

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 780**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4015 (2006.01)

A61K 8/49 (2006.01)

A61K 31/4166 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2010** **PCT/JP2010/066998**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011** **WO11040496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2010** **E 10820611 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018** **EP 2484359**

54 Título: **Inhibidor de la actividad heparanasa**

30 Prioridad:

30.09.2009 JP 2009228406

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

29.10.2018

73 Titular/es:

SHISEIDO COMPANY, 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:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 687 780 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

Inhibidor de la actividad heparanasa

Campo Técnico

- 5 La presente descripción se refiere a una preparación externa para la piel que contiene un derivado cíclico de carboxamida de fórmula (I) como un ingrediente activo, y particularmente a un inhibidor de heparanasa que, cuando se usa como un cosmético, inhibe la activación de la heparanasa en la piel, inhibe la alteración en la piel que ocurre con el fallo de control de factores de crecimiento, apoyando al heparán sulfato, y permite que se mantenga la condición de piel juvenil.

Antecedentes de la técnica

- 10 La investigación en anti-envejecimiento ha seguido avanzando en los años recientes. El envejecimiento somático es una causa importante del envejecimiento de la piel desde un punto de vista macroscópico, pero otras causas como la oxidación, la sequedad y la luz solar (rayos ultravioleta) también son factores directos relacionados con el envejecimiento de la piel. Se sabe que el fenómeno específico del envejecimiento de la piel está asociado con daño celular debido a la reducción en mucopolisacáridos, incluyendo ácido hialurónico, reacción de entrecruzamiento del colágeno y rayos ultravioleta.

- 15 También se está llevando a cabo una gran cantidad de investigación con el objetivo de inhibir o mejorar, p. ej., las arrugas, arrugas finas y flacidez de la piel, causadas por el daño en la piel o por envejecimiento de la piel debido a la exposición a los rayos ultravioleta. Como resultado, se ha demostrado la eficacia para promover la producción de ácido hialurónico (JP2001-163794A: documento Patente 1), suprimir la producción y activación de metaloproteinasas de la matriz (MMP) (JP2000-503660X: documento Patente 2), promover la producción de colágeno e inhibir la activación de la esterasa (JP-H11-335235B: documento Patente 3), suprimir la angiogénesis (WO03/84302A: documento Patente 4), y suprimir la linfangiectasia (K. Kajiya et al., Am. J. Pathol., 2006, 169(4): 1496-1503: documento No Patente 1).

- 20 Dicha investigación está dividida en gran medida en esfuerzos para prevenir y mejorar las arrugas finas, con enfoque en la epidermis o células epidérmicas, y esfuerzos para prevenir y mejorar las grandes arrugas, con enfoque en la supresión de los cambios en la dermis que incluyen vasos sanguíneos o vasos linfáticos. La propagación de los cambios en la epidermis a la dermis da lugar a la alteración de la dermis, que incluye los vasos sanguíneos y vasos linfáticos, y la heparanasa está intrínsecamente implicada en el proceso. De hecho, se ha demostrado que se obtiene un efecto anti-arrugas significativo recubriendo un modelo de arrugas finas con un inhibidor de heparanasa (PCT/JP2009/056717).

Documentos de la técnica anterior

Documentos de Patentes

- Documento Patente 1: JP2001-163794A
- Documento Patente 2: JP2000-503660X
- 35 Documento Patente 3: JP-H11-335235B
- Documento Patente 4: WO03-84302A
- Documento Patente 5: DE2746550A
- Documento Patente 6: JP2901297B
- Documento Patente 7: JP2008-303186A
- 40 Documento Patente 8: JP2004-526758X

Documentos de No Patentes

- Documento No Patente 1: K. Kajiya et al., Am. J. Pathol., 2006, 169(4): 1496-1503.
- Documento No Patente 2: I. Vlodavsky et al., Semin. Cancer Biol., 2002, 12(2): 121-129.

Compendio de la invención

- 45 Problemas a solucionar por la invención

Es un objeto de la invención encontrar un nuevo fármaco que sea eficaz para prevenir y suprimir el envejecimiento de la piel desde el punto de vista de la relación entre la heparanasa y el envejecimiento de la piel.

Medios para solucionar los problemas

Como resultado de mucha investigación laboriosa, los presentes investigadores han encontrado que ciertos derivados cíclicos de carboxamida inhiben la actividad heparanasa y, como resultado, previenen o suprimen eficazmente el envejecimiento.

5 Efecto de la invención

Dado que el inhibidor de la actividad heparanasa de la invención puede inhibir eficazmente la actividad heparanasa, puede usarse como un ingrediente activo en un agente que mejora las arrugas, por ejemplo, para prevenir o suprimir la formación de arrugas (particularmente grandes arrugas).

Breve descripción de los dibujos

10 La Fig. 1 es un gráfico que muestra la diferencia en la actividad heparanasa en queratinocitos humanos normales, en condiciones de irradiación y no irradiación con luz ultravioleta;

La Fig. 2 es un conjunto de imágenes de inmunotinción para heparanasa y heparán sulfato en secciones irradiadas y no irradiadas con luz ultravioleta de tejidos de glúteos normales humanos;

15 Las Figs. 3(a) y 3(b) son ambos diagramas esquemáticos de modelos de pseudo-piel, donde (a) muestra un "modelo de descomposición de heparán sulfato" que no contiene heparán sulfato en una lámina de membrana basal (heparán sulfato (-)), mientras (b) muestra un "modelo normal", que contiene heparán sulfato en una lámina de membrana basal (heparán sulfato (+));

La Fig. 4 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación para la permeabilidad de VEGF usando los modelos de pseudo-piel de las Figs. 3(a) y 3(b);

20 La Fig. 5 es un conjunto de fotografías que muestran los resultados de la evaluación para la angiogénesis usando los modelos de pseudo-piel de las Figs. 3(a) y 3(b);

La Fig. 6 es un gráfico que muestra los resultados del análisis para el área de vaso sanguíneo en la fotografía de la Fig. 5;

25 La Fig. 7 es un conjunto de fotografías de la apariencia de un modelo de piel que contiene melanocitos (MEL-FT, fabricado por MatTek, E.E.U.U.);

La Fig. 8 es un gráfico que muestra resultados comparativos para el contenido de melanina en la epidermis para diferentes modelos de piel;

La Fig. 9 muestra los resultados de inmunotinción para perlecán y heparán sulfato en manchas de pigmentación senil y en tejido normal circundante;

30 La Fig. 10 muestra los resultados de la inmunotinción con anticuerpo anti-CD31 como un marcador vascular, junto con los resultados de análisis de imagen;

La Fig. 11 muestra los resultados de la inmunotinción con anticuerpo anti-LYVE-1 como un marcador linfático, junto con los resultados de análisis de imagen;

La Fig. 12 muestra los resultados del ensayo de unión de bFGF *in situ* con tejido pigmentado senil; y

35 La Fig. 13 muestra los resultados del ensayo de unión de bFGF *in situ* con tejido pigmentado seboreico.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

40 La heparanasa está presente en una variedad de células, como una enzima que degrada específicamente las cadenas de heparán sulfato en varios tipos de proteoglicanos de heparán sulfato. En la piel, es producida por los queratinocitos epidérmicos que componen la epidermis y los fibroblastos o células vasculares endoteliales de la dermis. Se sabe también que su producción está aumentada en diferentes tipos de células cancerosas, y se ha sugerido también una conexión con la malignidad del cáncer. Se sabe que el aumento de la producción de heparanasa en las células cancerosas aumenta la metástasis y aumenta la capacidad de inducción de la angiogénesis (véase I. Vlodavsky et al., Semin. Cancer Biol., 2002; 12(2): 121-129; documento No Patente 2).

