análisis se muestran en las figuras 5A a 5C. La concentración de trehalosa se aumentó de 0 % en peso a 1 % en peso y 2 % en peso (de arriba a abajo en las figuras 5A a 5C), y el experimento se repitió tres veces. Se confirmó que cuando no se usaba trehalosa, se observaban partículas que tenían un tamaño de 300 nm o más, mientras que a medida que aumentaba la cantidad de trehalosa añadida, disminuía el número de partículas que tenían un tamaño de 300 nm o más y la distribución de tamaño de los exosomas se volvió uniforme.

[0081] Se examinó adicionalmente el efecto debido a la adición de trehalosa en el proceso de aislamiento de exosomas mediante el procedimiento TFF. Tal como se muestra en las figuras 6A a 6C, cuando se añadió 2 % en peso de trehalosa en PBS durante todo el proceso de preparación de exosomas, se pudieron obtener exosomas que tenían una distribución de tamaño uniforme (figura 6A). Sin embargo, cuando se usó el medio acondicionado, que se había almacenado por congelación sin agregar trehalosa, pero el proceso TFF se realizó agregando trehalosa solo en el proceso de diafiltración, o el proceso TFF se realizó sin agregar trehalosa, se obtuvieron exosomas no uniformes que incluían una gran cantidad de partículas de gran tamaño (figuras 6B y 6C).

[0082] Se compararon la productividad relativa y la concentración de los exosomas aislados y, como resultado, se pudieron obtener exosomas con una productividad muy alta cuando se añadió trehalosa durante todo el proceso de producción de exosomas. Los exosomas obtenidos tenían al menos 5 veces la concentración del control (en el que no se añadió trehalosa durante todo el proceso de producción de exosomas) (figura 6D). Tal como se muestra en el resultado del análisis NTA, se confirmó que el tamaño medio de los exosomas aislados era uniforme (200 nm) cuando se añadió trehalosa durante todo el proceso de producción de exosomas (figura 6E).

[0083] La figura 4D muestra los resultados del análisis de transferencia Western de los exosomas aislados mediante el procedimiento de aislamiento según una realización de la presente invención. Tal como se muestra en la misma, se confirmó la presencia de los marcadores CD9, CD63, CD81 y TSG101. Como anticuerpos para cada uno de los marcadores se utilizaron anti-CD9 (adquirido en Abcam), anti-CD63 (adquirido en System Biosciences), anti-CD81 (adquirido en System Biosciences) y anti-TSG101 (adquirido en Abcam), respectivamente.

[0084] La figura 4E muestra los resultados de la citometría de flujo de los exosomas aislados mediante el procedimiento de aislamiento según una realización de la presente invención. Tal como se muestra en la misma, se confirmó la presencia de los marcadores CD63 y CD81. Para aislar los exosomas CD63 positivos, se utilizó un kit de reactivo de detección/aislamiento de CD63 humano en exosoma (adquirido en ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los marcadores se tiñeron con CD63 antihumano de ratón con PE (adquirido en BD) o CD81 antihumano de ratón con PE (adquirido en BD) y, a continuación, se analizaron utilizando un citómetro de flujo (ACEA Biosciences).

[0085] Tomando los resultados anteriores en conjunto, se podría confirmar que el procedimiento de aislamiento según una realización de la presente invención podría aislar y purificar de manera económica y eficiente exosomas que tienen una distribución del tamaño de partícula y alta pureza con alto rendimiento mediante la adición de trehalosa en el proceso de aislamiento y/o purificación basado en filtración de flujo tangencial. Además, se pudo observar que los procesos del procedimiento de aislamiento según una realización de la presente invención se pueden escalar y también son adecuados para GMP.

Ejemplo 4: Medición de la citotoxicidad después del tratamiento con exosomas

[0086] Para evaluar la citotoxicidad de los exosomas, aislados mediante el procedimiento de aislamiento según una realización de la presente invención, en células HS68 de fibroblastos de piel humana, las células se trataron con diversas concentraciones de exosomas y se examinó la tasa de proliferación de las células. Específicamente, las células HS68 se suspendieron en DMEM que contenía FBS al 10 % y a continuación se sembraron y se cultivaron hasta una confluencia del 80 al 90 % y se cultivaron en una incubadora a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 24 horas.

Después de 24 horas, se extrajo el medio y las células se trataron con diversas concentraciones de los exosomas preparados en el Ejemplo 2. A continuación, se evaluó la viabilidad de las células mientras las células se cultivaban durante 24 a 72 horas. La viabilidad celular se midió usando reactivo WST-1 (adquirido a Takara), reactivo MTT (adquirido a Sigma), reactivo CellTiter-Glo (adquirido a Promega) o reactivo alamarBlue (adquirido a ThermoFisher Scientific) con un lector de microplacas (adquirido a Molecular Dispositivos).

[0087] Como control, se utilizaron las células cultivadas en medio de cultivo celular convencional no tratado con los exosomas. Se confirmó que los exosomas de la presente invención no mostraron citotoxicidad en el intervalo de concentración utilizado en la prueba (figura 14).

Ejemplo 5: Modelo animal 1

[0088] Se compraron ratones macho NC/Nga (16 a 18 g, 5 semanas de edad; adquiridos en Central Laboratory Animal Inc.), se adaptaron durante 7 días y, a continuación, se utilizaron en este experimento. Los ratones adaptados se dividieron en cinco grupos de la siguiente manera después de inducirles dermatitis con prurito.

(1) Normal: grupo de control normal;

(2) Vehículo (grupo inducido por dermatitis): grupo de control negativo en el que se indujo dermatitis con prurito mediante extractos de ácaros del polvo doméstico;

(3) IV: un grupo de prueba en el que los exosomas preparados en el Ejemplo 2 se inyectaron por vía intravenosa (IV) a una dosis de 2,8 µg/cabeza tres veces por semana durante dos semanas, después de que se indujera dermatitis con prurito por extractos de ácaros del polvo doméstico;

(4) SC: un grupo de prueba en el que los exosomas preparados en el Ejemplo 2 se inyectaron por vía subcutánea (SC) a una dosis de 2,8 µg/cabeza tres veces por semana durante dos semanas, después de que se indujera dermatitis con prurito por extractos de ácaros del polvo doméstico; y

(5) Pred: un grupo de prueba en el que se administró prednisolona por vía oral todos los días, después de que se indujera dermatitis con prurito por extractos de ácaros del polvo doméstico.

[0089] Las aurículas de cada uno de los ratones NC/Nga (adquiridos en Central Laboratory Animal Inc.) se afeitaron con maquinilla y a continuación se depilaron aplicando una cantidad adecuada de un depilatorio. Después de limpiar el depilatorio, se aplicó uniformemente a las aurículas reactivo de inducción AD (extractos de ácaros del polvo doméstico; adquirido en BioStir Inc.) mediante una punta de micropipeta. Después de afeitarse con maquinilla, si era necesario, se aplicaron uniformemente 150 µl de solución acuosa de SDS al 4 % a las aurículas mediante una punta de micropipeta. Después de que las aurículas se secaran con aire frío de una secadora y se secaran adicionalmente de forma natural durante aproximadamente 2 a 3 horas, se aplicó reactivo de inducción AD uniformemente a las aurículas mediante una punta de micropipeta. Todos los tratamientos previos se realizaron dos veces por semana durante 3 semanas, es decir, seis veces en total.

[0090] Antes de comenzar la administración de los exosomas preparados en el Ejemplo 2, se realizó una evaluación de puntuación clínica de la piel. Según las puntuaciones clasificadas, los animales se agruparon aleatoriamente para que la puntuación media de cada grupo se distribuyera lo más uniformemente posible.

Ejemplo 6: Modelo animal 2

[0091] Para evaluar el efecto dependiente de la dosis de los exosomas, los ratones se dividieron en 9 grupos de la siguiente manera después de inducir dermatitis con prurito, tal como se describe en el Ejemplo 5 anterior.

(1) Normal: grupo de control normal (indicado por "N" en la figura 8);

(2) Control (grupo inducido por dermatitis): un grupo de control negativo en el que se indujo dermatitis con prurito mediante extractos de ácaros del polvo doméstico (indicado por "C" en la figura 8);

(3) IV, L (exosoma, bajo): un grupo de prueba en el que los exosomas preparados en el Ejemplo 2 anterior se inyectaron por vía intravenosa (IV) a una dosis de 0,14 µg/cabeza tres veces por semana durante 4 semanas, después de que se indujera dermatitis con prurito por extractos de ácaros del polvo doméstico;

(4) IV, M (exosoma, medio): un grupo de prueba en el que los exosomas preparados en el Ejemplo 2 anterior se inyectaron por vía intravenosa (IV) a una dosis de 1,4 µg/cabeza tres veces por semana durante 4 semanas, después de que se indujera dermatitis con prurito por extractos de ácaros del polvo doméstico;

(5) IV, H (exosoma, alto): un grupo de prueba en el que los exosomas preparados en el Ejemplo 2 anterior se inyectaron por vía intravenosa (IV) a una dosis de 10 µg/cabeza tres veces por semana durante 4 semanas, después de que se indujera dermatitis con prurito por extractos de ácaros del polvo doméstico;

(6) SC, L (exosoma, bajo): un grupo de prueba en el que los exosomas preparados en el Ejemplo 2 anterior se inyectaron por vía subcutánea (SC) a una dosis de 0,14 µg/cabeza tres veces por semana durante 4 semanas, después de que se indujera dermatitis con prurito por extractos de ácaros del polvo doméstico;

(7) SC, M (exosoma, medio): un grupo de prueba en el que los exosomas preparados en el Ejemplo 2 anterior se inyectaron por vía subcutánea (SC) a una dosis de 1,4 µg/cabeza tres veces por semana durante 4 semanas, después de que se indujera dermatitis con prurito por extractos de ácaros del polvo doméstico;

(8) SC, H (exosoma, alto): un grupo de prueba en el que los exosomas preparados en el Ejemplo 2 anterior se inyectaron por vía subcutánea (SC) a una dosis de 10 µg/cabeza tres veces por semana durante 4 semanas, después de que se indujera dermatitis con prurito por extractos de ácaros del polvo doméstico; y

(9) Pred: un grupo de prueba en el que se administró prednisolona por vía oral todos los días, después de que se indujera dermatitis con prurito por extractos de ácaros del polvo doméstico (indicado por "P" en la Figura 8).

[0092] La inducción de dermatitis se realizó tal como se describe en el Ejemplo 5, y se aplicó una cantidad excesiva de reactivo de inducción de AD de modo que la puntuación media clínica de la piel en el momento de la administración de los exosomas fue 9. Antes de comenzar la administración de los exosomas preparados en el Ejemplo 2, se realizó una evaluación de la puntuación clínica de la piel. Según las puntuaciones clasificadas, los animales se agruparon aleatoriamente para que la puntuación media de cada grupo se distribuyera lo más uniformemente posible.

