

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 236**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/05** (2006.01)

**A61K 8/34** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2010 E 10820610 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2484349**

54 Título: **4-Isobutilresorcinol, como inhibidor de la actividad de la heparanasa, para prevenir o suprimir la formación de arrugas**

30 Prioridad:

**30.09.2009 JP 2009228209**

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

**25.04.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**IRIYAMA, SHUNSUKE;  
FUKUNISHI, HIROTADA;  
SUETSUGU, MASARU y  
AMANO, SATOSHI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 457 236 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**

4-Isobutilresorcinol, como inhibidor de la actividad de la heparanasa, para prevenir o suprimir la formación de arrugas

**Campo técnico**

- 5 La presente invención se refiere a un método no terapéutico para prevenir o suprimir la formación de arrugas, que comprende la administración de 4-isobutilresorcinol como ingrediente activo.

**Técnica anterior**

- 10 La Heparanasa está presente en una diversidad de células tales como plaquetas, leucocitos, células endoteliales y células de músculo liso, como enzima que degrada específicamente cadenas de heparán sulfato en diversos tipos de proteoglicano de heparán sulfato. En la piel, en particular, se produce por queratinocitos epidérmicos que componen la epidermis y fibroblastos o células endoteliales vasculares de la dermis. También se sabe que su producción es elevada en diversos tipos de células cancerosas.

- 15 El proteoglicano de heparán sulfato (HSPG, del Inglés "Heparan Sulfate Proteoglycan"), el cual es degradado por heparanasa, es un polímero encontrado en diversas superficies celulares de tejido animal y matrices extracelulares, y se sabe que tiene funciones que incluyen la acumulación extracelular de factores de crecimiento de unión a heparán sulfato (bFGF, del inglés "Basic Fibroblast Growth Factor" (factor de crecimiento de fibroblasto básico), HGF, del inglés "Hepatocyte Growth Factor" (factor de crecimiento de hepatocito), VEGF del inglés "Vascular Endothelial Growth Factor" (factor de crecimiento endotelial vascular), HB-EGF del inglés "Heparin Binding EGF-like Growth Factor" (factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina) y similares).

- 20 El perlecano, un tipo de proteoglicano de heparán sulfato, también está presente en la membrana basal epidérmica en la interfaz entre la epidermis y la dermis, y une los factores de crecimiento de unión a heparán sulfato a la membrana basal epidérmica, controlando la migración de factores de crecimiento entre la epidermis y la dermis. El perlecano también controla los factores de crecimiento para las células basales epidérmicas que se unen a la membrana basal, y se ha demostrado que es esencial para el crecimiento adecuado y diferenciación de la epidermis. Por consiguiente, la descomposición de las cadenas de heparán sulfato de perlecano mediante la activación o expresión acelerada de heparanasa altera la liberación de factores de crecimiento acumulados y controla los factores de crecimiento en la epidermis y la dermis, conduciendo a la interrupción del control de diferenciación y crecimiento de la epidermis y espesamiento de la dermis, y fomentando la formación de arrugas (véase el documento PCT/JP2009/056717). En otras palabras, la inhibición de la actividad de la heparanasa suprime la liberación de los factores de crecimiento que acompañan a la descomposición del heparán sulfato, y permite la migración de los factores de crecimiento entre la epidermis y la dermis a controlar, ayudando de ese modo en el antienvejecimiento de la piel.

- 35 También se ha sugerido una relación entre la heparanasa y la malignidad del cáncer. En particular, se sabe que las células cancerosas con producción aumentada de heparanasa tienen mayor capacidad proliferativa y metástica, e inducibilidad aumentada de la angiogénesis (documento No-Patente 1). También se sabe que la heparanasa tiene una función de aceleración de la curación de herida (Documento No-Patente 2). Por lo tanto, la inhibición eficaz de la actividad de la heparanasa es eficaz para los propósitos que incluyen la supresión de la proliferación o metástasis de células cancerosas y la supresión de la angiogénesis.

**Documentos de técnica anterior**

- 40 Documentos no-patente

Documento no-patente 1: Vlodaysky I., et al., *Semin Cancer Biol.*, 2002; 12(2):121-129

Documento no-patente 2: Zacharia E., et al., *FASEB J.* 2005 Feb; 19(2):211-21

**Compendio de la invención**

Problemas a resolver por la invención

- 45 Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente explicados, ha sido una meta encontrar sustancias que puedan inhibir eficazmente la actividad de la heparanasa.

Es un objetivo de la presente invención, la cual se ha realizado en consideración a lo anterior, proporcionar un inhibidor de la actividad de la heparanasa que pueda inhibir eficazmente la actividad de la heparanasa, y un agente de mejoramiento de arruga y una composición cosmética que emplee el inhibidor de la actividad de la heparanasa.

50

**Medios para resolver los problemas**

Como resultado de muchas investigaciones diligentes, los presentes inventores encontraron que el 4-isobutilresorcinol inhibía eficazmente la actividad de la heparanasa.

Específicamente, el quid de la presente invención es el que sigue:

- 5 (1) Un método no terapéutico para prevenir o suprimir la formación de arrugas, que comprende la administración de 4-isobutilresorcinol como ingrediente activo.
- (2) El método de acuerdo con (1), en el que las arrugas están causadas por nivel reducido de heparán sulfato en la membrana basal epidérmica.
- (3) El método de acuerdo con (1) ó (2), en el que se inhibe la actividad de la heparanasa.
- 10 (4) El método de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), en el que el 4-isobutilresorcinol se administra por administración oral, administración parenteral o administración local.
- (5) El método de acuerdo con (4), en el que el 4-isobutilresorcinol está presente en una preparación externa para la piel en el intervalo de al menos 0,0001% en masa, preferiblemente no mayor de 1% en masa, como la masa seca de la preparación externa total.