45 Los proteoglicanos de heparán sulfato tienen la función de provocar la acumulación extracelular de factores de crecimiento que se unen a heparán sulfato (p. ej., bFGF, HGF, VEGF, y HB-EGF). El perlecán es un tipo de proteoglicano de heparán sulfato que también está presente en la membrana basal epidérmica en la interfaz entre la epidermis y la dermis, y en la piel, los factores de crecimiento que unen heparán sulfato se unen a la membrana basal epidérmica, controlando la migración de factores de crecimiento entre la epidermis y la dermis. Además, el perlecán en la membrana basal epidérmica 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 y diferenciación apropiados de la epidermis.

Por consiguiente, la descomposición de las cadenas de heparán sulfato del perlecán por activación o expresión acelerada de heparanasa perturba la liberación de factores de crecimiento acumulados y el control de factores de crecimiento en la epidermis y la dermis, lo que lleva al fallo de control de la diferenciación y del crecimiento de la epidermis y el engrosamiento de la dermis, y lo que promueve la formación de arrugas. En otras palabras, la supresión de la actividad heparanasa suprime la liberación de factores de crecimiento que acompañan a la descomposición del heparán sulfato, y ayuda a suprimir la migración de factores de crecimiento entre la epidermis y la dermis.

Como resultado del chequeo basado en la actividad heparanasa como índice, se han encontrado ciertos derivados cíclicos de carboxamida que pueden significativamente suprimir la actividad heparanasa. Se conocen varios compuestos como derivados cíclicos de carboxamidas y, por ejemplo, son conocidos por su uso como humectantes para la piel (DE2746550A: documento Patente 5), para usar como compuestos que promueven la permeación (JP2901297B: documento Patente 6), y para usar como promotores de maduración y formación de envoltura queratinizada (JP2008-303186A: documento Patente 7). Sin embargo, es completamente desconocido en la técnica anterior que los derivados cíclicos de carboxamida exhiben acción inhibitoria de la actividad heparanasa.

Como se explica en detalle en los ejemplos, los presentes inventores han demostrado que la irradiación de queratinocitos normales cultivados con rayos ultravioleta da como resultado la activación de la heparanasa de los queratinocitos normales (véase Fig. 1). También se demostró que la irradiación de la piel humana con rayos ultravioleta aumenta la cantidad de heparanasa en la epidermis, y reduce el heparán sulfato en la membrana basal (véase Fig. 2). De este modo se demostró que la activación de heparanasa ocurre no solo en modelos de arrugas finas, sino también por rayos ultravioleta.

Además, dado que el heparán sulfato de membrana basal se descompone tras la activación de heparanasa, los presentes inventores prepararon, como modelos de pseudo-piel, un modelo normal que contiene heparán sulfato en una membrana basal y un modelo de heparán sulfato descompuesto que no contiene heparán sulfato en la membrana basal, y evaluaron la permeabilidad de VEGF y la angiogénesis. Como resultado, se demostró que la permeabilidad de VEGF aumentaba y se inducía angiogénesis en el modelo de heparán sulfato descompuesto, en comparación con el modelo normal (véanse las Figs. 3 a 6).

Previamente Yano et al., han indicado que la inducción de la angiogénesis inducida por los rayos ultravioleta en la dermis y la alteración de la dermis son importantes para la formación de grandes arrugas (JP2004-526758X: documento de Patente 8), y han encontrado que la heparanasa es una enzima intrincadamente involucrada no solo en arrugas finas sino también en grandes arrugas. Es decir, la inhibición de la actividad heparanasa es eficaz no solo para prevenir las arrugas finas debidas a la sequedad sino también a las grandes arrugas debidas a la exposición prolongada al sol. En esta memoria, "grandes arrugas" se usa para denominar arrugas grandes y profundas en la dirección perpendicular al lado muscular, que se forman en las esquinas de los ojos y en el surco nasolabial, como resultado de alteraciones no solo en la epidermis sino también en la dermis.

En la evaluación primaria que usa la actividad de heparanasa como índice, como se describe en detalla en los ejemplos que siguen, el heparán sulfato biotinilado se inmovilizó en 96 pocillos, después de lo cual se dejó que la heparanasa actuara en presencia de un fármaco, y se usó la cantidad de reducción en heparán sulfato biotinilado para evaluar la actividad heparanasa mediante la reacción con avidina marcada con peroxidasa y coloración. Los fármacos que exhibían un efecto inhibitor de la actividad heparanasa en la evaluación primaria se evaluaron a continuación para reproducibilidad y dependencia de la concentración en un sistema de evaluación secundario. De esta forma, se encontró que los derivados cíclicos de carboxamida inhiben la actividad heparanasa.

El término "anti-envejecimiento", como se usa en esta memoria, significa prevenir y mejorar las arrugas, flacidez y endurecimiento de la piel suprimiendo la alteración de la piel causada por factores de crecimiento que se unen a heparán sulfato debida a la descomposición del proteoglicano de heparán sulfato en la membrana basal por el envejecimiento o el fotoenvejecimiento, y suprimir específicamente las anomalías en la diferenciación epidérmica, angiogénesis de la dermis, linfangiectasia y ruptura de elastina, para mantener un estado elástico, juvenil y saludable de la piel.

Además, como se describe en detalle en los ejemplos, los presentes inventores también han determinado que el tejido pigmentado senil tiene más descomposición de heparán sulfato de la membrana basal que la piel expuesta a la luz. La descomposición del heparán sulfato da lugar a la pérdida de control del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) expresado en la epidermis, por lo cual ocurren alteraciones en los vasos sanguíneos dérmicos y los vasos sanguíneos linfáticos originando inflamación, y activación de los melanocitos que promueven el almacenamiento de melanina en los melanosomas. Además, el fallo del control del factor de crecimiento de fibroblastos-7 (FGF-7) expresado en la dermis da lugar a una acelerada distribución de melanosomas a partir de los melanocitos a las células epidérmicas. En otras palabras, se piensa que la descomposición del heparán sulfato que acompaña a la activación de la heparanasa da lugar a la activación de los melanocitos debido a la inflamación y a la acelerada distribución de melanosomas debida a la pérdida de control del FGF-7, dando como resultado una acumulación sinérgica de

melanosomas en los queratinocitos. Por consiguiente, un inhibidor de la actividad heparanasa es útil no solo para prevenir y suprimir las arrugas.

El inhibidor de la actividad heparanasa de la invención también puede usarse para tratar, mejorar o prevenir otras afecciones o síntomas asociados con la actividad heparanasa. Las "afecciones o síntomas asociados con la actividad heparanasa" pueden ser proliferación de células cancerosas o metástasis o angiogénesis. Por lo tanto, una composición médica que contiene un inhibidor de la actividad heparanasa de la invención también puede usarse para suprimir la proliferación de células cancerígenas o metástasis, o para suprimir la angiogénesis.

Cuando el derivado cíclico de carboxamida de fórmula (I) de acuerdo con la invención es una sustancia conocida, se puede sintetizar fácilmente mediante un método conocido o adquirirse fácilmente como un producto comercial, o si se trata de un compuesto nuevo, por ejemplo, se puede sintetizar fácilmente mediante un método conocido por los expertos en la materia.