Ejemplo 7: Medición de niveles de expresión de ARNm de citocinas

[0093] Con el fin de examinar si los exosomas de la presente invención tienen el efecto de suprimir y aliviar el prurito y si los exosomas pueden aplicarse ampliamente contra el prurito causado por diversos factores, se analizaron los niveles de expresión de ARNm de IL-4 e IL-31. La IL-4 es ampliamente conocida como una citocina inductora de prurito, y se informó que el prurito cutáneo se induce en ratones transgénicos que expresan IL-4 en la epidermis (Journal of Investigative Dermatology (2001) 117, págs. 977-983). Además, se informó que la IL-31 se sobreexpresa en pacientes con dermatitis atópica que muestran prurito y que el prurito es inducido en ratones transgénicos que sobreexpresan IL-31 (J Allergy Clin Immunol (2006) 117, págs. 411-417). Además, se informó que la IL-31 induce prurito al unirse al receptor 31RA/OSMR (European Journal of Allergy and Clinical Immunology (2018) 73, págs. 29-36) y que el tratamiento con un anticuerpo contra el receptor A de IL-31 alivia prurito (New England Journal of Medicine (2017) 376; 9, págs. 826-835). En consecuencia, si se analizan los niveles de producción o expresión de IL-4 e IL-31 en el tejido de la piel o en la sangre después del tratamiento con una sustancia candidata, se podrían evaluar los efectos de la sustancia candidata sobre la supresión y el alivio del prurito.

[0094] En primer lugar, se sacrificaron animales del modelo animal 1 del Ejemplo 5 y del modelo animal 2 del Ejemplo 6 y se diseccionó el tejido del sitio de la lesión cutánea de los mismos. Posteriormente, a partir del ARN total obtenido del tejido diseccionado de animales del modelo animal 1, se sintetizó ADNc y se sometió a PCR en tiempo real. Los cambios en los niveles de expresión del ARNm de IL-4 e IL-31, que son las principales causas de prurito, se midieron mediante PCR en tiempo real. Además, a partir del ARN total obtenido del tejido diseccionado de animales del modelo animal 2, se sintetizó ADNc y se sometió a PCR en tiempo real. Los cambios en los niveles de expresión del ARNm de IL-4 e IL-31, que son las principales causas de prurito, se midieron mediante PCR en tiempo real. Como gen de referencia para normalizar la expresión de los genes anteriores, se utilizó el gen de GAPDH. Las secuencias de los cebadores utilizados en la PCR en tiempo real se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Genes	Secuencias	
	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')
IL-4	ACA GGA GAA GGG ACG CCA T (SEQ ID NO: 1)	GAA GCC CTA CAG ACG AGC T CA (SEQ ID NO: 2)
IL-31	CAC ACA GGA ACA ACG AAG C C (SEQ ID NO: 3)	CGA TAT TGG GGC ACC GAA G (SEQ ID NO: 4)
GAPDH	CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA (SEQ ID NO: 5)	CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG A T (SEQ ID NO: 6)

[0095] A través del experimento en el modelo animal 1, se confirmó que los niveles de expresión tanto de IL-4 como de IL-31 (que causan prurito) en todos los grupos tratados (IV y SC) con los exosomas de la presente invención disminuyeron (figuras 7A y 7B). Además, mediante el experimento en el modelo animal 2, se confirmó que los niveles de expresión tanto de IL-4 como de IL-31 (que causan prurito) en todos los grupos tratados (IV y SC) con los exosomas de la presente invención disminuyeron de manera dependiente de la dosis (figuras 8A y 8B). Por lo tanto, los exosomas de la presente invención son capaces de actuar contra IL-4 e IL-31 (que son las dianas principales que causan prurito) y, por lo tanto, pueden aplicarse ampliamente contra el prurito causado por diversos factores y pueden suprimir de manera eficaz y aliviar el prurito.

Ejemplo 8: Medición del efecto supresor de TSLP utilizando células HaCaT

[0096] Se sabe que TSLP se sobreexpresa en células epiteliales humanas o queratinocitos de pacientes con prurito severo y es una sustancia que causa prurito en la piel. Por tanto, al confirmar si una sustancia candidata específica

suprime o no la TSLP inducida en los queratinocitos de la piel, se puede confirmar el efecto de la sustancia candidata sobre la supresión o el alivio del prurito. Se suspendieron células HaCaT de queratinocitos humanos en DMEM (adquirido de ThermoFisher Scientific) suplementado con FBS al 10 %, anfotericina B al 1 % (adquirido de Sigma) y 1% de penicilina-estreptomicina, y a continuación se sembraron en cada pocillo de una placa de 12 pocillos a una densidad de 1×10^5 células y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células se cultivaron adicionalmente en medio DMEM sin suero durante 24 horas. A continuación, las células adherentes se lavaron dos veces con PBS, y en medio libre de suero, no tratadas o tratadas con Poli I:C (adquirido en Sigma) e histamina (adquirida en Sigma) sin o con los exosomas de la presente invención (exosomas preparado en el Ejemplo 2) según los grupos mostrados en la figura 9A, y se cultivaron durante 24 horas. A partir del ARN aislado de células HaCaT de cada grupo, se sintetizó ADNc y se sometió a PCR en tiempo real, y el cambio en el nivel de expresión del ARNm de TSLP, que es la principal causa de prurito, se midió mediante PCR en tiempo real. Como gen de referencia para normalizar la expresión del gen de TSLP, se utilizó el gen de β -actina. Las secuencias de los cebadores utilizados en la PCR en tiempo real se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Secuencias de nucleótidos de cebadores utilizados en PCR en tiempo real

Genes	Secuencias	
	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')
TSLP	GCTATCTGGTGCCCAGGCTAT (SEQ ID NO: 7)	CGACGCCACAATCCTTGTAAT (SEQ ID NO: 8)
β -actina	GGCCATCTCTTGCTCGAAGT (SEQ ID NO: 9)	GACACCTTCAACACCCCAGC (SEQ ID NO: 10)

[0097] Además, se suspendieron células HaCaT de queratinocitos humanos en DMEM (adquirido de ThermoFisher Scientific) suplementado con FBS al 10 % (suero bovino fetal), anfotericina B al 1 % (adquirido de Sigma) y penicilina-estreptomicina al 1%, y, a continuación, se sembraron en cada pocillo de una placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^5 células y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células se cultivaron adicionalmente en medio DMEM sin suero durante 24 horas. A continuación, las células adherentes se lavaron dos veces con PBS, y en medio libre de suero, no tratadas o tratadas con Poly I:C (adquirido de Sigma) sin o con los exosomas de la presente invención (exosomas preparados en el Ejemplo 2) según los grupos mostrados en la figura 9B, y se cultivaron durante 24 horas. En cada grupo, la cantidad de proteína TSLP se midió mediante transferencia Western utilizando anticuerpo TSLP (Abcam, Cambridge, MA). La cantidad de proteína se cuantificó mediante ensayo BCA utilizando BSA (albúmina sérica bovina) como material de referencia. La cantidad de proteína TSLP en cada grupo se normalizó mediante la cantidad de proteína GAPDH.

[0098] Como resultado, se confirmó que los exosomas de la presente invención disminuyeron el nivel de expresión de ARNm y la producción de proteína de TSLP (que causa prurito) en los queratinocitos de la piel (Figuras 9A y 9B). Por tanto, los exosomas de la presente invención son capaces de actuar contra TSLP (que es una diana importante que causa el prurito) y, por tanto, suprimir y aliviar de manera eficaz el prurito.

Ejemplo 9: Prueba de capacidad de penetración en la piel de los exosomas

[0099] Para preparar exosomas teñidos con fluorescencia, se utilizó el colorante PKH67 (adquirido en Sigma). Se diluyó PKH67 1 mM en Diluyente C (adquirido en Sigma) para preparar una solución de PKH67 10 μ M. La solución se mezcló con una concentración adecuada de solución de exosomas y se dejó reaccionar a temperatura ambiente en condiciones de protección contra la luz durante 10 minutos. Después de completar la reacción, se usó una columna de centrifugación MW3000 (adquirida de ThermoFisher Scientific) para eliminar el colorante PKH67 libre restante de los exosomas teñidos con PKH67 (en lo sucesivo, abreviado como "exosomas-PKH"). Después de eliminar el PKH67 que no reaccionaba con los exosomas, se realizó el análisis usando un fluorómetro (adquirido en Molecular Devices) y, como resultado, se confirmó que se detectó fluorescencia con suficiente intensidad en los exosomas-PKH (figura 10).

[0100] Los exosomas-PKH se dispersaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración adecuada, por ejemplo, una concentración de 1×10^5 partículas/ml a 1×10^9 partículas/ml, y se aplica a la superficie exterior de piel porcina. La piel porcina se cubrió con tela no tejida para evitar el secado de la solución de exosomas-PKH, y a continuación se dejaron reaccionar los exosomas-PKH y el tejido de la piel durante un tiempo adecuado, por ejemplo, de 30 minutos a 1 hora, de modo que los exosomas-PKH alcanzaron el tejido subcutáneo de la piel porcina. Alternativamente, después de que se aplicaron los exosomas-PKH a la superficie exterior de la piel porcina y se cubrió la piel con tela no tejida, se dejó que una microcorriente fluyera a través de la piel durante un tiempo predeterminado, por ejemplo, de 30 minutos a 1 hora. Una vez completada la reacción, el tejido de piel porcina se fijó durante la noche

en una solución de formaldehído al 3,7% y se lavó tres veces con PBS durante 5 minutos cada vez. El tejido de piel porcina lavado se empapó en una solución de sacarosa al 30 % y, a continuación, se trató con compuesto OCT. A continuación, el tejido se lavó tres veces con PBS durante 5 minutos cada vez y, a continuación, se seccionó con un micrótopo. La sección de tejido se colocó sobre un portaobjetos de vidrio. Mientras tanto, la preparación de la sección de tejido se puede realizar antes de fijar el tejido con solución de formaldehído. La fluorescencia detectada en los exosomas-PKH en la sección de tejido se observó utilizando un microscopio de fluorescencia. Como resultado, se confirmó que los exosomas-PKH se administraban a través de la epidermis del tejido de la piel porcina al tejido subcutáneo (figura 11). Tal como se muestra en la figura 11, los exosomas de la presente invención podían penetrar de manera eficaz a través de la barrera cutánea, de modo que podían administrarse de manera profunda en el tejido cutáneo y absorberse de forma eficaz en la piel.

[0101] Por lo tanto, un preparado externo para la piel o una composición cosmética que contenga los exosomas como principio activo actuará de manera eficaz en la prevención, supresión, alivio, mejora o tratamiento del prurito.