**15 Efecto de la invención**

Puesto que el 4-isobutilresorcinol puede inhibir eficazmente la actividad de la heparanasa, se puede usar adecuadamente como ingrediente activo en un método de mejoramiento de arruga, para prevenir o suprimir la formación de arrugas (particularmente arrugas grandes).

**Breve descripción de los dibujos**

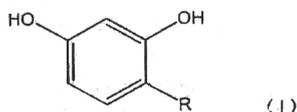
- 20 Fig. 1 es un gráfico que muestra la diferencia en la actividad de la heparanasa en queratinocitos humanos normales, bajo condiciones no irradiadas e irradiadas con ultravioleta;
- Fig. 2 es un conjunto de imágenes de inmunotinción para heparanasa y heparán sulfato en secciones no irradiadas e irradiadas con ultravioleta de tejido humano de nalga.
- 25 Fig. 3(a) y 3(b) son ambos diagramas esquemáticos de modelos de pseudo-piel, donde la Fig. 3(a) muestra un “modelo descompuesto de heparán sulfato” (heparán sulfato (-)) sin heparán sulfato presente en la lámina de membrana basal, mientras que la Fig. 3(b) muestra un “modelo normal” (heparán sulfato (+)) con heparán sulfato presente en la lámina de membrana basal;
- Fig. 4 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación para permeabilidad de VEGF usando los modelos de pseudo-piel de la Fig. 3(a) y 3(b);
- 30 Fig. 5 es un conjunto de fotografías que muestran los resultados de la evaluación para angiogénesis usando los modelos de pseudo-piel de la Fig. 3(a) y 3(b); y
- Fig. 6 es un gráfico que muestra los resultados del análisis para el área de vaso sanguíneo en la fotografía de la Fig. 5.

**El mejor modo de llevar a cabo la Invención**

- 35 Los presentes inventores han buscado sustancias que pueden inhibir eficazmente la actividad de la heparanasa y han investigado diversos compuestos como indicadores de la inhibición de la actividad de la heparanasa, y como resultado han completado esta invención tras encontrar derivados específicos de resorcinol que suprimen significativamente la actividad de la heparanasa.
- 40 Se ha sabido por completo en la técnica anterior que los derivados de resorcinol presentan acción inhibitora sobre la actividad de la heparanasa. Los documentos JP-H2-49715A y JP2006-124358A describen el uso de los derivados específicos de resorcinol como blanqueadores de la piel, y JP2007-254412A describe el uso de los derivados específicos de resorcinol en las preparaciones externas para la piel para la prevención o mejoramiento de arrugas, pero estas publicaciones no contienen descripción con respecto al efecto inhibitor sobre la actividad de la heparanasa.
- 45 En particular, el documento JP2007-254412A enseña que la presencia de heparina (un tipo de heparán sulfato) en células promueve la desintegración de la estructura fascicular del colágeno y conduce a la formación de arruga (véase el párrafo [0006]), y sugiere que los derivados de resorcinol reducen la heparina intracelular previniendo así la desintegración de la estructura fascicular del colágeno, pero esto es completamente diferente de la acción inhibitora sobre la actividad de la heparanasa por los derivados de resorcinol descritos en la presente invención. Es decir, la inhibición de la actividad de la heparanasa de acuerdo con la invención causa la supresión de la
- 50

descomposición de las cadenas de heparán sulfato del proteoglicano de heparán sulfato, de modo que la abundancia de heparán sulfato (heparina, etc.) en células se puede mantener a un alto nivel.

Específicamente, un inhibidor de la actividad de la heparanasa usado en el método no terapéutico para prevenir o suprimir arrugas de la invención contiene un 4-alkilresorcinol representado por la fórmula (I) como ingrediente activo.



En la fórmula, R representa isobutilo.

El método para producir el 4-alkilresorcinol de fórmula (I) no está particularmente restringido, pero puede haber mencionado un método de reacción Friedel-Crafts entre un ácido carboxílico saturado o haluro de ácido carboxílico saturado y resorcinol en presencia de un ácido de Lewis tal como cloruro de zinc o cloruro de aluminio, y reducción del 4-alkilresorcinol resultante con amalgama de zinc/ácido hidroclicórico (documentos JP-H06-51619A y USP2093778B), y un método de uso de uno o más compuestos seleccionados entre óxidos de metal específicos e hidróxidos como catalizadores para la reacción de alcohol con resorcinol en un estado supercrítico para producir 4-alkilresorcinol (documento JP2002-167344A).

El contenido del 4-alkilresorcinol de fórmula (I) en el inhibidor de la actividad de la heparanasa de la invención no está particularmente restringido siempre que sea una cantidad suficiente para presentar eficazmente inhibición contra la actividad de la heparanasa, y apropiadamente se puede seleccionar de acuerdo con el propósito del inhibidor de la actividad de la heparanasa. Sin embargo, generalmente, se prefiere que la proporción del 4-alkilresorcinol de fórmula (I) con respecto al inhibidor de la actividad de la heparanasa entera normalmente sea al menos de 0,0001% en masa y especialmente al menos 0,0001% en masa, y normalmente no mayor de 1% en masa y especialmente no mayor de 0,2% en masa.

El método no terapéutico para prevenir o suprimir las arrugas de acuerdo con la invención también puede comprender la administración de otros compuestos deseados además del 4-isobutilresorcinol, siempre que no afecte sustancialmente al efecto inhibidor del 4-isobutilresorcinol sobre la actividad de la heparanasa. Otros componentes incluyen otros compuestos con acción inhibidora sobre la actividad de la heparanasa (otros componentes activos), o vehículos médicamente aceptables y/o adyuvantes. Dichos otros componentes se pueden usar solos, o se pueden usar 2 o más en cualquier combinación y proporción deseada.