El derivado cíclico de carboxamida representado por la fórmula (I) de la invención también se puede convertir en una sal inorgánica o sal orgánica mediante un método conocido. No existen restricciones particulares sobre las sales que se usan para la invención, y los ejemplos incluyen sales inorgánicas como hidroclouros, sales de ácido sulfúrico, sales de ácido fosfórico, sales de ácido bromhídrico, sales de sodio, sales de potasio, sales de magnesio, sales de calcio y sales de amonio. Las sales orgánicas incluyen sales de ácido acético, sales de ácido láctico, sales de ácido maleico, sales de ácido fumárico, sales de ácido tartárico, sales de ácido cítrico, sales de ácido metanosulfónico, sales de ácido p-toluenosulfónico, sales de trietanolamina, sales de dietanolamina y sales de aminoácidos.

El inhibidor de la actividad heparanasa de la invención puede contener un único tipo de derivado cíclico de carboxamida de fórmula (I) o su sal sola, pero puede también contener dos o más derivados cíclicos de carboxamida de fórmula (I) o sus sales, en cualquier combinación y proporción deseadas.

El contenido del derivado cíclico de carboxamida de fórmula (I) o su sal en el inhibidor de la actividad heparanasa de la invención no está particularmente restringido siempre que sea una cantidad suficiente para exhibir de manera eficaz la inhibición de la actividad heparanasa, y se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el propósito del inhibidor de la actividad heparanasa. Generalmente, sin embargo, la proporción del derivado cíclico de carboxamida de fórmula (I) o su sal con respecto al inhibidor de la actividad heparanasa completo se prefiere que sea habitualmente al menos 0,0001% en masa y especialmente al menos 0,0001% en masa, y usualmente no más del 1% en masa y especialmente no más del 0,2% en masa. Cuando se usan dos o más derivados cíclicos de carboxamida de fórmula (I) o sus sales, la cantidad total debe satisfacer el intervalo especificado anteriormente.

Además, el inhibidor de la actividad heparanasa de la invención puede contener además cualquier otro componente deseado además del derivado cíclico de carboxamida de fórmula (I) o su sal, siempre que el efecto inhibidor sobre la actividad heparanasa por el derivado de cíclico de carboxamida de fórmula (I) o su sal no esté sustancialmente alterado. Otros componentes incluyen otros compuestos con acción inhibidora sobre la actividad heparanasa (otros componentes activos), o vehículos y/o adyuvantes médicamente aceptables. Dichos otros componentes se pueden usar solos, o se pueden usar dos o más en cualquier combinación y proporción.

El inhibidor de la actividad heparanasa de la invención se puede producir mediante un método común, y como un componente para una preparación externa para la piel, se pueden incluso preparar uno o más de los derivados cíclicos de carboxamida de fórmula (1) o sus sales por separado, aunque los componentes comúnmente usados en preparaciones externas para la piel, como cosméticos que contienen cuasi-fármacos o productos farmacéuticos, pueden añadirse de modo apropiado según sea necesario, incluyendo aceites, surfactantes, polvos, colorantes, agua, alcoholes, espesantes, agentes quelantes, siliconas, antioxidantes, absorbentes de ultravioleta, humectantes, aromáticos, diversos componentes farmacológicos, agentes antisépticos, reguladores del pH, neutralizadores.

La ruta de administración y forma de dosificación del inhibidor de la actividad heparanasa de la invención no están restringidas, y se pueden seleccionar según sea apropiado para el propósito. Ejemplos de rutas de administración incluyen administración local (p. ej., aplicación en la piel), administración oral, administración parenteral (p. ej., administración intravenosa y administración intraperitoneal), y similares, aunque se prefiere a una preparación externa para la piel para usar como agente anti-envejecimiento. La forma de dosificación, para administración local (un material de aplicación en la piel), puede ser de una forma en la que se prepara un sistema en solución, sistema solubilizado, sistema emulsionado, sistema disperso en polvo, sistema de dos capas agua/aceite, sistema de tres capas agua/aceite/polvo o similares, como un parche, pomada, crema, látex, agua cosmética, gel o aerosol. Para administración oral, puede estar en forma de una preparación sólida como un comprimido, comprimido recubierto, comprimido recubierto de azúcar, gránulos, polvo, cápsula (p. ej., una cápsula de gelatina dura o blanda), o una preparación líquida (solución o suspensión) como un fármaco con líquido interno o jarabe. Para una administración parenteral, puede estar en forma de una inyección o similar.

El inhibidor de la actividad heparanasa de la invención también puede contener uno o más de otros componentes deseados además del derivado cíclico de carboxamida de fórmula (1) o su sal, siempre que el efecto inhibidor sobre la actividad heparanasa por el derivado cíclico de carboxamida de fórmula (1) o su sal no esté sustancialmente alterado. No existen restricciones particulares sobre dichos otros componentes, y se pueden seleccionar

apropiadamente de acuerdo con el propósito, forma de dosificación y ruta de administración de la composición médica, aunque se pueden mencionar como ejemplos vehículos y/o adyuvantes médicamente aceptables. Ejemplos de adyuvantes incluyen diluyentes, aglutinantes, disgregantes, espesantes, agentes dispersantes, aceleradores de reabsorción, correctores de sabor, agentes tamponantes, surfactantes, aditivos de disolución, conservantes, emulsionantes, agentes isotónicos, estabilizadores y reguladores de pH.

Como ejemplos específicos, cuando se va a usar el inhibidor de la actividad heparanasa de la invención como una preparación externa para la piel, se pueden añadir apropiadamente según sea necesario componentes usados comúnmente en preparaciones externas, como blanqueadores de la piel, humectantes, antioxidantes, componentes de aceite, absorbentes de ultravioleta, surfactantes, espesantes, alcoholes, constituyentes en polvo, agentes colorantes, componentes acuosos, agua, o varias preparaciones de nutrientes para la piel. Además, también se pueden añadir cantidades apropiadas de quelantes de iones metálicos como edetato sódico, edetato trisódico, citrato sódico, polifosfato sódico, metafosfato sódico o ácido glucónico, agentes antisépticos como metilparabeno, etilparabeno o butilparabeno, cafeína, tanino, verapamil, ácido tranexámico o sus derivados, extracto de regaliz, agentes farmacéuticos como glabridina, extracto de agua caliente de membrillo chino, galénicos, acetato de tocoferol, ácido glicirrónico y sus derivados o sales, blanqueadores de la piel como la vitamina C, fosfato de ascorbato de magnesio, ascorbato de glucósido, arbutina o ácido kójico, sacáridos como glucosa, fructosa, manosa, sacarosa o trehalosa y derivados de vitamina A como ácido retinoico, retinol, acetato de retinol o palmitato de retinol.

Sin embargo, estos componentes no están limitados a aquellos mencionados anteriormente. Dichos componentes también pueden usarse en mezclas apropiadas, de acuerdo con formulaciones para formas de dosificación prescritas.

La forma de dosificación de la preparación externa para la piel de la invención no está particularmente restringida, y, por ejemplo, puede estar en cualquier forma deseada como un sistema de solución, un sistema solubilizado, un sistema emulsionado, un sistema de polvo disperso, un sistema de dos capas agua/aceite, un sistema de tres capas agua/aceite/polvo, una pomada, gel, aerosol, o similar. La forma de uso tampoco está particularmente restringida, y por ejemplo, se puede emplear cualquier forma deseada como agua cosmética, emulsión, crema, esencia, gelatina, gel, pomada, compresa, mascarilla, base o similar.

El inhibidor de heparanasa de la invención se puede aplicar a la piel para su utilización en un método cosmético para prevenir la formación de grandes arrugas, y/o para aliviar y eliminar arrugas formadas. El método y la dosificación para una preparación externa de acuerdo con la invención usados en un método de embellecimiento no están particularmente restringidos y pueden establecerse apropiadamente dependiendo de la forma de dosificación o de la condición de las arrugas de la piel a ser tratada, pero típicamente se frota una dosis adecuada, p. ej., de 0,1 ml a 1 ml por cm², directamente sobre la piel o se absorbe en gasa y se aplica sobre la piel, varias veces al día (1-5 veces).