[0102] A continuación, se diseccionó el tejido de la piel de ratones sin pelo y se colocó en la cámara superior de una celda de difusión de Franz. El interior de la celda de difusión se llenó con PBS. Los exosomas-PKH se dispersaron en PBS a una concentración adecuada, por ejemplo, una concentración de 1×10^5 partículas/ml a 1×10^9 partículas/ml, y, a continuación, se aplicaron a la superficie exterior del tejido de la piel del ratón. En este momento, se colocó previamente una tela no tejida en la superficie exterior del tejido de la piel del ratón para evitar el secado de la solución de exosoma-PKH, y se inyectó la solución de exosoma-PKH entre la tela no tejida y el tejido de la piel. A continuación, se dejaron reaccionar los exosomas-PKH y el tejido de la piel durante 30 minutos a 1 hora. Alternativamente, después de inyectar la solución de exosoma-PKH entre la tela no tejida y el tejido de la piel, se dejó que una microcorriente fluyera a través del tejido de la piel durante un tiempo predeterminado, por ejemplo, de 30 minutos a 1 hora. Una vez completada la reacción, los exosomas-PKH liberados en el tejido de la piel se observaron inmediatamente con un microscopio de fluorescencia confocal (Leica, SP8X), o se dejaron reaccionar adicionalmente el tejido de la piel y la solución de exosomas-PKH durante 1 a 6 horas y, a continuación, se observaron los exosomas-PKH con un microscopio de fluorescencia confocal. Como resultado, se confirmó que los exosomas de la presente invención son capaces de penetrar de manera eficaz a través de la barrera cutánea, de modo que los exosomas de la presente invención pueden administrarse profundamente en el tejido de la piel y absorberse eficazmente en la piel (figuras 12 y 13).

[0103] Por lo tanto, un preparado externo para la piel o una composición cosmética que contenga los exosomas como principio activo actuarán de manera eficaz en la prevención, supresión, alivio, mejora o tratamiento del prurito.

Ejemplo 10: Tratamiento de piel humana con una composición que contiene exosomas como principio activo

[0104] Un "producto de prueba" compuesto por una ampolla que contiene los exosomas obtenidos según una realización de la presente invención (que contiene una composición líquida lechosa translúcida), una mascarilla de lámina empapada en líquido (una mascarilla de lámina blanca empapada con el líquido lechoso translúcido anterior) y una mascarilla de lámina que favorece la penetración percutánea (una mascarilla de lámina plateada que incluye un dispositivo de iontoforesis) se aplicó una vez en la cara de una persona con enrojecimiento facial severo y problemas de la piel asociados con prurito (en lo sucesivo, denominado "caso 1"). Se evaluó si los problemas de la piel y el enrojecimiento de la cara se aliviaron o mejoraron. Además, el producto de prueba se aplicó una vez a la cara de una persona con enrojecimiento facial (en lo sucesivo, denominado "caso 2"). Se evaluó si el tono general de la piel y el enrojecimiento de la cara mejoraron.

[0105] Con una sola utilización del "producto de prueba" que contiene los exosomas de la presente invención, el enrojecimiento de la cara y los problemas de la piel del "caso 1" mejoraron notablemente (ver caso 1 de la Figura 15), y el tono general de la piel del "caso 2" mejoró y el enrojecimiento de la cara del "caso 2" se alivió (ver caso 2 de la figura 15). Por lo tanto, un preparado externo para la piel o una composición cosmética que contiene los exosomas de la presente invención como principio activo tiene el efecto de prevenir, suprimir, aliviar o mejorar el enrojecimiento de la cara y los problemas de la piel asociados con el prurito.

[0106] Además, la composición que contiene los exosomas obtenida según una realización de la presente invención, es decir, una suspensión que contiene los exosomas de la presente invención, se aplicó a las partes afectadas (mano, cuello, brazo, etc.) de tres pacientes atópicos graves que se quejaban de prurito, tres veces por semana durante 1 a 2 semanas, y, a continuación, se realizó iontoforesis permitiendo que una microcorriente fluyera a través de la parte afectada a la que se aplicó la composición usando un dispositivo de iontoforesis. Como resultado, el prurito severo en los pacientes se alivió notablemente y el eritema de los pacientes también mejoró notablemente (Figura 16). En los pacientes a los que se aplicó la composición que contiene los exosomas de la presente invención, se aliviaron y mejoraron el prurito y el eritema severos, de modo que se suspendió la prescripción de esteroides o antihistamínicos para estos pacientes.

[0107] De este modo, un preparado externo para la piel o una composición cosmética que contiene, como principio activo, los exosomas obtenidos mediante el procedimiento de aislamiento según una realización de la presente

invención, presenta el efecto de prevenir, suprimir, aliviar, mejorar o tratar el prurito, según lo confirmado mediante las pruebas clínicas descritas anteriormente.

Ejemplo 11: Preparación de una composición cosmética que contiene exosomas de la presente invención

- 5 [0108] Se mezclaron 1704 µg/ml de los exosomas preparados en el ejemplo 2 anterior y con los componentes mostrados en la tabla 3 a continuación y se suspendieron en los mismos, preparando así una composición cosmética (loción). El contenido de cada componente se muestra en la tabla 3 a continuación.

10 **Tabla 3: Componentes y su contenido de loción que contiene exosomas de la presente invención**

Componentes	Contenido (% en peso)
Exosomas preparados en el Ejemplo 2	1
Glicerina	7,375
Triglicérido caprílico/cáprico	6
Etil hexanoato de cetilo	5
Propanodiol	5
Fenil trimeticona	3,5
Ácido esteárico	3
1,2-hexanodiol	2
Pantenol	2
Olivato de cetearilo	1,8
Olivato de sorbitán	1,2
Malato de diisosteárido	1
Fructano	1
Copolímero de Acriloldimetiltaurato de amonio/VP	0,3
Alcohol araquidílico	0,25
Alcohol behenílico	0,15
Glucósido de araquidilo	0,1
Lecitina hidrogenada	0,1
Manteca de karité	0,09
Goma xantana	0,05
Aceite de lavanda	0,02
Aceite de bergamota	0,02
Ceramida NP	0,02
Aceite de piel de naranja	0,02
Fitoesfingosina	0,015
Tetrapéptido de palmitoilo-7	0,01
Tripéptido de palmitoilo-1	0,01
Agua purificada	Equilibrio

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica para su utilización en prevenir, suprimir, aliviar, mejorar o tratar el prurito inducido por linfopoyetina estromal tímica (TSLP), comprendiendo la composición farmacéutica exosomas derivados de células madre como principio activo.
- 10 2. Composición farmacéutica para su utilización, según la reivindicación 1, en la que los exosomas disminuyen los niveles de expresión de IL-4, IL-31 y TSLP en el tejido de la piel o en las células de la piel.
- 15 3. Preparado externo para la piel para su utilización en prevenir, suprimir, aliviar, mejorar o tratar el prurito inducido por linfopoyetina estromal tímica (TSLP), comprendiendo el preparado externo para la piel exosomas derivados de células madre como principio activo.
- 20 4. Preparado externo para la piel para su utilización, según la reivindicación 3, en el que los exosomas están contenidos o mezclados con al menos uno de hidrogel, ácido hialurónico, sal de ácido hialurónico y gel de hialuronato.
- 25 5. Preparado externo para la piel para su utilización, según la reivindicación 4, en el que el hidrogel se obtiene dispersando un polímero gelificado en un alcohol polihídrico.
- 30 6. Preparado externo para la piel para su utilización, según la reivindicación 5, en el que el polímero gelificado es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en plurónico, agar purificado, agarosa, goma gellan, ácido algínico, carragenano, goma casia, goma xantana, galactomanano, glucomanano, pectina, celulosa, goma guar y goma de algarroba, y el alcohol polihídrico es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, isobutilenglicol, dipropilenglicol, sorbitol, xilitol y glicerina.
- 35 7. Composición para su utilización en prevenir, suprimir, aliviar o mejorar el prurito inducido por linfopoyetina estromal tímica (TSLP), comprendiendo la composición exosomas derivados de células madre como principio activo.
8. Composición para su utilización, según la reivindicación 7, en la que la composición se usa en al menos una forma seleccionada del grupo que consiste en parches, paquetes de mascarillas, láminas de mascarillas, cremas, tónicos, pomadas, suspensiones, emulsiones, pastas, lociones, geles, aceites, paquetes, aerosoles, vaporizadores, bases, polvos y papeles oleosos.
9. Composición para su utilización, según la reivindicación 8, en la que la composición se aplica o se empapa en al menos una superficie del parche, paquete de mascarilla o lámina de mascarilla.