Un inhibidor de la actividad de la heparanasa se puede usar como cosmético, cuasi fármaco, composición farmacéutica o similares, o como un ingrediente compuesto en el mismo.

Una composición farmacéutica que contiene un inhibidor de la actividad de la heparanasa se puede usar para el tratamiento, mejoramiento o prevención de una enfermedad o síntoma asociado con la actividad de la heparanasa. Entonces, la "enfermedad o síntoma asociado con la actividad de la heparanasa" puede ser, por ejemplo, envejecimiento de la piel, proliferación o metástasis de célula cancerosa, angiogénesis, o similares. Por tanto, la composición cosmética de la invención se puede usar adecuadamente para el mejoramiento o la prevención del envejecimiento de la piel (anti-envejecimiento).

El envejecimiento natural es una causa principal de envejecimiento de la piel desde un punto de vista macroscópico, pero otras causas tales como la oxidación, la sequedad y la luz solar (rayos ultravioletas) son también factores directos relacionados con el envejecimiento de la piel. El fenómeno específico del envejecimiento de la piel se sabe que está asociado con el daño celular debido a la reducción en mucopolisacáridos que incluyen ácido hialurónico, reacción de reticulación de colágeno y rayos ultravioletas.

Se está llevando a cabo un gran acuerdo de investigación con la intención de inhibir o mejorar arrugas de la piel, arrugas finas, flacidez y similares, causados por el daño a la piel o el envejecimiento de la piel debido a la exposición al ultravioleta. Como resultado, se ha demostrado la eficacia para promover la producción del ácido hialurónico (documento JP2001-163794A), suprimir la producción y la activación de las metaloproteinasas de matriz (MMP, del Inglés "Matrix Metalloproteinases")(documento JP2000-503660X), promover la producción de colágeno e inhibir la activación de la esterasa (documento JP-H11-335235A), suprimir la angiogénesis (documento WO03/84302 y Solicitud de Patente Japonesa N° 2003-581562), y suprimir la linfangiectasia (K. Kajiya et al., *Am. J. Pathol.*, 2006, 169(4): 1496-1503).

Tal investigación en gran medida se divide en esfuerzos para prevenir y mejorar las arrugas finas, enfocada sobre la epidermis o células epidérmicas, y esfuerzos para prevenir y mejorar las grandes arrugas, enfocados sobre la supresión de cambios en la dermis incluyendo los vasos sanguíneos o vasos linfáticos. La propagación de los cambios en la epidermis a la dermis conduce a la alteración de la dermis, incluyendo los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos, y la heparanasa está intrincadamente implicada en el proceso.

De hecho, los presentes inventores han demostrado previamente que se obtiene un efecto anti arruga significativo al revestir un modelo de arruga fina con un inhibidor de la actividad de la heparanasa (documento PCT/JP2009/056717).

5 Tal como se explica en detalle en los ejemplos, los presentes inventores han demostrado que la irradiación de queratinocitos normales cultivados con rayos ultravioletas da como resultado la activación de la heparanasa de los queratinocitos normales (véase Fig. 1). También se demostró que la irradiación de piel humana con rayos ultravioletas aumenta la cantidad de heparanasa en la epidermis, y reduce el heparán sulfato en la membrana basal (véase Fig. 2). De ese modo se mostró que la activación de la heparanasa ocurre no solamente en modelos de arruga fina sino también por rayos ultravioletas.

10 Además, puesto que el heparán sulfato de membrana basal se descompone tras la activación de la heparanasa, los presentes inventores prepararon, como modelos de pseudo-piel, un modelo normal que contenía heparán sulfato en una membrana basal y un modelo descompuesto de heparán sulfato que no contenía heparán sulfato en la membrana basal, y evaluaron la permeabilidad de VEGF y la angiogénesis. Como resultado, se mostró que la permeabilidad de VEGF se aumentaba y la angiogénesis estaba inducida en el modelo descompuesto de heparán sulfato, en comparación con el modelo normal. (Véase Figs. 3 a 6).

15 Previamente, Yano et al. han indicado que la inducción de angiogénesis inducida por rayo ultravioleta en la dermis y la alteración de la dermis son importantes para la formación de arrugas grandes (Solicitud de Patente Japonesa N° 2002-580892), y han encontrado que la heparanasa es una enzima intrincadamente implicada no solamente en arrugas finas sino también en arrugas grandes. Es decir, la inhibición de la actividad de la heparanasa es eficaz no solamente para prevenir arrugas finas debidas a la sequedad sino también arrugas grandes debidas a la exposición prolongada al sol.

20 El término "antienvjecimiento", tal como se usa en la presente memoria, quiere decir prevención y mejoramiento de arrugas, flacidez y endurecimiento de la piel mediante la supresión de la alteración de la piel causada por la liberación de factores de crecimiento unidos a heparán sulfato debido a la descomposición del heparán sulfato de proteoglicano en la membrana basal mediante el envejecimiento o fotoenvejecimiento, y específicamente supresión de las anomalías de diferenciación epidérmica, angiogénesis de dermis, linfangiectasia y descomposición de elastina, para mantener un estado de la piel elástico, joven y saludable.