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

La invención se explicará ahora con mayor detalle con referencia a ejemplos, con el entendimiento de que la invención no debe limitarse a estos ejemplos.

Ejemplos

1. Evaluación basada en la tasa de inhibición de la actividad heparanasa

Se cultivaron células A431 (células de carcinoma epitelial humano) en DMEM que contenía suero al 10% (medio Eagle modificado de Dulbecco). Las células cultivadas se solubilizaron en tampón de lisis (Tris 50 mM, Tritón X-100 al 0,5%, cloruro sódico 0,15 M, pH 4,5) y se recogieron con un raspador, y luego se pipeteó y se dejó reposar sobre hielo durante 30 minutos. Esto fue seguido de centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos para eliminar la porción insoluble, y se recuperó el sobrenadante como extracto celular. Se midió la cantidad de proteína en el extracto celular con un kit de ensayo de proteína BCA (BCA Protein Assay Kit, PIERCE, CA46141).

El extracto celular A431 se diluyó después a 500 µg/ml con tampón de ensayo (HEPES 50 mM, acetato sódico 50 mM, cloruro sódico 150 mM, cloruro cálcico 9 mM, BSA al 0,1%). A continuación, el compuesto de prueba se disolvió en DMSO y se añadió al extracto celular en proporciones de 0,0005% en masa, 0,005% en masa, y estos se mezclaron para preparar soluciones de muestra (concentración final de DMSO: 5%). Se preparó una solución control mezclando DMSO con el extracto celular diluido hasta una concentración final del 5%, y se sembraron la solución de muestra y la solución control en una placa con heparán sulfato biotinilado inmovilizado a 100 µl/pocillo. Después de reaccionar a 37°C durante 2 horas y lavar 3 veces con PBS-T, se añadió avidina-HRP diluida 10.000 veces (Vector, A-2004)/PBS-T a 100 µl/pocillo, y la reacción se continuó a 37°C durante 1 hora. Después de 3 lavados adicionales con PBS-T, se añadió reactivo TMB (BIO-RAD, 172-1066) a 100 µl/pocillo y se hizo reaccionar con el, la reacción se terminó con ácido sulfúrico 1 N y se midió la absorbancia a 475 nm (OD475).

Además, se añadió DMSO a un diluyente en serie preparado con el tampón de ensayo del extracto celular A431 anteriormente mencionado (concentraciones de extracto celular: 500 µg/ml, 50 µg/ml, 5 µg/ml, 0,5 µg/ml), hasta una concentración final del 5% sin adición del compuesto de prueba, para obtener una mezcla (solución para curva de

calibración). La solución para la curva de calibración se sometió al tratamiento del mismo procedimiento descrito anteriormente, a partir de la siembra de la placa con heparán sulfato biotinilado inmovilizado, y se midió la OD475.

A continuación, se dibujó una curva de calibración para la concentración de proteína basada en el valor de OD475 de la solución para la curva de calibración, y se usó esta curva de calibración para calcular la concentración de proteína de cada solución de muestra a partir del valor de OD475 de la solución de muestra obtenida añadiendo el compuesto de prueba a diferentes concentraciones de adición. La concentración de proteína se calculó de la misma manera para la solución control. Se determinó la tasa de inhibición de la actividad heparanasa de cada solución de muestra a partir de la relación de la concentración de proteína de cada solución de muestra y la concentración de proteína de la solución control (%).

Los detalles con respecto a este procedimiento se describen en la Inspección Pública de la Patente Japonesa N°. 2003-502054.

La acción inhibidora de la actividad heparanasa de diferentes derivados cíclicos de carboxamida se evaluaron mediante este procedimiento. Los resultados se muestran en la Tabla 1. A partir de la Tabla 1, se observa que cada uno de los derivados cíclicos de carboxamida exhibieron una tasa de inhibición de 37,64% a una concentración añadida de 0,0005% y de 94,74% a una concentración añadida de 0,05%, y por lo tanto inhibieron eficazmente la actividad heparanasa. 2-Imidazolidinona, 1-(2-hidroxietil)-2-imidazolidinona y 1-(2-hidroxietil)-2-pirrolidona.

Tabla 1: Tasa de inhibición de heparanasa

Compuesto	Concentración de adición	Tasa de inhibición
1-(2-hidroxietil)-2-imidazolidinona	0,05%	99,40%
1-(2-hidroxietil)-2-pirrolidona	0,05%	99,00%
2-Imidazolidinona	0,5%	99,95%
	0,05%	60,07%

2. Evaluación del cambio en la actividad heparanasa por radiación ultravioleta

Se cultivaron queratinocitos humanos normales con medio de queratinocito normal EpiLife. El medio de cultivo se colocó temporalmente en PBS y luego se irradió con 50 mJ de UVB, y después de cultivar durante 1 hora, 2 horas y 4 horas, las células se solubilizaron con tampón de lisis y se usaron como soluciones de muestra en el grupo de radiación ultravioleta. Además, se colocó temporalmente el medio en PBS sin radiación ultravioleta, para usar como una solución de control. Las soluciones de muestra y la solución de control se usaron para tratamiento de la misma manera que en el Ejemplo 1, y se midió la OD475. Las actividades heparanasa se evaluaron de la misma manera que en el Ejemplo 1, en base a los valores de OD475. Los resultados se muestran en la Fig. 1. Se demostró que la heparanasa se activaba significativamente en el grupo de radiación ultravioleta en comparación con el control no irradiado.

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

Se irradió glúteo humano (20 años) con 2MED de rayos ultravioleta, y después de 2 días se biopsiaron la sección irradiada y la piel del glúteo no irradiada circundante, y se formó un bloque de parafina por el método AMeX. Se formó una sección de tejido de 3 µm, y se tiñeron inmunológicamente la heparanasa y el heparán sulfato. La imagen de inmunotinción obtenida se muestra en la Fig. 2. Se aumentó claramente la cantidad de heparanasa 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 y angiogénesis de VEGF con y sin heparán sulfato

Después de calentar y disolver 2 mg de heparán sulfato y 10 mg de agarosa en 1 ml de PBS (solución de agarosa al 1%), se recubrió con un inserto (Transwell de 24-pocillos por Corning, S.A.) para formar una lámina que contenía heparán sulfato. Como un control, se formó una lámina que no contenía heparán sulfato por el mismo procedimiento, excepto que se usó agarosa sola, sin usar heparán sulfato. Por lo tanto, se seleccionó el interior del inserto para el lado de la epidermis, la lámina como la membrana basal, y el pocillo en el lado de la dermis, para preparar un modelo de pseudo-piel (Fig. 3a, b).

El modelo de pseudo-piel obtenido se puede usar como un sistema de evaluación para evaluar la permeabilidad y la angiogénesis de VEGF, en función de la presencia o ausencia de heparán sulfato en la lámina seleccionada como la membrana basal (de aquí en adelante denominada "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 conoce como el "modelo normal", y el modelo de pseudo-piel que no contiene heparán sulfato en la lámina de membrana basal se conoce como el "modelo de descomposición de heparán sulfato".

En primer lugar, para la evaluación de la permeabilidad de VEGF, se añadió una solución acuosa de VEGF a 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 en la dermis con un kit de 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 de descomposición de heparán sulfato.