FIG. 1

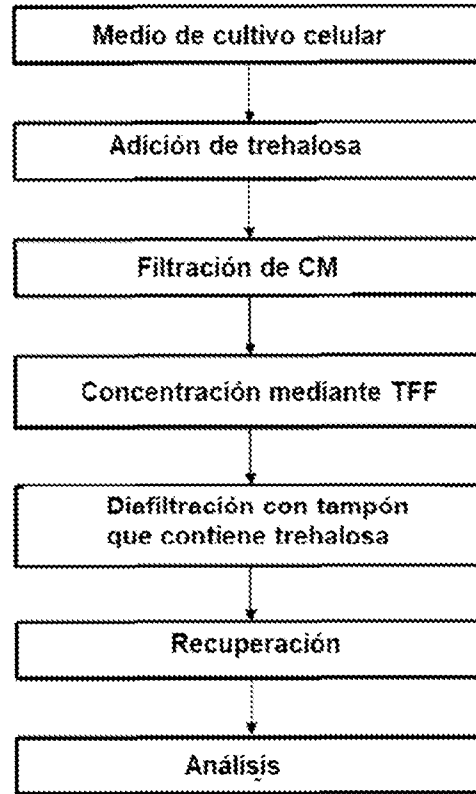


FIG. 2

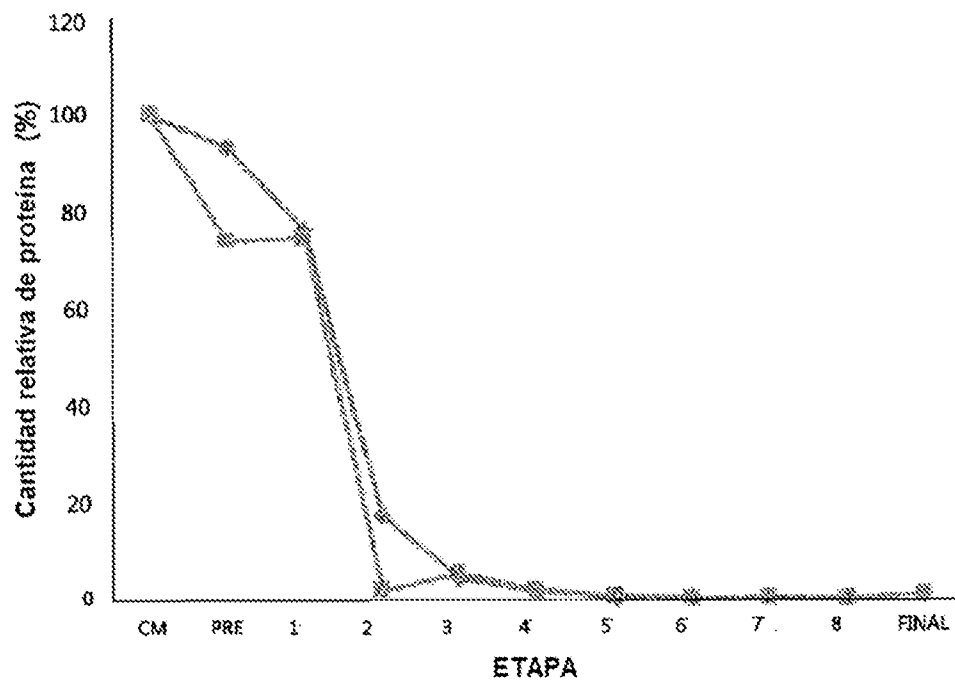


FIG. 3

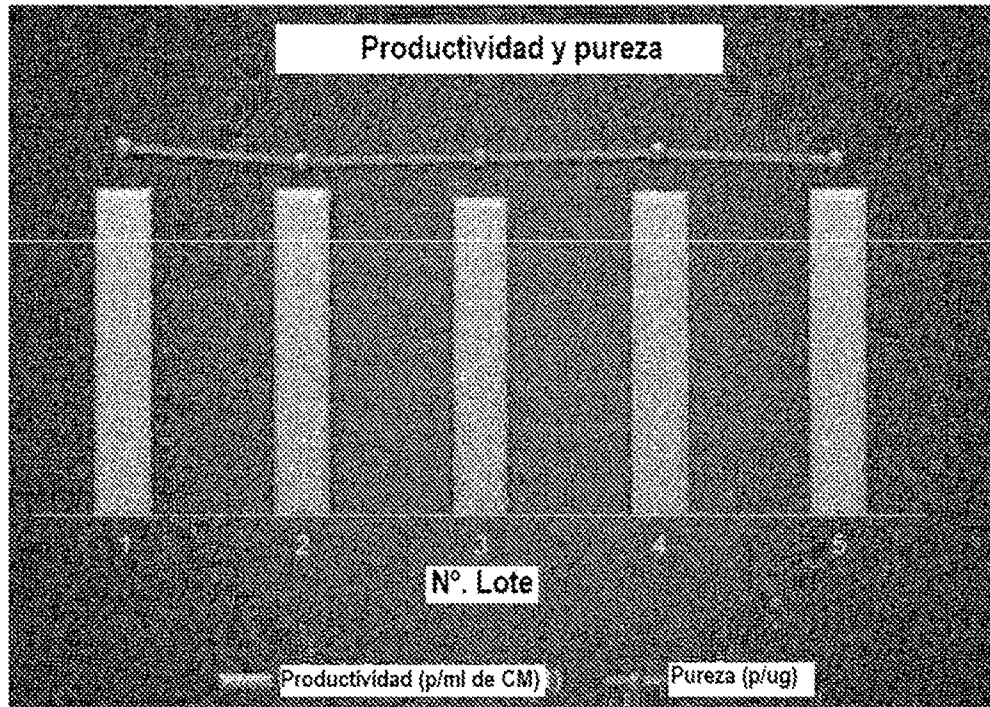


FIG. 4A

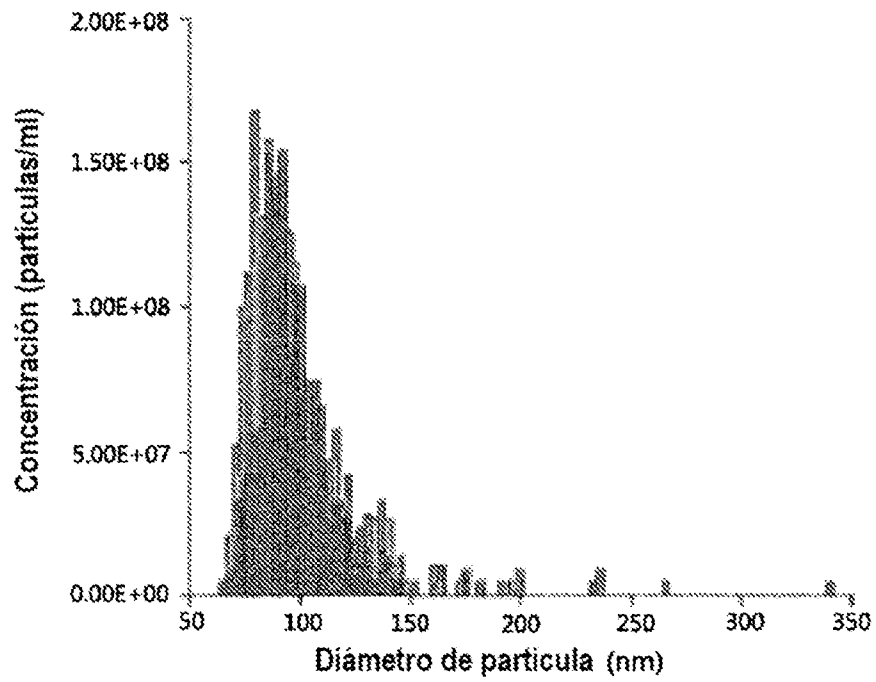


FIG. 4B

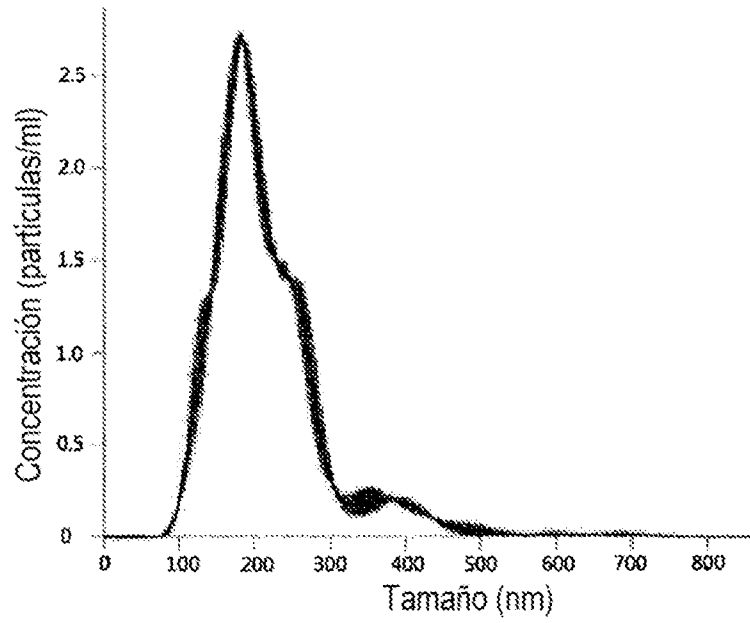


FIG. 4C

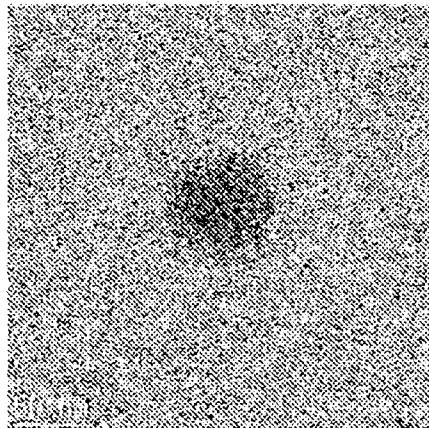
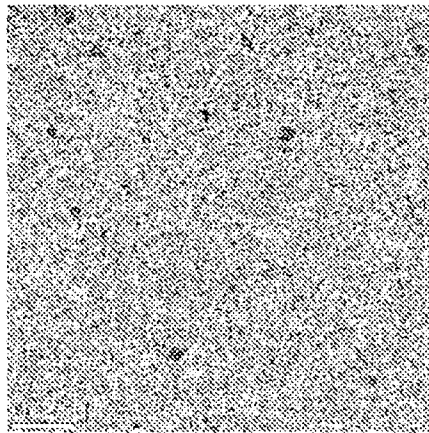


FIG. 4D

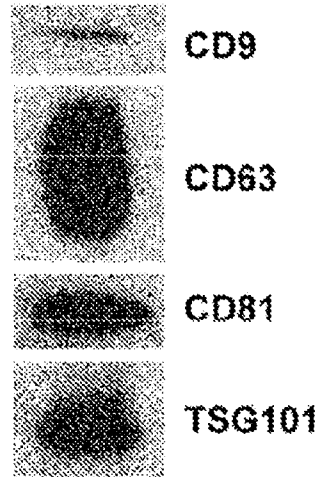


FIG. 4E

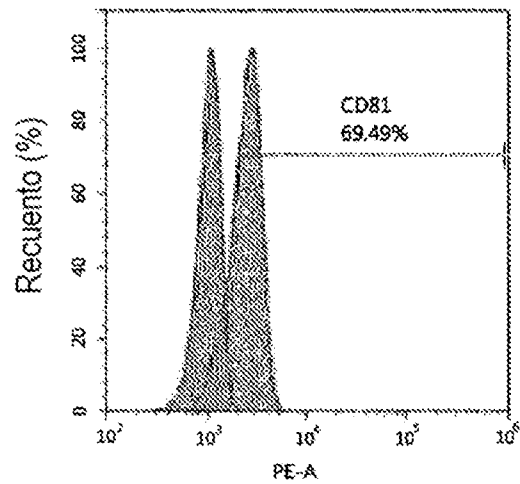
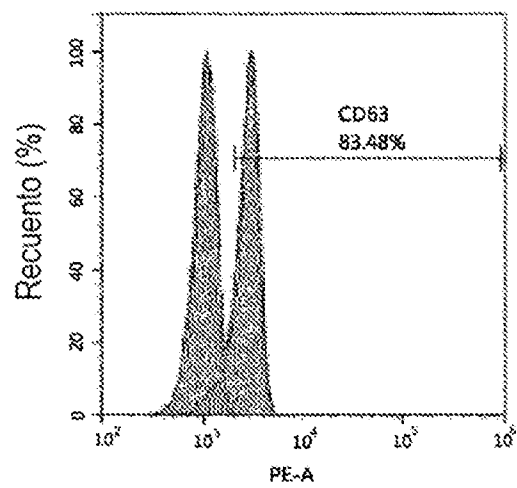