25 La ruta de administración y la forma de dosificación de la composición de la invención no están restringidas, y se pueden seleccionar como las apropiadas para el propósito. Ejemplos de rutas de administración incluyen: administración oral, administración parenteral (tal como administración intravenosa y administración intraperitoneal), administración local (tal como aplicación a la piel) y similares. Para la administración oral, la forma de dosificación puede ser una preparación sólida tal como un comprimido, comprimido revestido, comprimido revestido de azúcar, gránulos, polvos, cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina dura o suave) o una preparación líquida (solución o suspensión) tal como un fármaco líquido interno o jarabe. Para una administración parenteral, puede ser en forma de inyección o similares. Para la administración local, puede ser una forma en la cual un sistema de disolución, sistema solubilizado, sistema emulsionado, sistema disperso en polvo, sistema de dos capas agua/aceite, sistema de tres capas agua/aceite/polvo o similares, esté preparado como parche, pomada, crema, látex, agua cosmética, gel o aerosol.

30 El contenido del inhibidor de la actividad de la heparanasa de la invención en una composición cosmética de la invención tampoco está restringido, y se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el propósito, la forma de dosificación y la ruta de administración de la composición. Cuando la composición de la invención es una preparación externa para la piel, por ejemplo, se prefiere que el contenido del inhibidor de la actividad de la heparanasa de la invención normalmente esté en el intervalo de al menos 0,0001% en masa, y especialmente al menos 0,0001 % en masa, y normalmente no mayor de 1% en masa y especialmente no mayor de 0,2% en masa, como la masa seca (masa sólida) de la preparación externa total para la piel. Si el contenido es menor que este intervalo, el efecto del inhibidor de la actividad de la heparanasa de la invención tenderá a ser insuficiente, y si excede este intervalo, se puede esperar no efecto adicional en proporción al contenido aumentado, y la formulación también tenderá a llegar a ser difícil.

35 La composición de la invención también puede contener uno u otros más componentes deseados además del inhibidor de la actividad de la heparanasa de la invención, siempre que el efecto inhibidor sobre la actividad de la heparanasa mediante el inhibidor de la actividad de la heparanasa de la invención no esté sustancialmente afectado. No hay restricciones particulares sobre tales otros componentes, y se pueden seleccionar apropiadamente de acuerdo con el propósito, forma de dosificación y ruta de administración de la composición, pero los vehículos y/o adyuvantes médicamente aceptables pueden estar mencionados como ejemplos. Ejemplos de adyuvantes incluyen: diluyentes, ligantes, desintegradores, espesadores, agentes de dispersión, aceleradores de la reabsorción, correctivos del sabor, agentes de tamponamiento, tensioactivos, ayudantes de la disolución, conservantes, emulsionantes, agentes de isotonización, estabilizadores y reguladores de pH.

40 Como ejemplos específicos, cuando la composición de la invención se usa como una preparación externa para la piel, los componentes comúnmente usados en las preparaciones externas, tales como blanqueadores de la piel,

humectantes, antioxidantes, componentes de aceite, absorbentes de ultravioleta, tensioactivos, espesadores, alcoholes, constitutivos en polvo, agentes colorantes, componentes acuosos, agua o diversas preparaciones nutritivas de la piel, se pueden añadir apropiadamente si es necesario. Además, también puede haberse añadido cantidades de quelatos de ión metal tal como edetato de disodio, edetato de trisodio, citrato de sodio, polifosfato de sodio, metafosfato de sodio o ácido glucónico, agentes antisépticos tales como metilparabeno, etilparabeno o butilparabeno, cafeína, tanino, verapamil, ácido tranexámico o sus derivados, extracto de regaliz, agentes fármaco tales como glabridina, extracto en agua caliente de fruto del membrillo Chino ("Chinese quince"), productos galénicos, acetato de tocoferol, ácido glicirrizico y sus derivados o sales, blanqueadores de piel tales como vitamina C, fosfato de ascorbato de magnesio, ascorbato de glucósido, arbutina o ácido kojico, sacáridos tales como glucosa, fructosa, manosa, sucrosa o trehalosa, y derivados de la vitamina A tales como ácido retinóico, retinol, acetato de retinol o palmitato de retinol.

Por otro lado, cuando el 4-isobutilresorcinol es para usarse en un cosmético o cuasi fármaco, preferiblemente se usa como ingrediente activo de un agente de mejoramiento de arruga. Se puede usar un agente de mejoramiento de arruga que contiene 4-isobutilresorcinol como ingrediente activo (un agente de mejoramiento de arruga de la invención) para prevenir o suprimir la formación de arrugas. Tal como se ha mencionado anteriormente, las arrugas en gran medida se clasifican como arrugas finas formadas en la epidermis por la sequedad y similares, y arrugas grandes formadas en la dermis por rayos ultravioletas y similares, y un agente de mejoramiento de arruga de la invención se puede aplicar a cualquier tipo y es particularmente eficaz para mejorar las arrugas grandes causadas por rayos ultravioletas.

La ruta de administración y la forma de dosificación del agente de mejoramiento de arruga de la invención no están restringidas, y se pueden seleccionar como la apropiada para el propósito. Se pueden mencionar la administración oral y la administración local como ejemplos de rutas de administración. Ejemplos de formas de dosificación incluyen las diversas formas de dosificación anteriormente mencionadas, para una composición farmacéutica, y además de alimentos y bebidas, para la administración oral.

El contenido de 4-isobutilresorcinol en un agente de mejoramiento de arruga de la invención tampoco está restringido y se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el propósito, forma de dosificación y ruta de administración del agente de mejoramiento de arruga.

El agente de mejoramiento de arruga de la invención también puede contener uno u otros más componentes deseados además del inhibidor de la actividad de la heparanasa de la invención, siempre que el efecto inhibidor sobre la actividad de la heparanasa por el inhibidor de la actividad de la heparanasa de la invención no esté sustancialmente afectado. No hay restricciones particulares sobre otros componentes, y se pueden seleccionar apropiadamente de acuerdo con el propósito de uso, la forma de dosificación y la ruta de administración del agente de mejoramiento de arruga.