A continuación, para la evaluación de la angiogénesis, se añadió una solución acuosa de VEGF a 100 µg/ml al lado de la epidermis (interior del inserto) de cada modelo, y se colocó en un kit de angiogénesis (Kurabo Industries, S. L.) para cultivar durante 11 días, después de lo cual se toma una fotografía del cultivo con el microscopio óptico. La imagen obtenida se muestra en la Fig. 5. Se observó una angiogénesis notable en el modelo de descomposición de heparán sulfato de un modo dependiente de la concentración, mientras que no se observó angiogénesis en el modelo normal.

Se usó el software de análisis del kit de angiogénesis (Kurabo Industries, S. L.) para analizar el área del vaso sanguíneo en la imagen de la Fig. 5. Los resultados se muestran en la Fig. 6. Se observó un aumento notable en el modelo de descomposición de heparán sulfato en comparación con el modelo normal, lo que demuestra una angiogénesis significativa.

4. Inmunotinción de tejido humano liofilizado

Se pasó recientemente por el micrótopo un bloque de tejido liofilizado de una mancha de pigmentación senil y de la piel normal circundante para preparar tiras de 8 µm. Las tiras de tejido cortadas en 8 µm se fijaron con acetona fría y se secaron, y se eliminó la OCT con PBS. Después de la desactivación de la peroxidasa endógena mediante tratamiento con agua peróxido de hidrógeno al 3%, se sometió a bloqueo con suero normal de cabra al 10%, y se llevó a cabo la reacción con el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario enumerados en la Tabla 2, en ese orden. El tejido marcado con HRP se lavó 5 veces con PBS, y después se coloreó con AEC. El tejido coloreado se lavó a fondo con agua corriente y luego se encapsuló usando un agente de montaje soluble en agua.

Tabla 2: Anticuerpos primario y secundario usados

Anticuerpo primario	Animal inmune	Fabricante	Anticuerpo secundario	Fabricante
CD31	Ratón	DAKO	Ig de ratón-EnVision	Nichirei
LYVE1	Conejo	Upstate	Ig de conejo-EnVision	Nichirei
Perlecán	Rata	Chemicon	Ig de rata biotinilada	DAKO
Heparán sulfato	Ratón	Seikagaku	IgM de ratón biotinilada	Vector

5. Ensayo de bFGF *in situ*

Después de unir 25 µg de bFGF a 200 µl de heparina-Sepharosa hinchada (CL-6B; Pharmacia Biotech), esta se hizo reaccionar con biotina reactiva con NH₂ (Dojindo molecular tech.) disuelta en DMSO durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavó con 800 µl de tampón de lavado (HEPES 20 mmol/l, pH 7,4, NaCl 400 mmol/l), y se eluyó dos veces con 200 µl de tampón de elución (HEPES 20 mmol/l, pH 7,4, BSA al 0,2%, NaCl 3 mol/l), para recuperar el bFGF biotinilado a alta concentración de sal. Luego se colocó en una columna Ultra free C3LGC (Amicon) y se lavó 3 veces con PBS para obtener bFGF biotinilado (0,25 g/l).

Se desparafinaron con xileno tiras de tejido parafinado (queratosis seborreica senil y secciones normales circundantes) cortadas a 5 µm y luego se intercambiaron con etanol (100% →70%) y la peroxidasa endógena se inactivó mediante tratamiento de agua peróxido de hidrógeno al 3%. Luego se lavaron con tampón a pH 5 (que contiene NaCl 0,5 M) y tampón a pH 10 (que contiene NaCl 0,5 M), para liberar los factores endógenos que se unen al heparán sulfato. El bloqueo se realizó con suero al 10%, seguido de reacción con bFGF biotinilado (10 nmol/l) a temperatura ambiente durante 1 hora y lavando 3 veces con PBS.

Esto fue seguido además por reacción con estreptavidina marcada con peroxidasa (Nichirei, Japón) a temperatura ambiente durante 15 minutos, lavando 3 veces con PBS, y coloración con DAB. El tejido coloreado se lavó a fondo con agua corriente, y después de teñir los núcleos con hematoxilina y realizar intercambio de etanol (70% →100%) y sustitución con xileno, se encapsuló.

6. Análisis de imagen de vasos sanguíneos y vasos linfáticos

El tejido teñido con CD31 y teñido con LYVE-1 se fotografió 3 veces por corte, y se calcularon el número de vasos sanguíneos y vasos linfáticos teñidos y el área mediante análisis de imagen, usando WinROOF (Mitani Corporation).

Además, también se calculó el área total de dermis en el área de dermis de la capa papilar mediante análisis de imagen, y se calcularon la densidad y los tamaños de los vasos sanguíneos o vasos linfáticos.

5 La Fig. 9 muestra los resultados de inmunotinción para perlecán y heparán sulfato en las manchas de pigmentación senil y en el tejido normal circundante. La membrana basal se tiñó tanto con perlecán como con heparán sulfato en el tejido normal, pero se tiñó solo para tinción de perlecán el tejido pigmentado senil, mientras se redujo notablemente la tinción de heparán sulfato. Estos resultados indican que el heparán sulfato se había degradado específicamente en las secciones de manchas de pigmentación senil.

10 La Fig. 10 muestra los resultados de la inmunotinción con anticuerpo anti-CD31 como un marcador vascular, junto con los resultados de análisis de imagen. Se calculó el número, grosor y área de los vasos sanguíneos teñidos con CD31 con el software de análisis de imagen WinROOF para cada imagen teñida, y se analizó el cambio en los vasos sanguíneos en las secciones de manchas de pigmentación senil y secciones normales circundantes. Se encontró que los tamaños de vasos sanguíneos y las áreas de vasos sanguíneos fueron significativamente más altos en las secciones de manchas de pigmentación senil. Estos resultados indicaron que se había producido vasodilatación en las secciones de manchas de pigmentación senil.

15 La Fig. 11 muestra los resultados de la inmunotinción con anticuerpo anti-LYVE-1 como un marcador linfático, junto con los resultados de análisis de imagen. Se calculó el número, grosor y área de los vasos linfáticos teñidos con LYVE-1 con el software de análisis de imagen WinROOF para cada imagen teñida, y se analizó el cambio en los vasos linfáticos en las secciones de manchas de pigmentación senil y secciones normales circundantes. Se encontró que los tamaños de vasos linfáticos y las áreas de vasos linfáticos fueron significativamente más altos en las secciones de manchas de pigmentación senil. Estos resultados indicaron que se había producido linfangiectasia en las secciones de manchas de pigmentación senil.

20 La Fig. 12 muestra los resultados de un ensayo de unión de bFGF *in situ* con tejido pigmentado senil. Aquí se muestra que la membrana basal se coloreaba de marrón en el tejido normal circundante de las manchas de pigmentación senil, indicando la unión de bFGF, mientras que no se ve tinción de la membrana basal, es decir, bFGF no era capaz de unirse en las secciones de manchas de pigmentación senil, lo que sugiere que ya no era posible la unión de bFGF debido a la degradación de heparán sulfato.

25 La Fig. 13 muestra los resultados de un ensayo de unión de bFGF *in situ* con tejido pigmentado seborreico. Aquí se muestra que la membrana basal se coloreaba de marrón en el tejido normal circundante de las manchas de pigmentación seborreica, indicando la unión de bFGF, mientras que no se ve tinción de la membrana basal, es decir, bFGF no era capaz de unirse en las secciones de manchas de pigmentación seborreica, lo que sugiere que ya no era posible la unión de bFGF debido a la degradación de heparán sulfato.

Aplicabilidad industrial

35 Dado que el inhibidor de la actividad heparanasa de la invención puede inhibir eficazmente la actividad heparanasa, puede usarse como un ingrediente activo en un agente que mejora las arrugas, por ejemplo, para prevenir o suprimir la formación de arrugas (particularmente grandes arrugas).