FIG. 5A

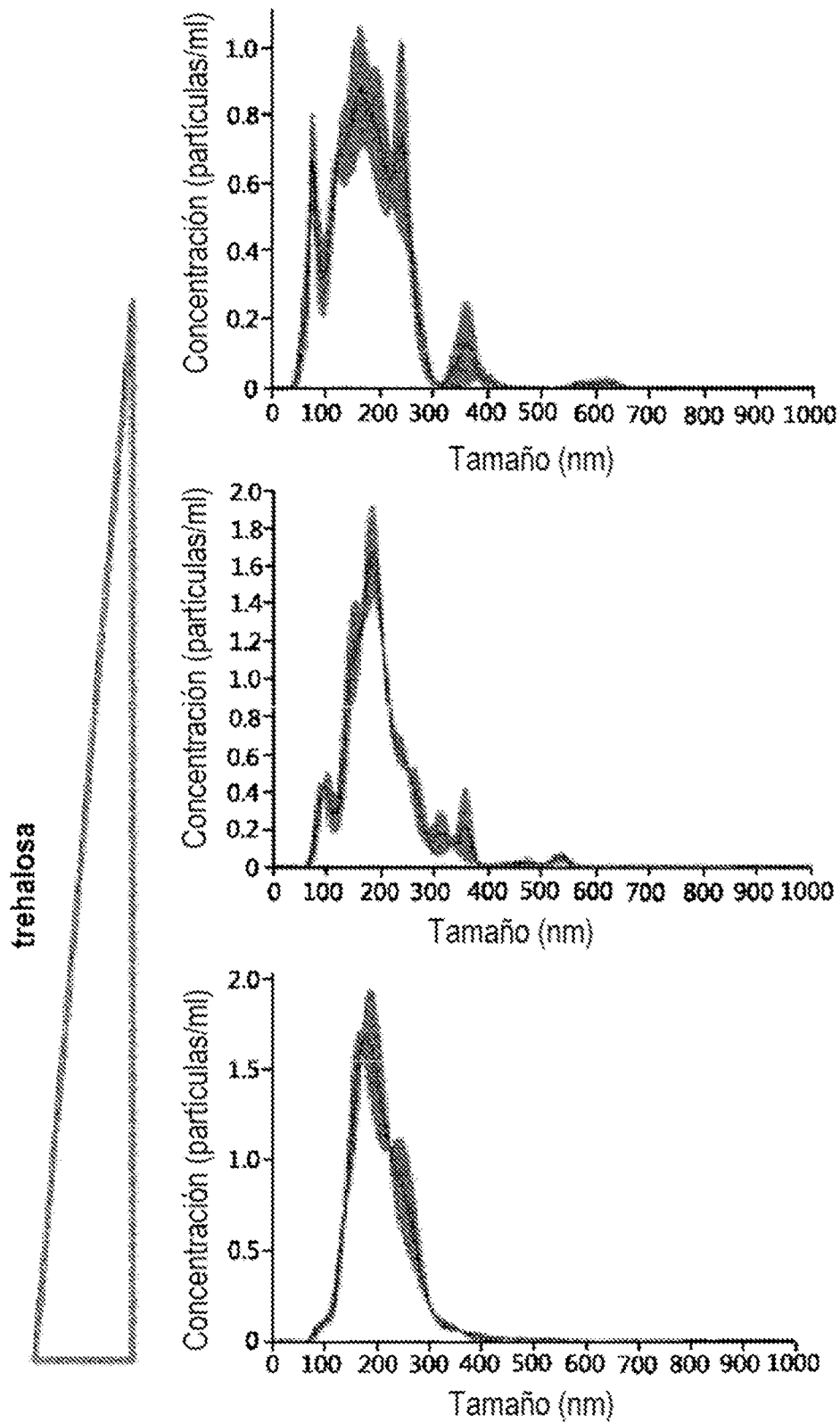


FIG. 5B

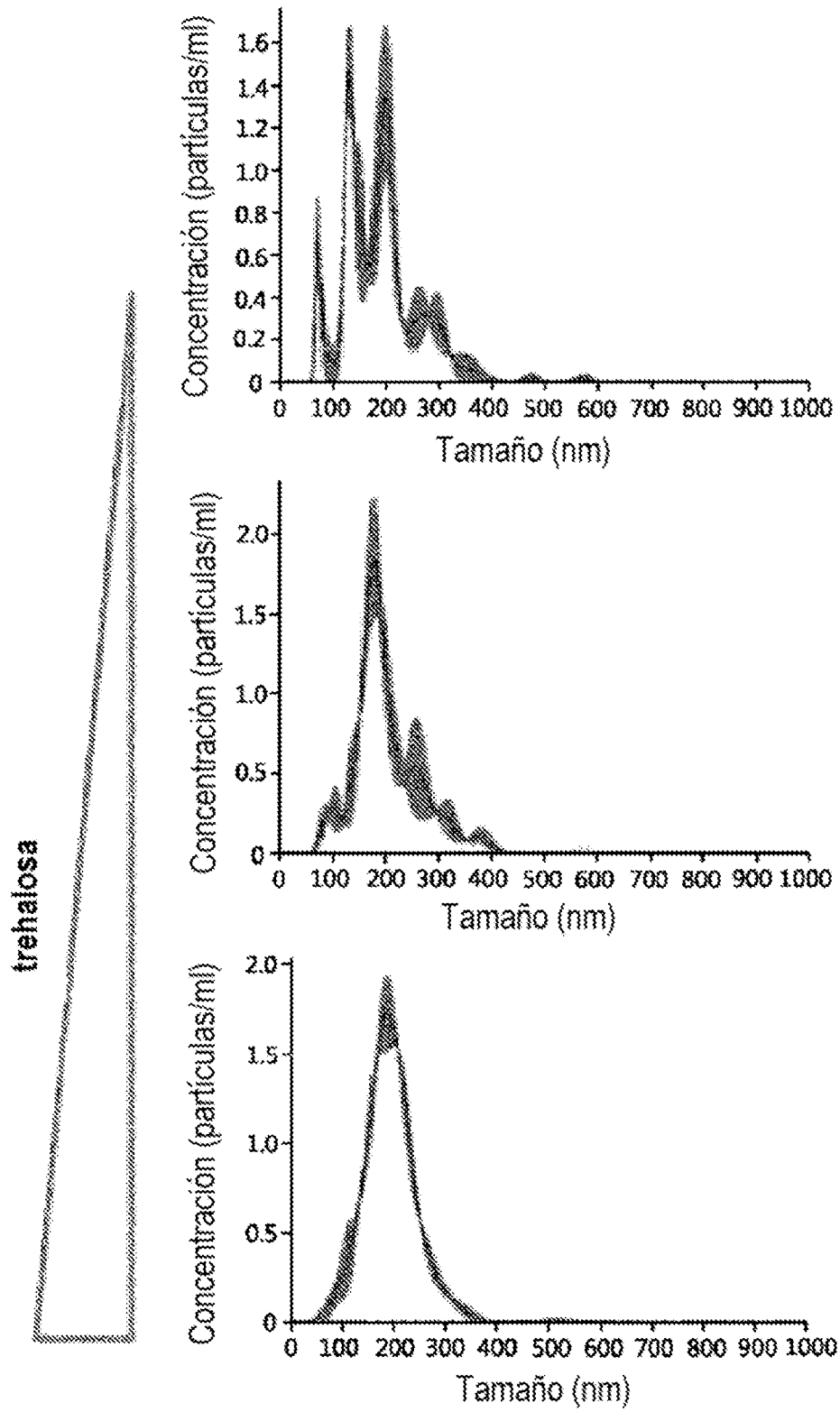


FIG. 5C

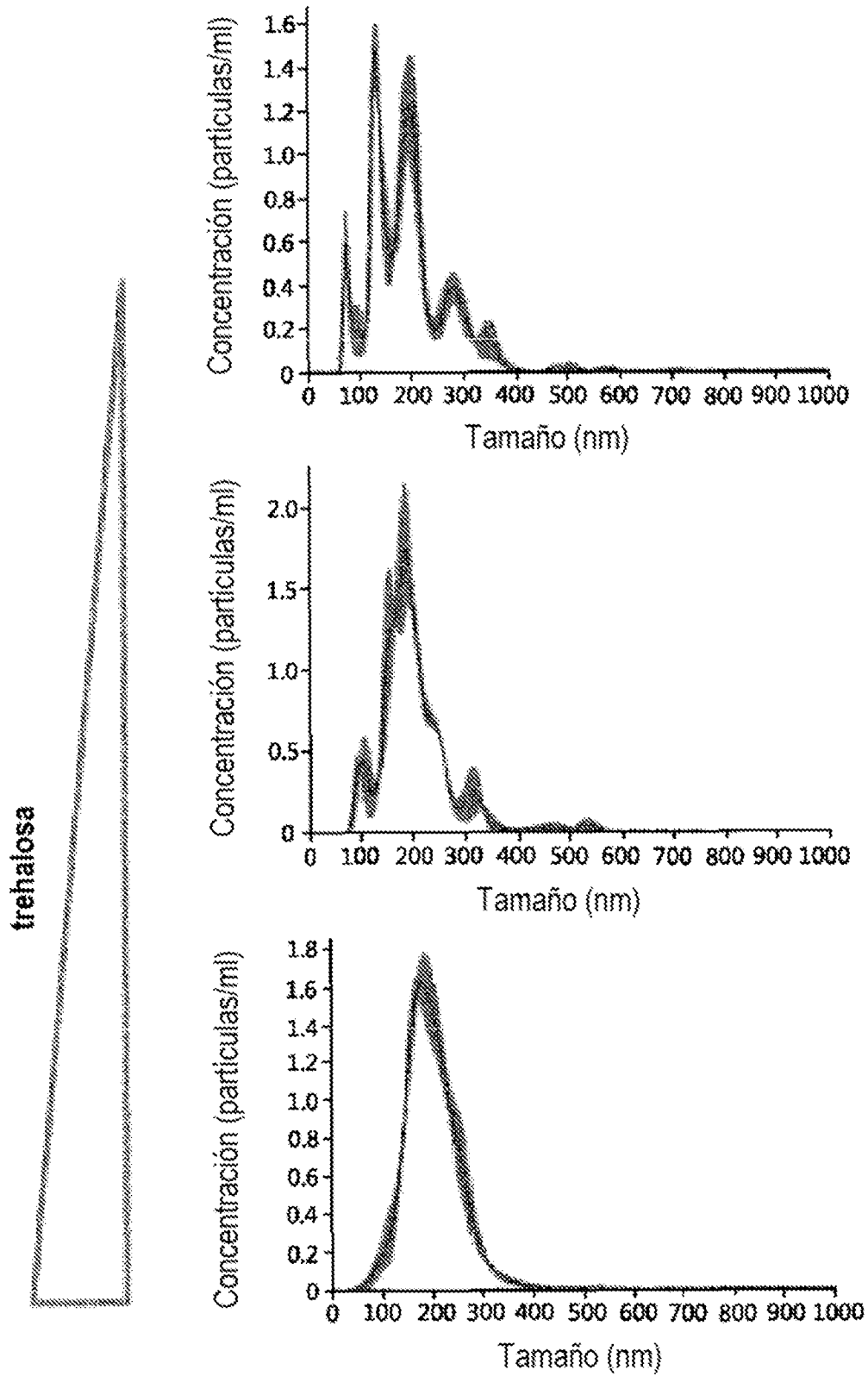


FIG. 6A

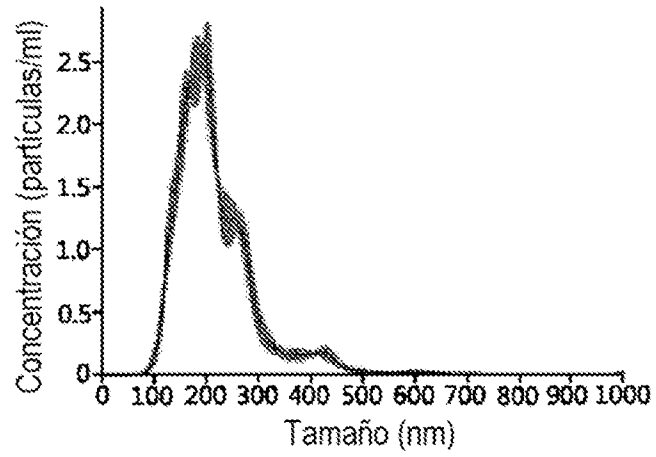


FIG. 6B

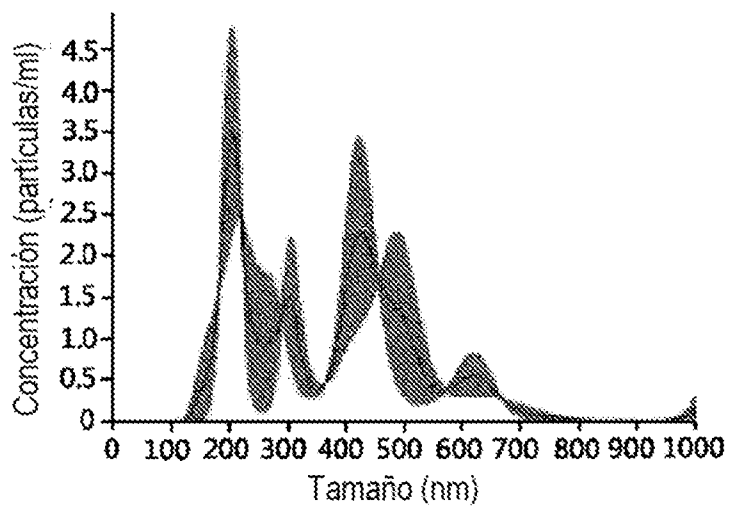


FIG. 6C