Se ha explicado la presente invención con ejemplos concretos, con el entendimiento de que estos son meramente para la ilustración y que la invención puede incorporar cualquier modificación deseada que caiga dentro del alcance de las reivindicaciones de la invención.

Ahora, se explicará la presente invención a mayor detalle en referencia a los ejemplos, con el entendimiento de que no significa que la invención se limite a estos ejemplos.

## Ejemplos

### 40 Ejemplo 1

Evaluación basada en el índice de inhibición de la actividad de la heparanasa

Se cultivaron células A431 (células de carcinoma epitelial humano) en DMEM (del Inglés "Dulbecco's Modified Eagle Medium") (Medio Eagle modificado de Dulbecco) que contiene suero al 10%. Las células cultivadas se solubilizaron en tampón de lisis (Tris 50 mM, TritonX-100 al 0,5%, cloruro de sodio 0,15 M, pH 4,5) y se recogieron con un raspador, y a continuación se pipetearon y se dejaron estar sobre hielo durante 30 minutos. A esto le siguió centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos para separar la porción insoluble, y se recuperó el sobrenadante como extracto celular. La cantidad de proteína en el extracto celular se midió con un kit de ensayo de proteína BCA (BCA Protein Assay Kit, PIERCE, CA46141).

A continuación, el extracto de célula A431 se diluyó a 500 µg/ml con tampón de ensayo (HEPES 50 mM, acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 9 mM, BSA al 0,1%). Después, se disolvió el compuesto de ensayo en DMSO y se añadió al extracto celular diluido en proporciones de 0,0005% en masa, 0,005% en masa y 0,05% en masa, y estos se mezclaron para preparar disoluciones muestra (concentración final de DMSO: 5%). Se preparó una disolución control mezclando DMSO con el extracto celular diluido a una concentración final de 5%. La disolución muestra y la disolución control se sembraron cada una en una placa inmovilizada con heparán sulfato biotinilado a 100 µl/pocillo. Después de la reacción a 37°C durante 2 horas y de aclarar 3 veces con PBS-T, se añadió HRP-avidina diluido 10.000 veces (Vector, A-2004)/PBS-T a 100 µl/pocillo, se continuó la reacción a 37°C durante 1 hora. Después de aclarar 3 veces más con PBS-T, se añadió el reactivo TMB (BIO-RAD, 172-1066) a 100

µl/pocillo y se hizo reaccionar con eso, la reacción se terminó con ácido sulfúrico 1N, y se midió la absorbancia a 475 nm (OD475).

5 También, se añadió DMSO a un diluyente serial preparado con el anteriormente mencionado tampón de ensayo de extracto de célula A431 (concentraciones de extracto celular: 500 µg/ml, 50 µg/ml, 5 µg/ml, 0,5 µg/ml), a una concentración final de 5% sin adición del compuesto de ensayo, para obtener una mezcla (disolución para la curva de calibración). La disolución para la curva de calibración se sometió a tratamiento mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente, a partir de la siembra de la placa inmovilizada con heparán sulfato biotinilado, y se midió la OD475.

10 Después, se dibujó una curva de calibración para la concentración de proteína en base al valor de OD475 de la disolución para la curva de calibración, y esta curva de calibración se usó para calcular la concentración de proteína de cada disolución muestra a partir del valor de OD475 de una disolución muestra obtenida añadiendo el compuesto de ensayo a diferentes concentraciones de adición. Se calculó la concentración de proteína de la misma manera que para la disolución control. El índice de inhibición de la actividad de la heparanasa de cada disolución muestra se determinó a partir de la proporción de la concentración de proteína de cada disolución muestra y la concentración de proteína de la disolución control (%).

15 Los detalles con respecto a este procedimiento están descritos en el documento JP2003-502054X.

20 Se ensayó el efecto inhibitorio de la actividad de la heparanasa del 4-isobutilresorcinol mediante el procedimiento anteriormente descrito. Los resultados se muestran en la Tabla 1. La Tabla 1 muestra que el 4-isobutilresorcinol presenta un índice de inhibición de 37,64% incluso a una concentración de adición de 0,0005%, y 94,74% a una concentración de adición de 0,05%, y así inhibe eficazmente la actividad de la heparanasa

Tabla 1: Índices de inhibición de la actividad de la Heparanasa

Compuesto	Concentración añadida	Índice de inhibición
4-Isobutilresorcinol	0,0005%	37,64%
4-Isobutilresorcinol	0,005%	75,98%
4-Isobutilresorcinol	0,05%	94,74%

## Ejemplo 2

### Evaluación del cambio en la actividad de la heparanasa mediante radiación ultravioleta

25 Se cultivaron queratinocitos humanos normales con medio de queratinocito normal de EpiLife. El medio de cultivo se colocó temporalmente en PBS y a continuación se irradió con UVB 50 mJ, y después de cultivar durante 1 hora, 2 horas y 4 horas, se solubilizaron las células con tampón de lisis y se usaron como disoluciones muestra en el grupo de irradiación ultravioleta. También, el medio se colocó temporalmente en PBS sin irradiación ultravioleta, para usarse como disolución control. Se usaron las disoluciones muestra y la disolución control para el tratamiento de la misma manera que en el Ejemplo 1, y se midió la OD475. Las actividades de la heparanasa se evaluaron de la misma manera que en el Ejemplo 1, en base a los valores OD475 obtenidos. Los resultados se muestran en la Fig. 1. Se mostró que la heparanasa era significativamente activa en el grupo de irradiación ultravioleta en comparación con el control no irradiado.

### Inmunotinción de la heparanasa y el heparán sulfato en piel humana irradiada con ultravioleta

35 Se irradió piel de nalga humana (20 años de edad) con rayos ultravioletas 2MED, y después de 2 días se hizo una biopsia de la sección irradiada y de la piel de nalga no irradiada circundante, y se formó un bloque de parafina mediante el método AMeX. Se formó una sección de tejido de 3 µm, y se inmunotñieron la heparanasa y el heparán sulfato. La imagen de la inmunotinción obtenida se muestra en la Fig. 2. La cantidad de heparanasa se aumentó claramente y se redujo el contenido de heparán sulfato en la sección irradiada con ultravioleta, en comparación con la sección no irradiada.

### Evaluación de la permeabilidad de VEGF y la angiogénesis con y sin heparán sulfato

45 Después de calentar y disolver 2 mg de heparán sulfato y 10 mg de agarosa en 1 ml de PBS (disolución de agarosa al 1%), se revistió con un inserto (Transwell de 24 pocillos de Corning, Inc.) para formar una lámina que contiene heparán sulfato. Como control, se formó una lámina que no contenía heparán sulfato mediante el mismo procedimiento, excepto que se usó solo agarosa, sin usar heparán sulfato. Se seleccionó el interior del inserto para el lado de la epidermis, la lámina como la membrana basal, y el pocillo sobre el lado de la dermis, para preparar un modelo de pseudo-piel (Fig. 3a, b).

5 El modelo de pseudo-piel obtenido se puede usar como sistema de evaluación para evaluar la permeabilidad de VEGF y la angiogénesis, en base a la presencia o ausencia del heparán sulfato en la lámina seleccionada como la membrana basal (más adelante referida como "lámina de membrana basal"). En la explicación que sigue, el modelo de pseudo-piel que contiene heparán sulfato en la lámina de membrana basal se refiere como el "modelo normal", y el modelo de pseudo-piel que no contiene heparán sulfato en la lámina de membrana basal se refiere como el "modelo descompuesto de heparán sulfato".

10 Primero, para la evaluación de la permeabilidad de VEGF, se añadió una disolución acuosa de VEGF de 10 µg/ml al lado de la epidermis (interior del inserto) de cada modelo y se dejó estar durante 3 horas a temperatura ambiente, y se detectó la concentración de VEGF en el pocillo sobre la dermis con un kit ELISA de VEGF (R&D systems). Los resultados se muestran en la Fig. 4. La permeación de VEGF se redujo significativamente en el modelo normal en comparación con el modelo descompuesto de heparán sulfato.

15 Después, para la evaluación de la angiogénesis, se añadió una disolución acuosa de VEGF de 100 µg/ml al lado de la epidermis (interior del inserto) de cada modelo, y se colocó en un kit de angiogénesis (Kurabo Industries, Ltd.) para cultivar durante 11 días, después de lo cual se tomó una fotografía de microscopía óptica del cultivo. La imagen obtenida se muestra en la Fig. 5. Se observó notable angiogénesis en el modelo descompuesto de heparán sulfato en una manera dependiente de concentración, mientras que se observó no angiogénesis en el modelo normal.

20 Se usó el programa informático de análisis del kit de angiogénesis (Kurabo Industries, Ltd.) para analizar el área de vaso sanguíneo en la imagen de la Fig. 5. Los resultados se muestran en la Fig. 6. Se observó un aumento notable en el área de vaso sanguíneo en el modelo descompuesto de heparán sulfato en comparación con el modelo normal, demostrando angiogénesis significativa.

#### **Aplicabilidad industrial**

La presente invención se puede usar adecuadamente en el campo de la cosmética con el propósito de mejoramiento o prevención del envejecimiento de la piel (antienvjecimiento).

**REIVINDICACIONES**

1. Un método no terapéutico para prevenir o suprimir la formación de arrugas, que comprende la administración de 4-isobutilresorcinol como ingrediente activo.
- 5 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las arrugas están causadas por nivel reducido de heparán sulfato en la membrana basal epidérmica.
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que se inhibe la actividad de la heparanasa.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se administra 4-isobutilresorcinol mediante administración oral, administración parenteral o administración local.
- 10 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el 4-isobutilresorcinol está presente en una preparación externa para la piel en el intervalo de al menos 0,0001% en masa, preferiblemente no mayor de 1% en masa, como la masa seca de la preparación externa total.