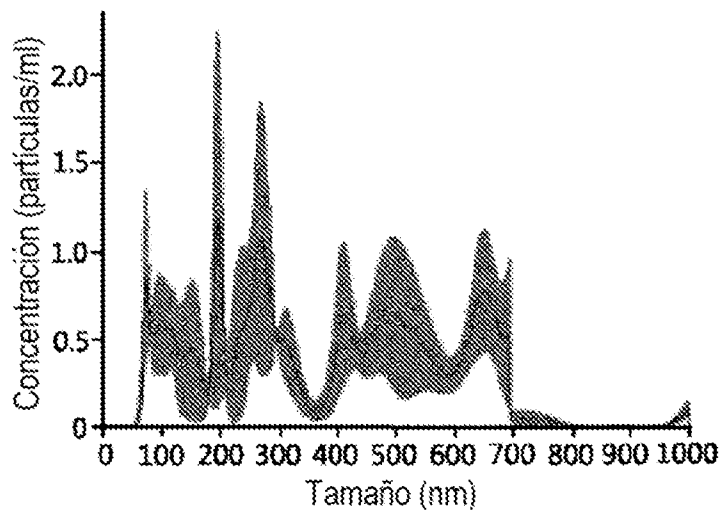


FIG. 6D

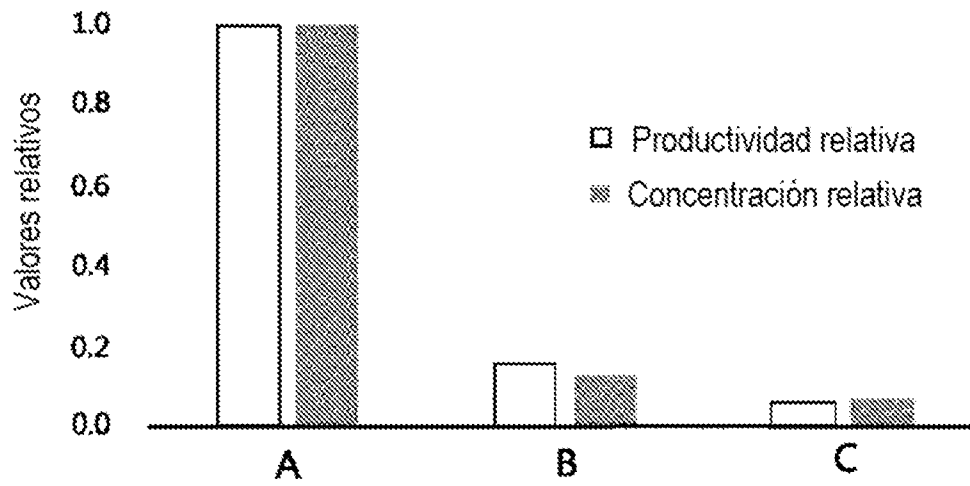


FIG. 6E

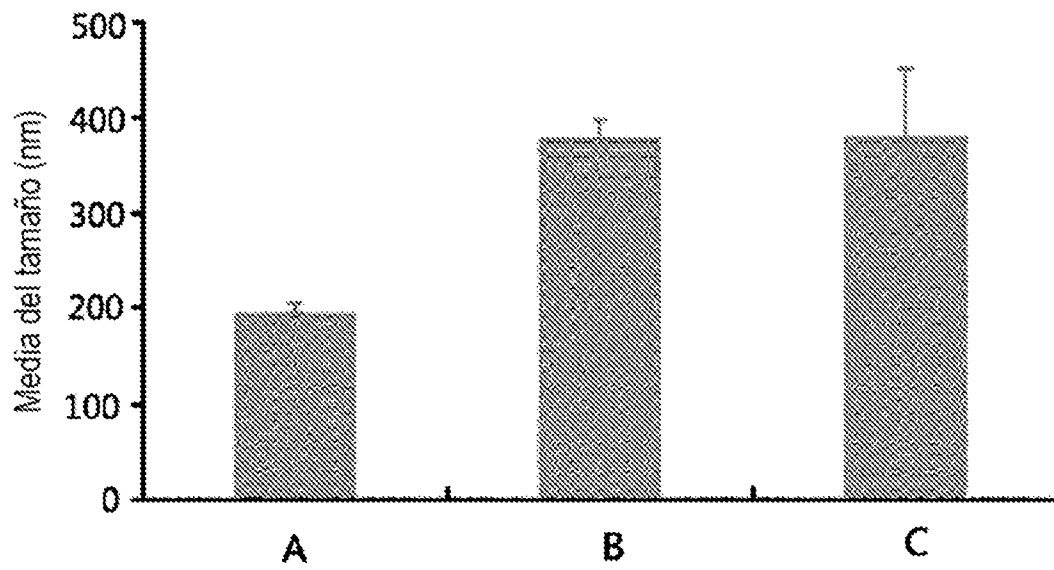


FIG. 7

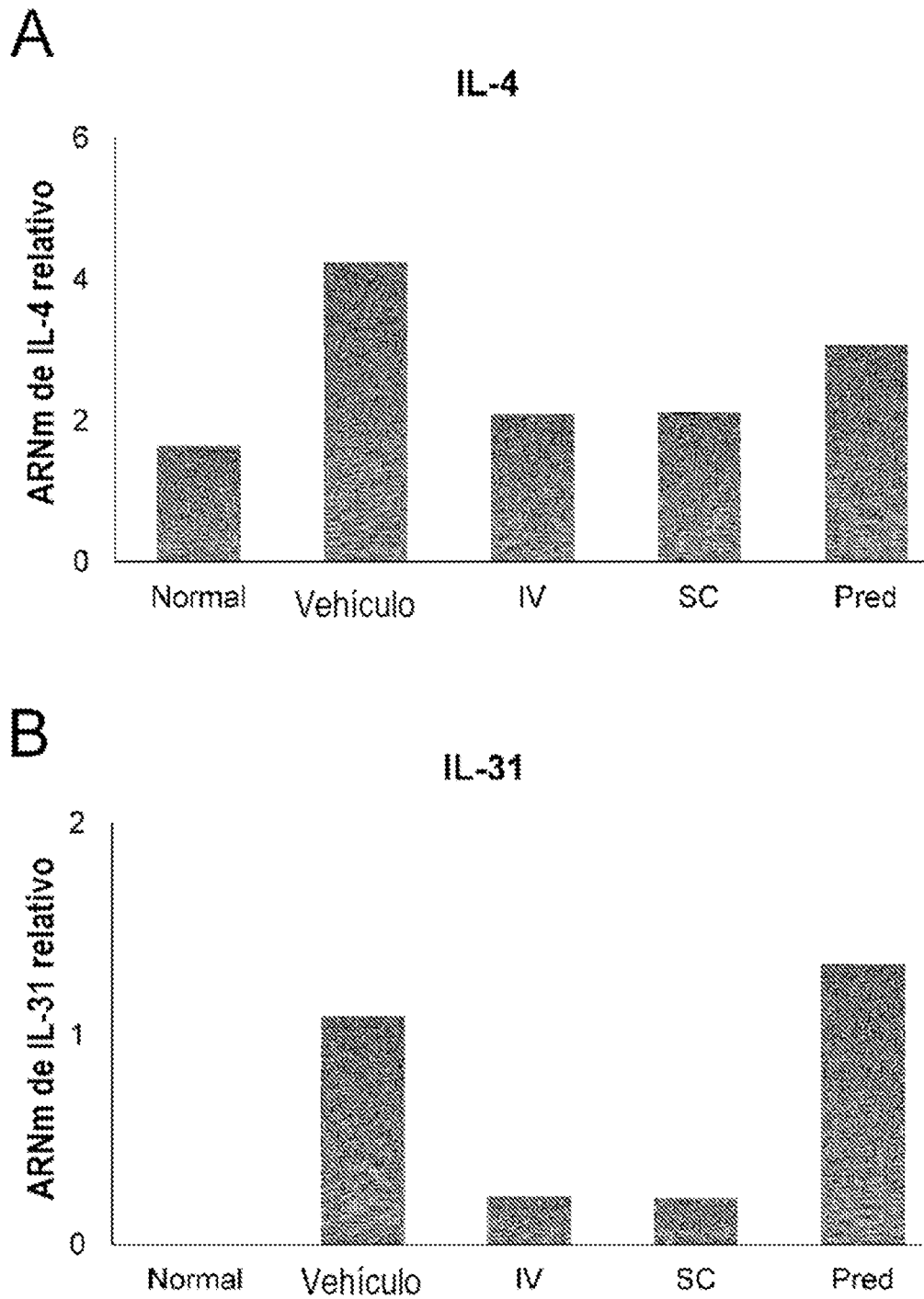


FIG. 8

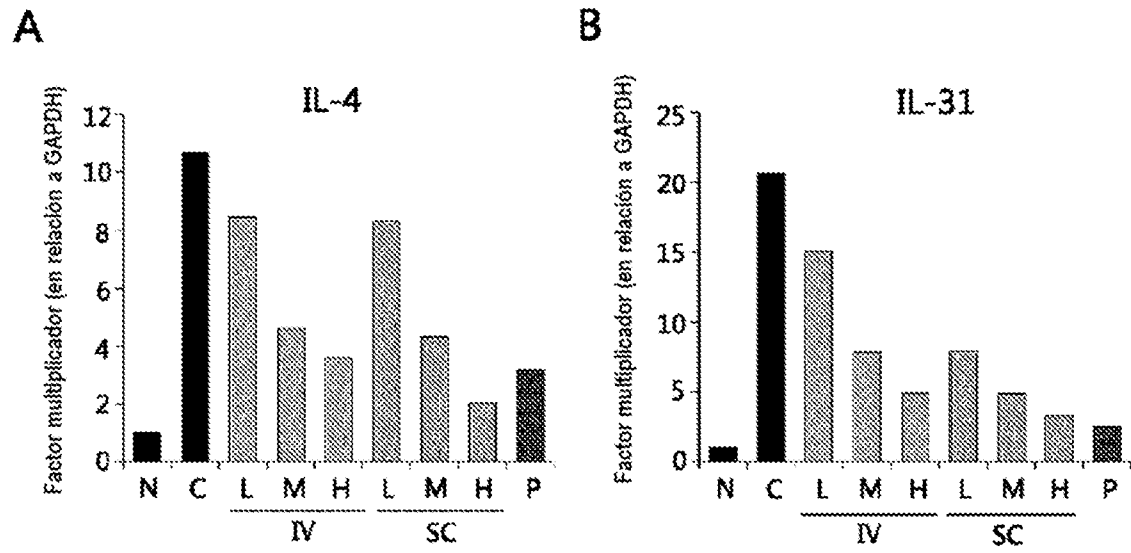
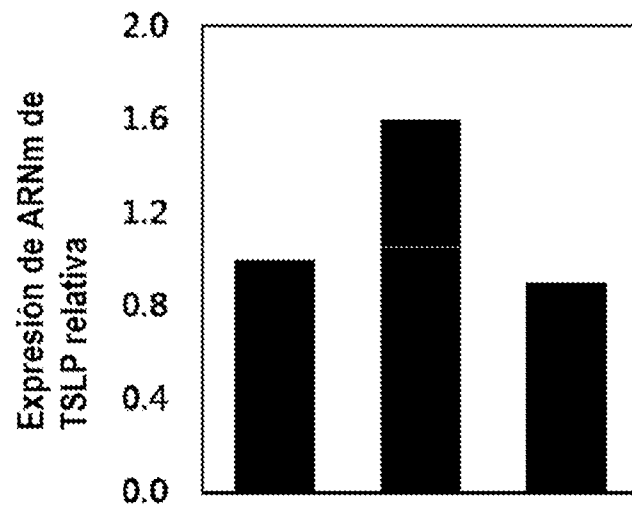