FIG.1

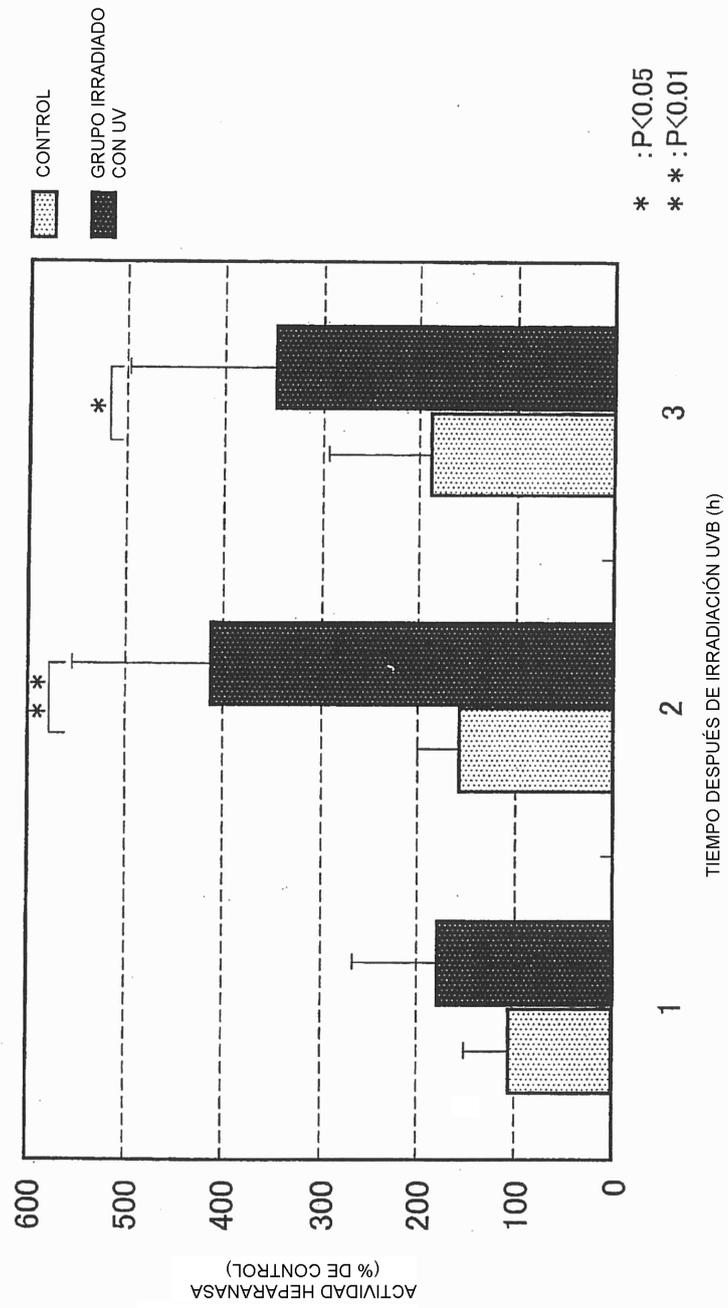


FIG.2

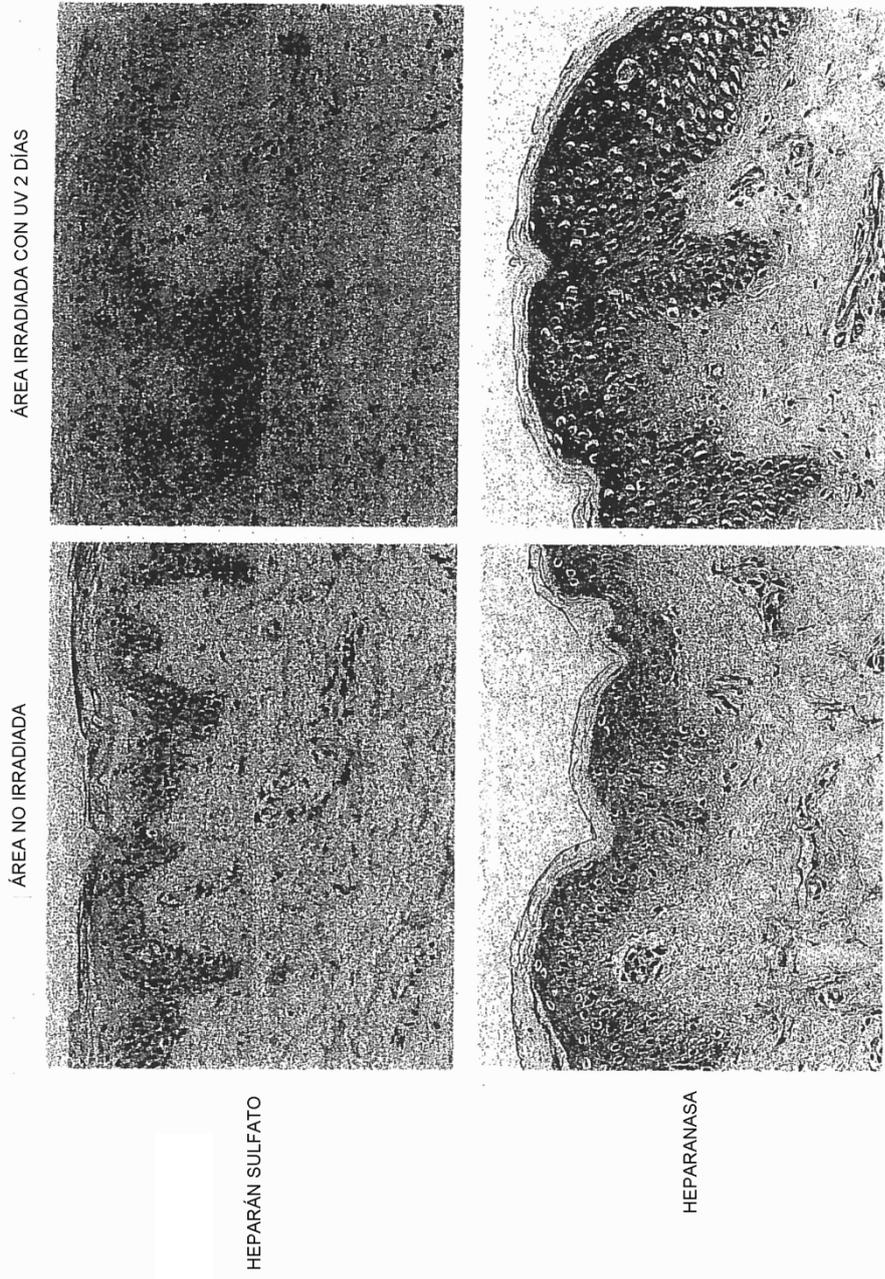
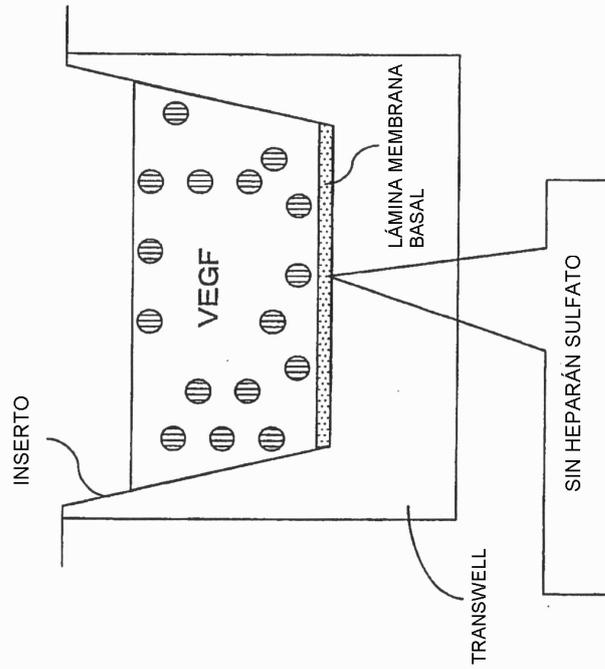


FIG.3

(a)



(b)

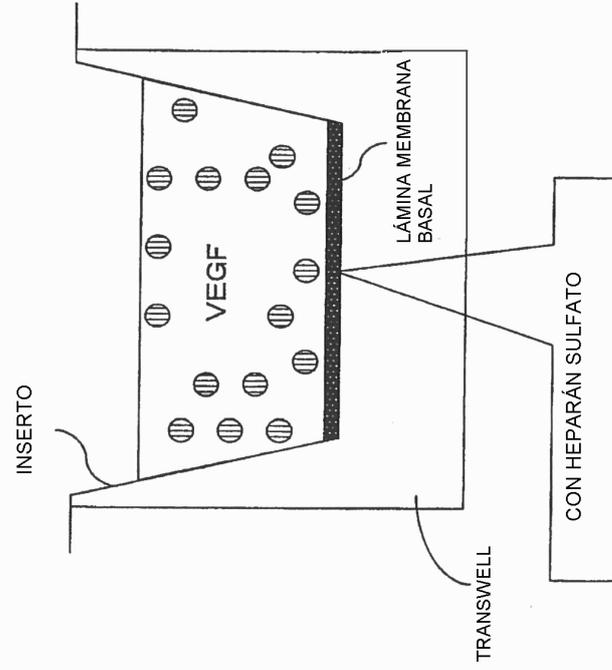


FIG.4

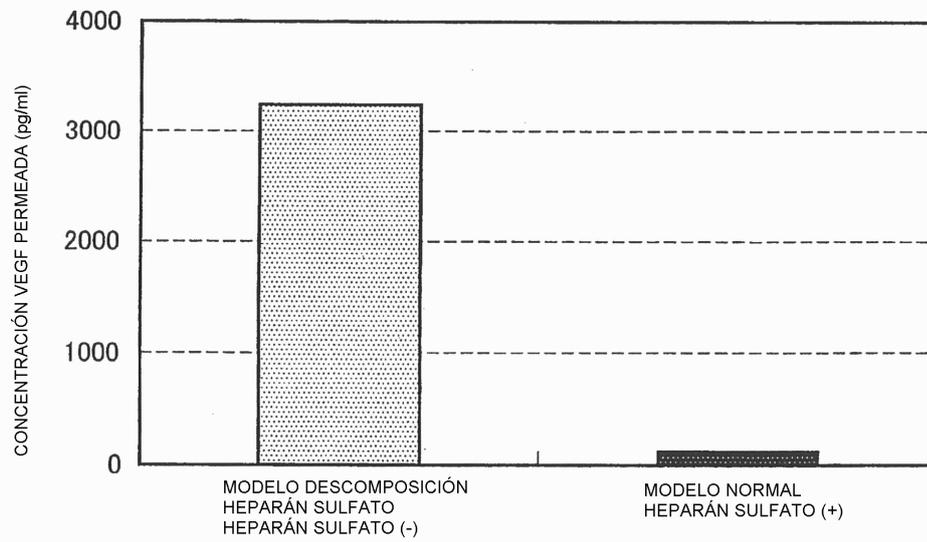


FIG.5

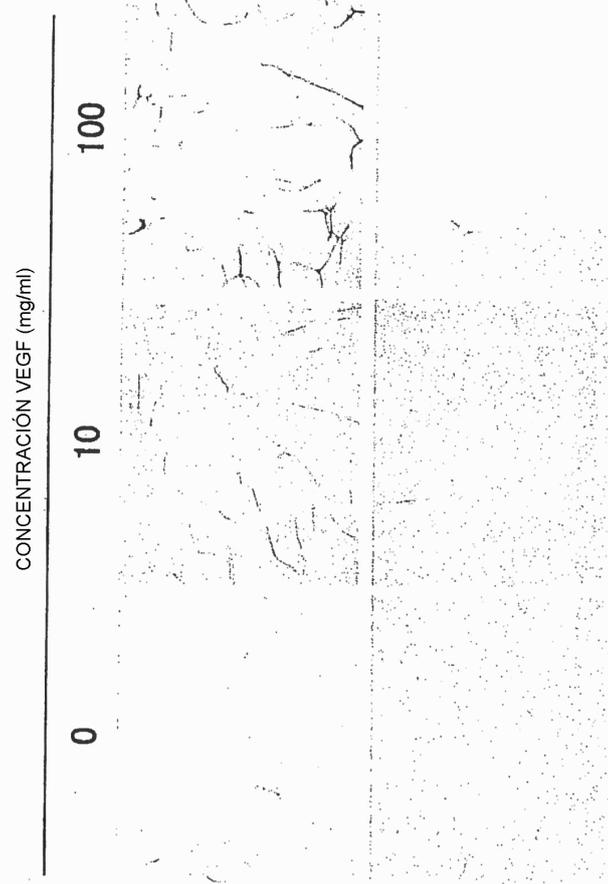


FIG.6