FIG. 9A



Poli I:C 100 µg/mL	-	+	+
Histamina 100 µM	-	+	+
Exosoma (6 µg/mL)	-	-	+

FIG. 9B

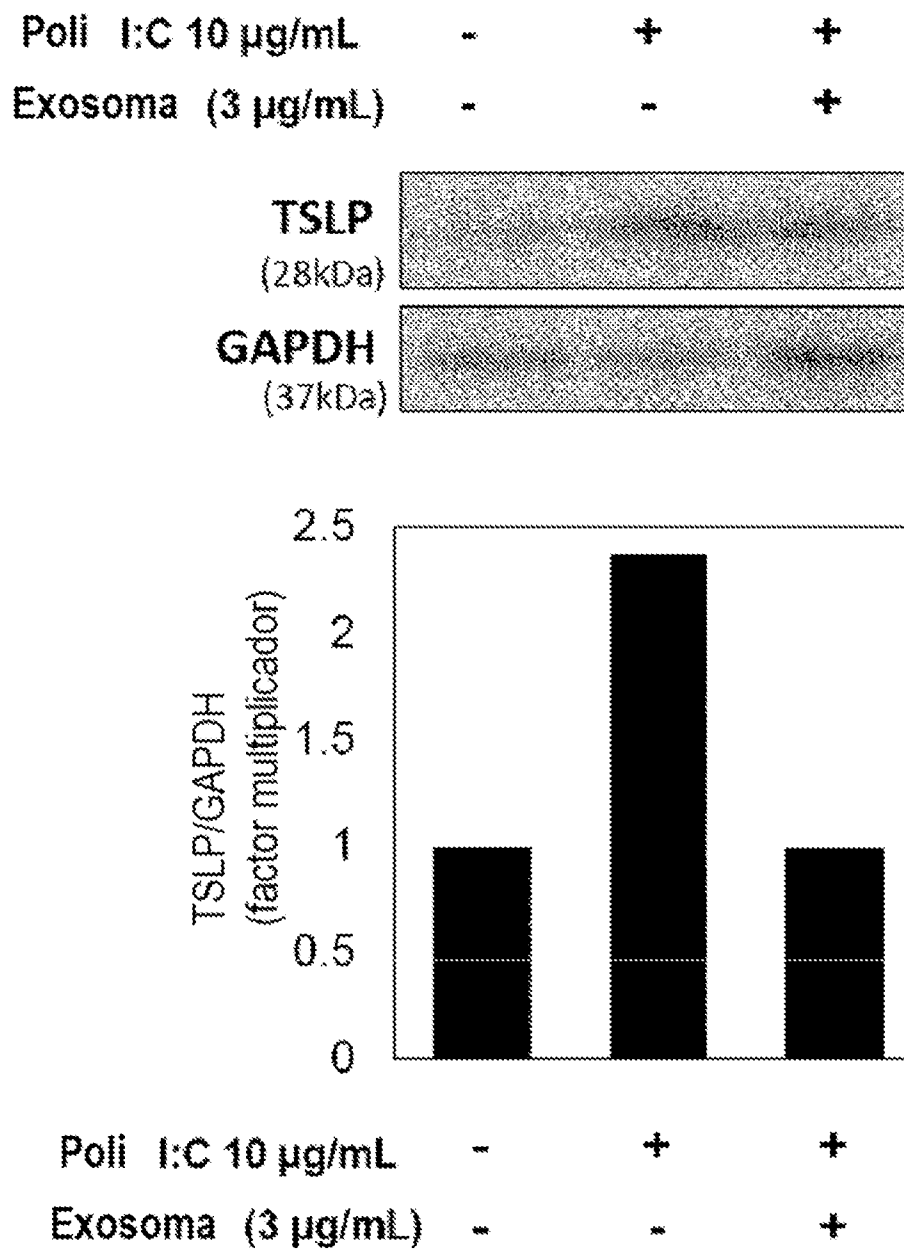


FIG. 10

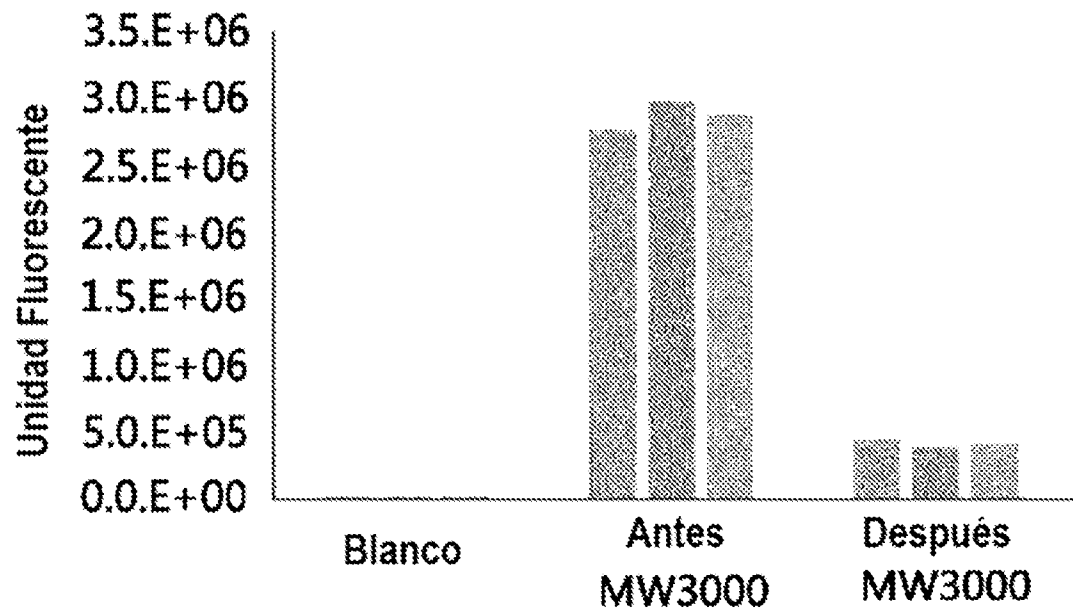


FIG. 11

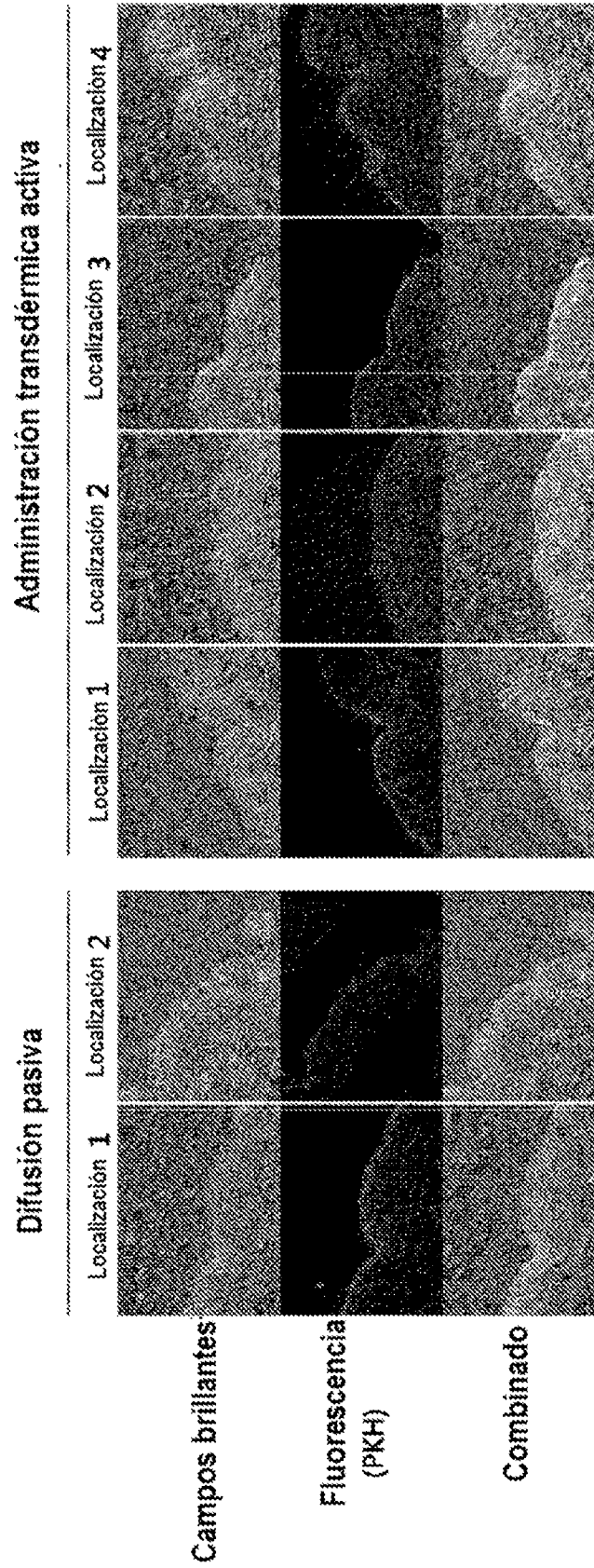


FIG. 12

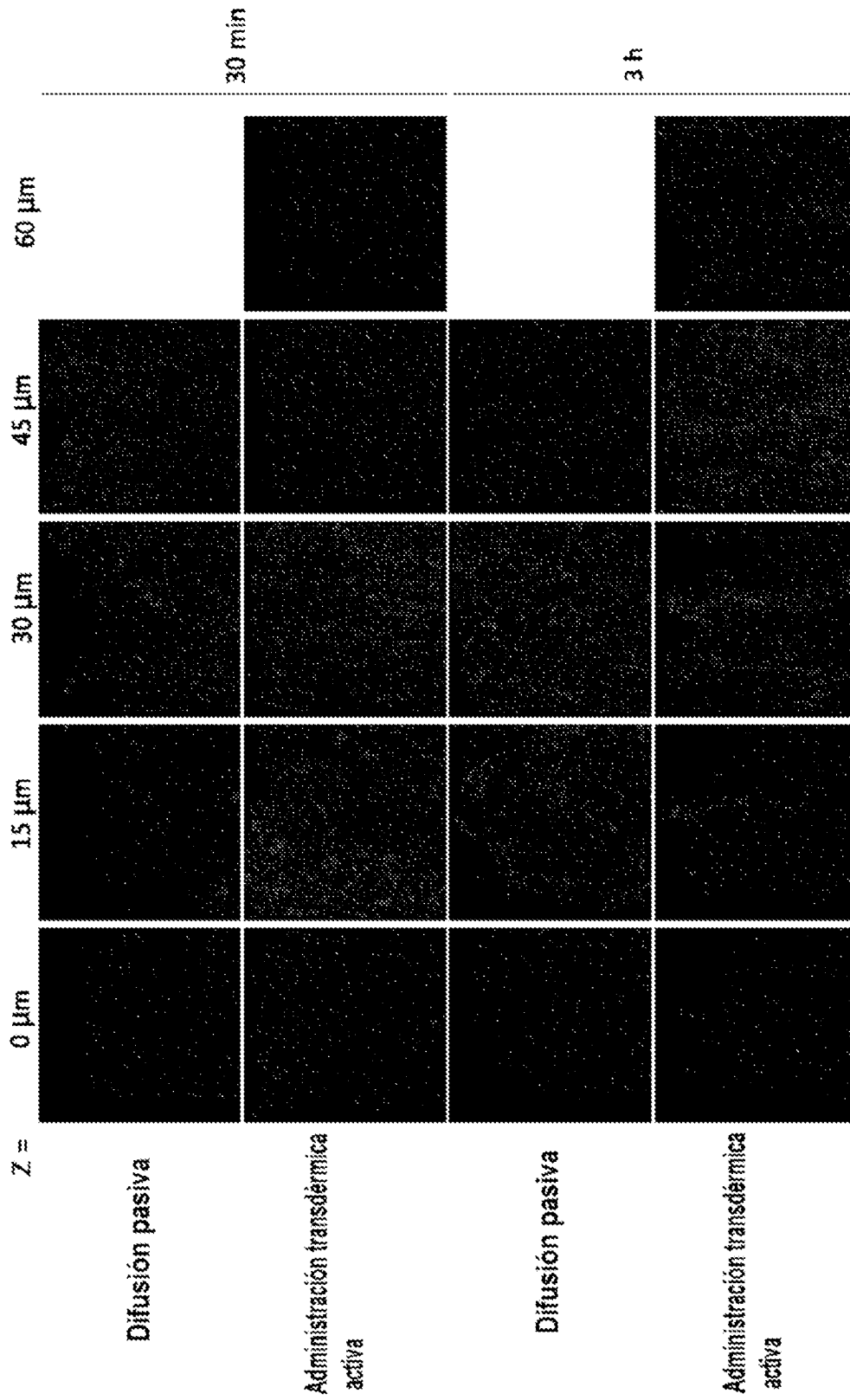


FIG. 13

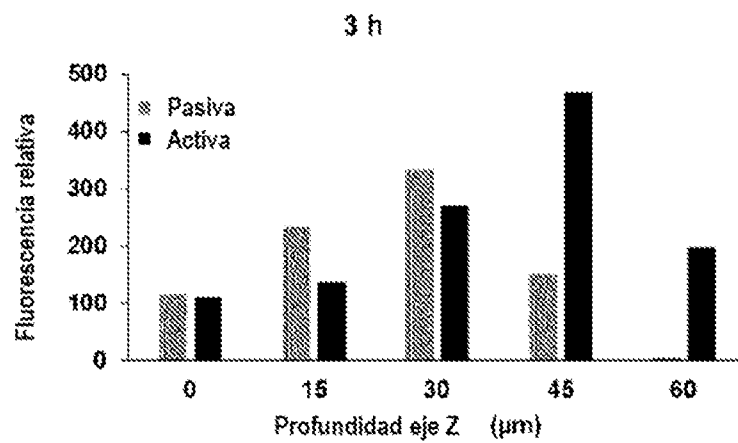
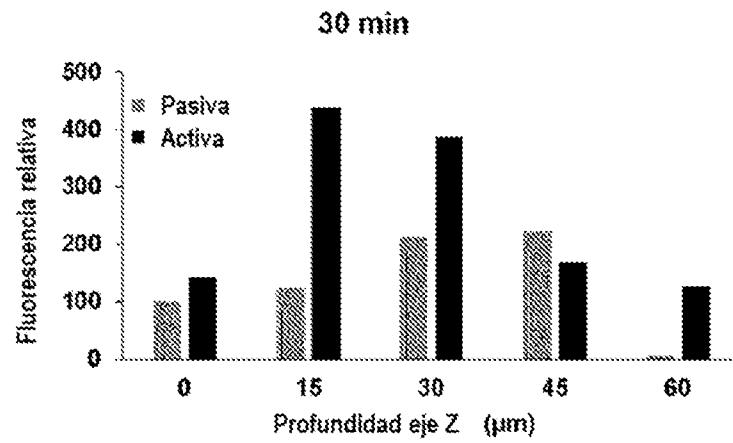


FIG. 14

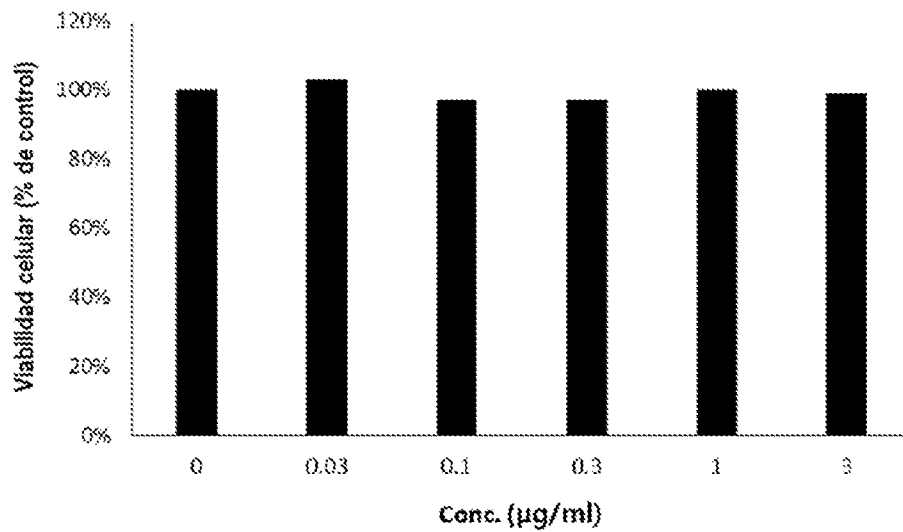


FIG. 15

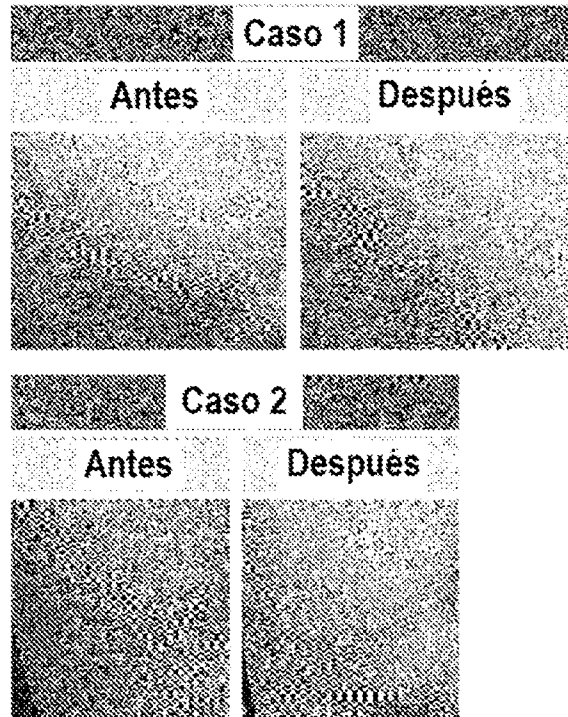


FIG. 16