REIVINDICACIONES

1. Un método cosmético para mejorar las arrugas mediante la inhibición de la actividad heparanasa, que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesita, uno o más derivado(s) cíclico(s) de carboxamida seleccionados del grupo que consiste en 2-imidazolidinona, 1-(2-hidroxietyl)-2-imidazolidinona y 1-(2-hidroxietyl)-2-pirrolidona, o una sal de estos, como un ingrediente activo.
2. El método de la reivindicación 1 para mejorar grandes arrugas.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde uno o más derivado(s) cíclico(s) de carboxamida se encuentra(n) bajo una forma de dosificación que es apropiada para administración local, oral o parenteral.
4. Un derivado cíclico de carboxamida, que es uno o más seleccionados del grupo que consiste en 2-imidazolidinona, 1-(2-hidroxietyl)-2-imidazolidinona y 1-(2-hidroxietyl)-2-pirrolidona, o una sal de estos, para usar para en la prevención o tratamiento de las alteraciones en los vasos sanguíneos y vasos linfáticos dérmicos que causan inflamación o la distribución acelerada de melanosomas desde los melanocitos a las células epidérmicas.

FIG.1

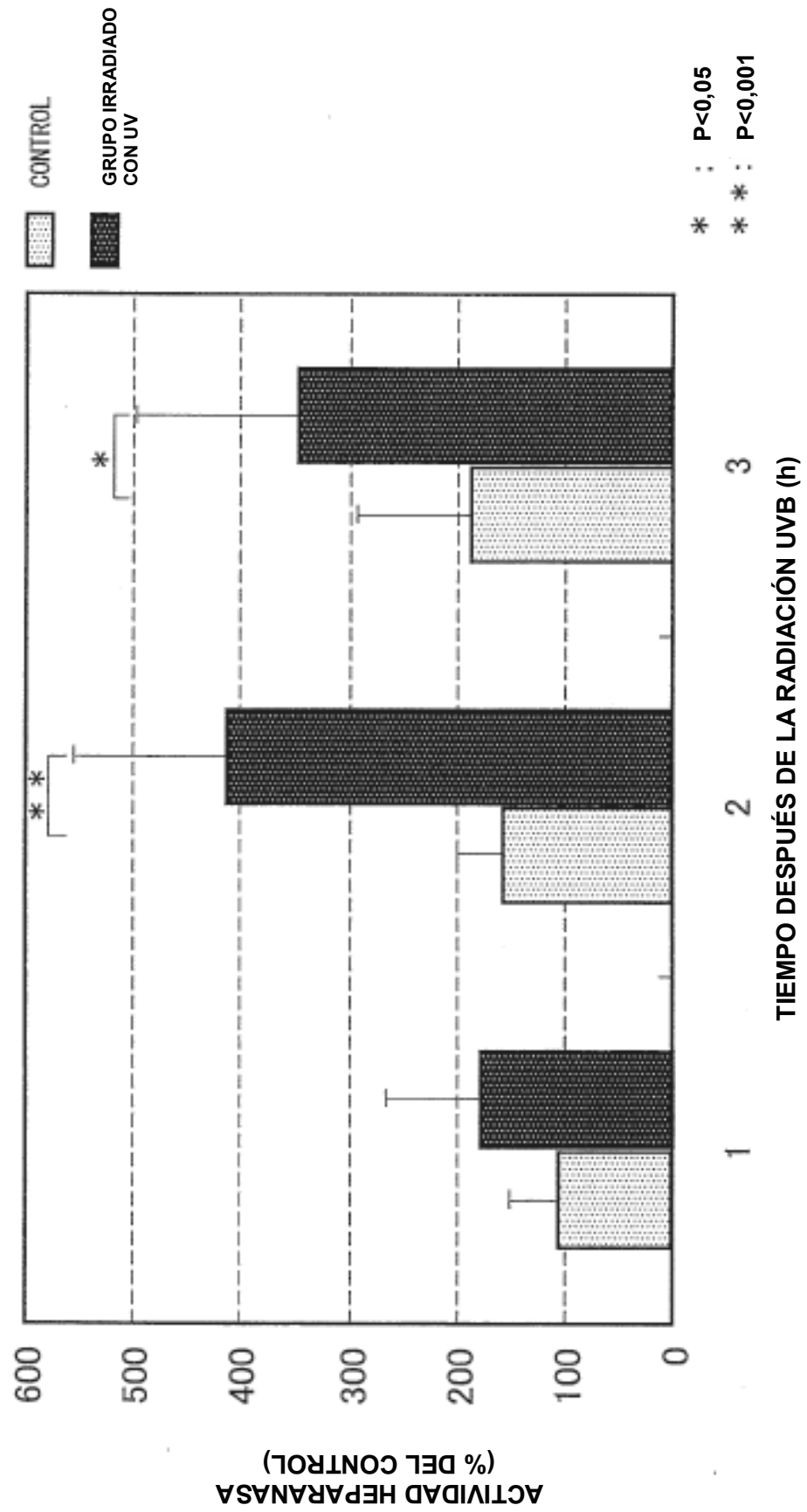


FIG.2

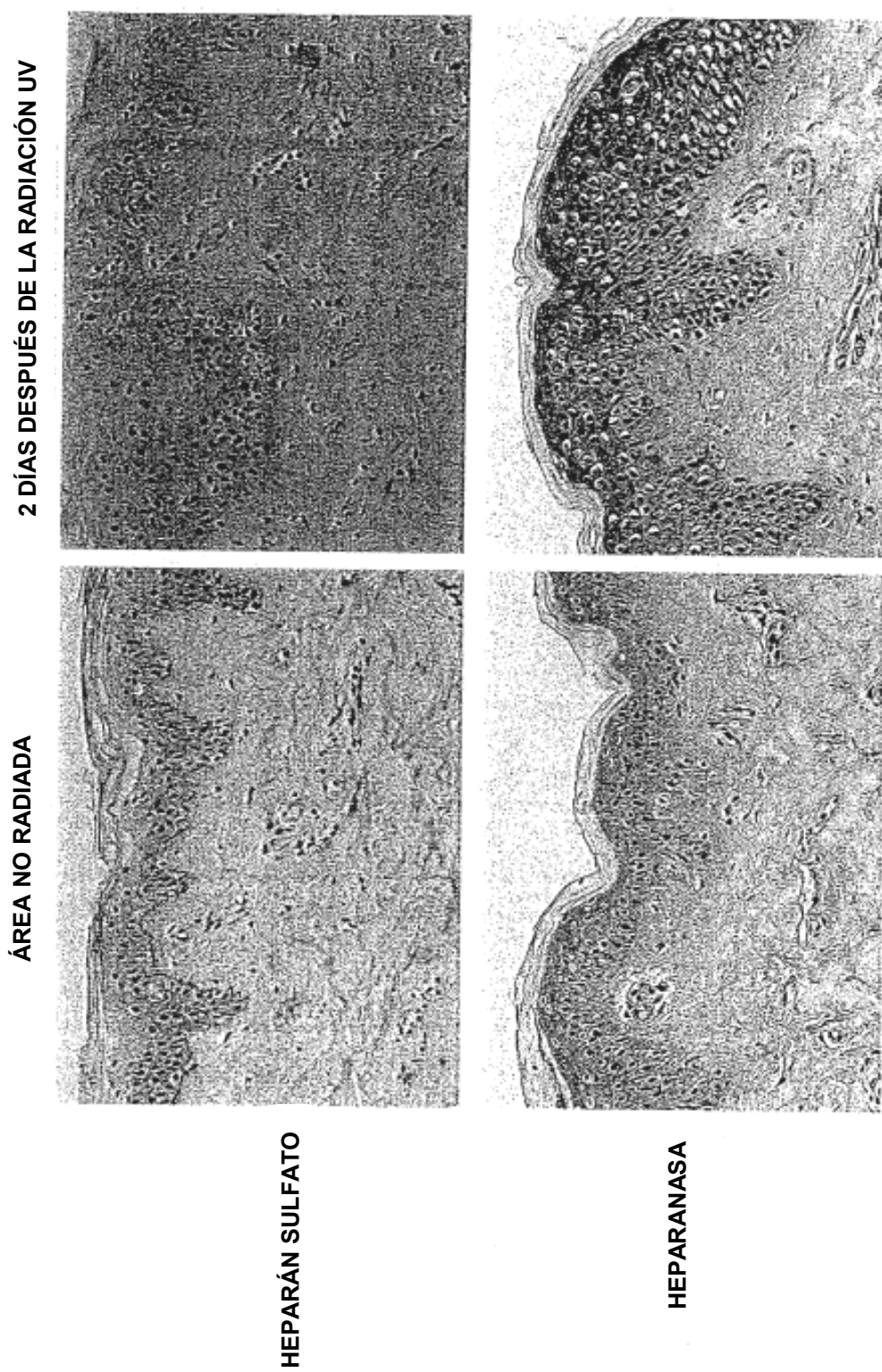


FIG.3

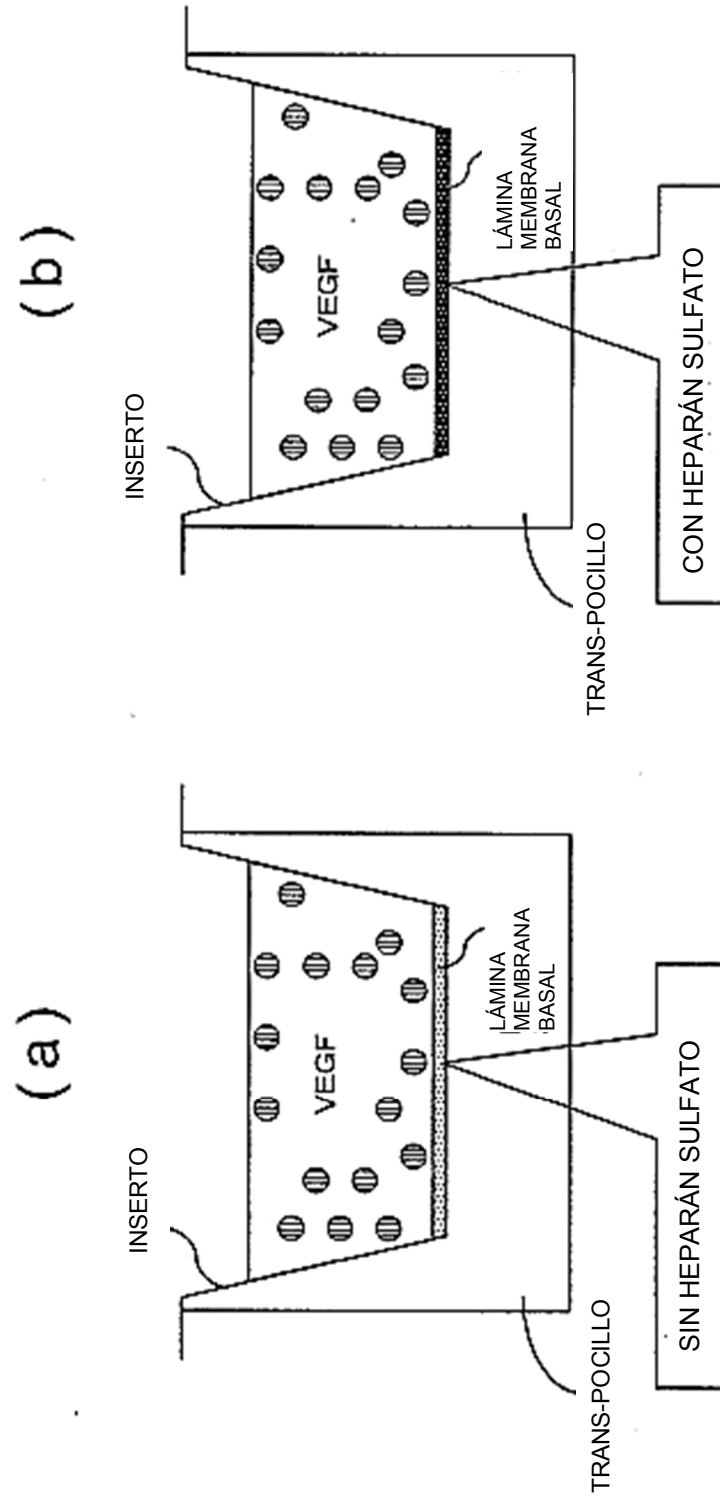


FIG.4

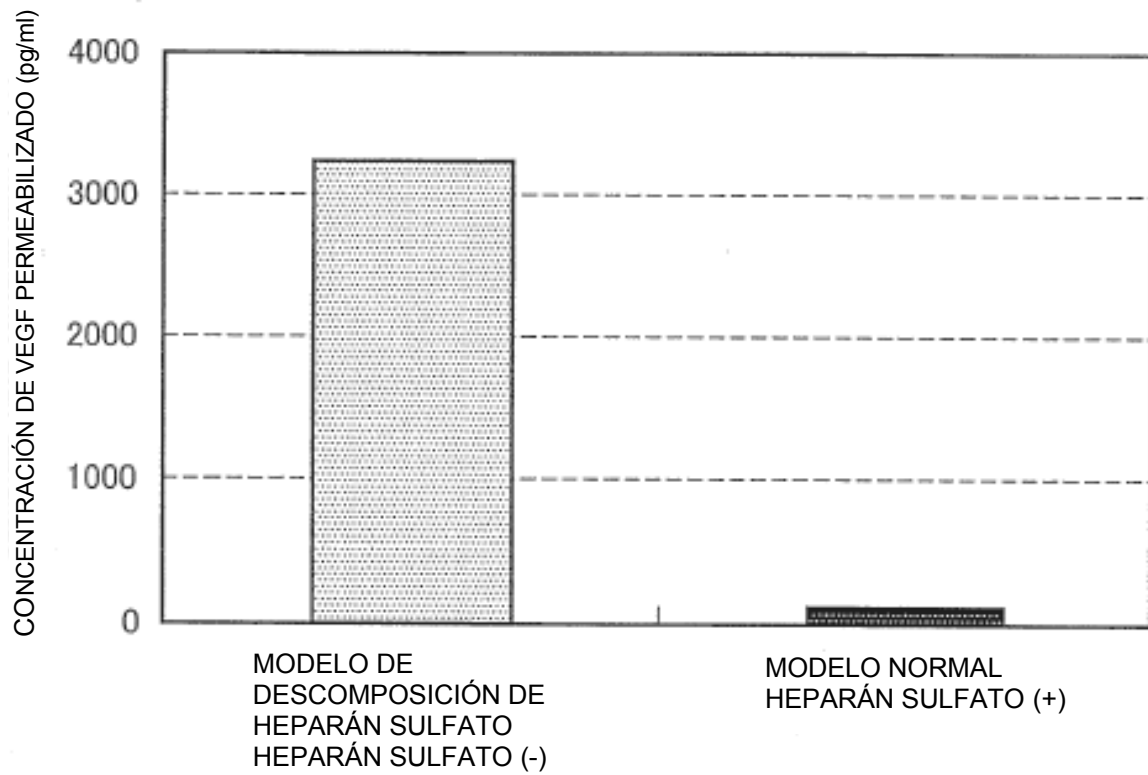


FIG.5

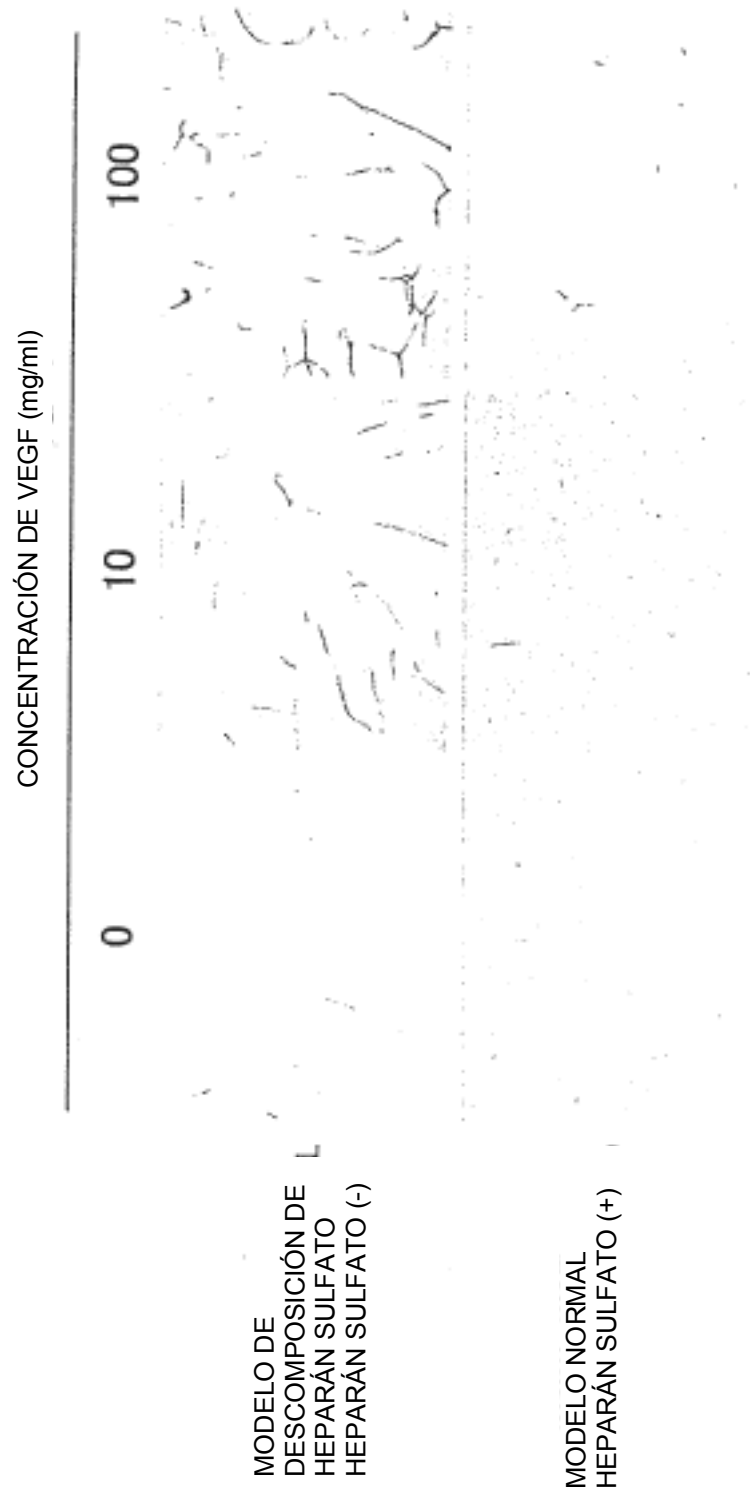
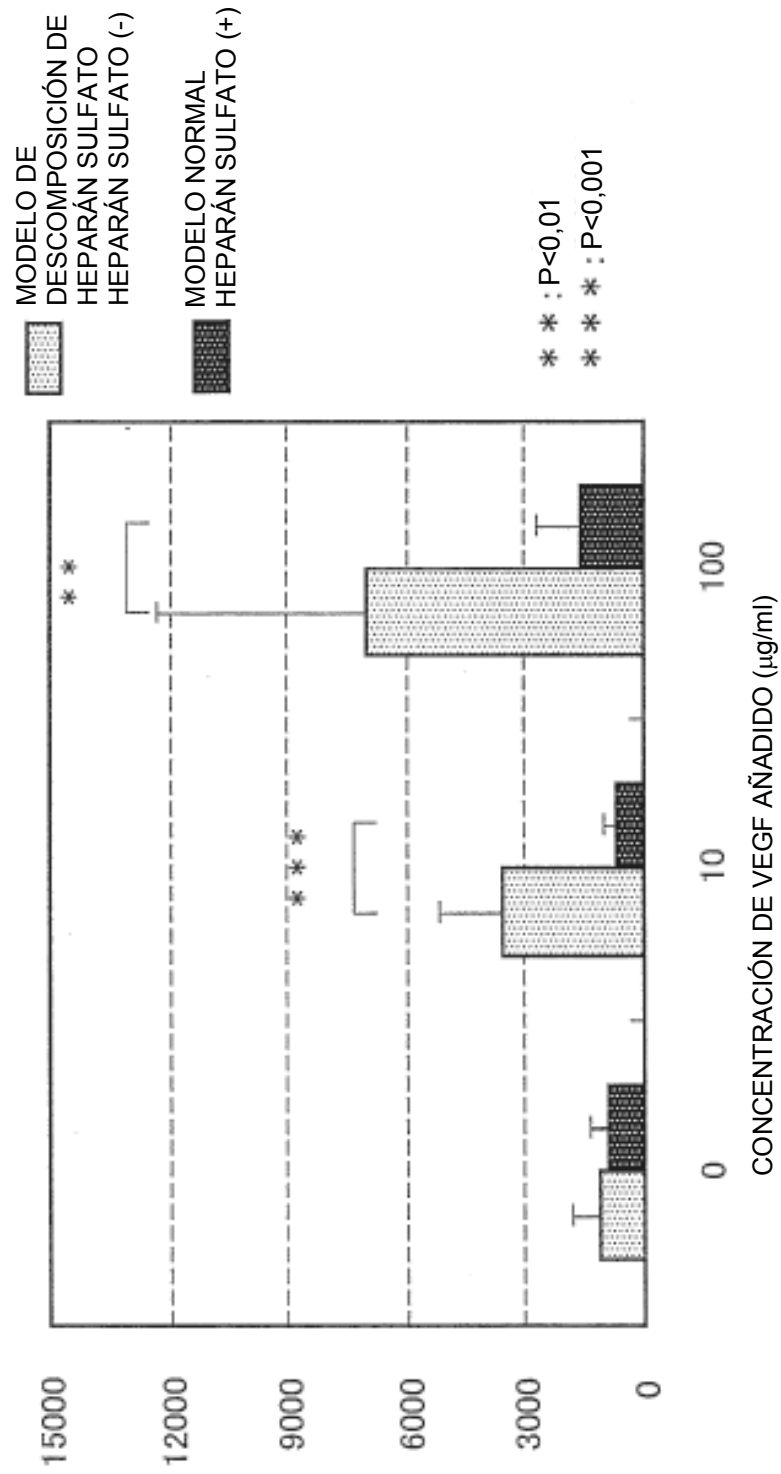


FIG.6



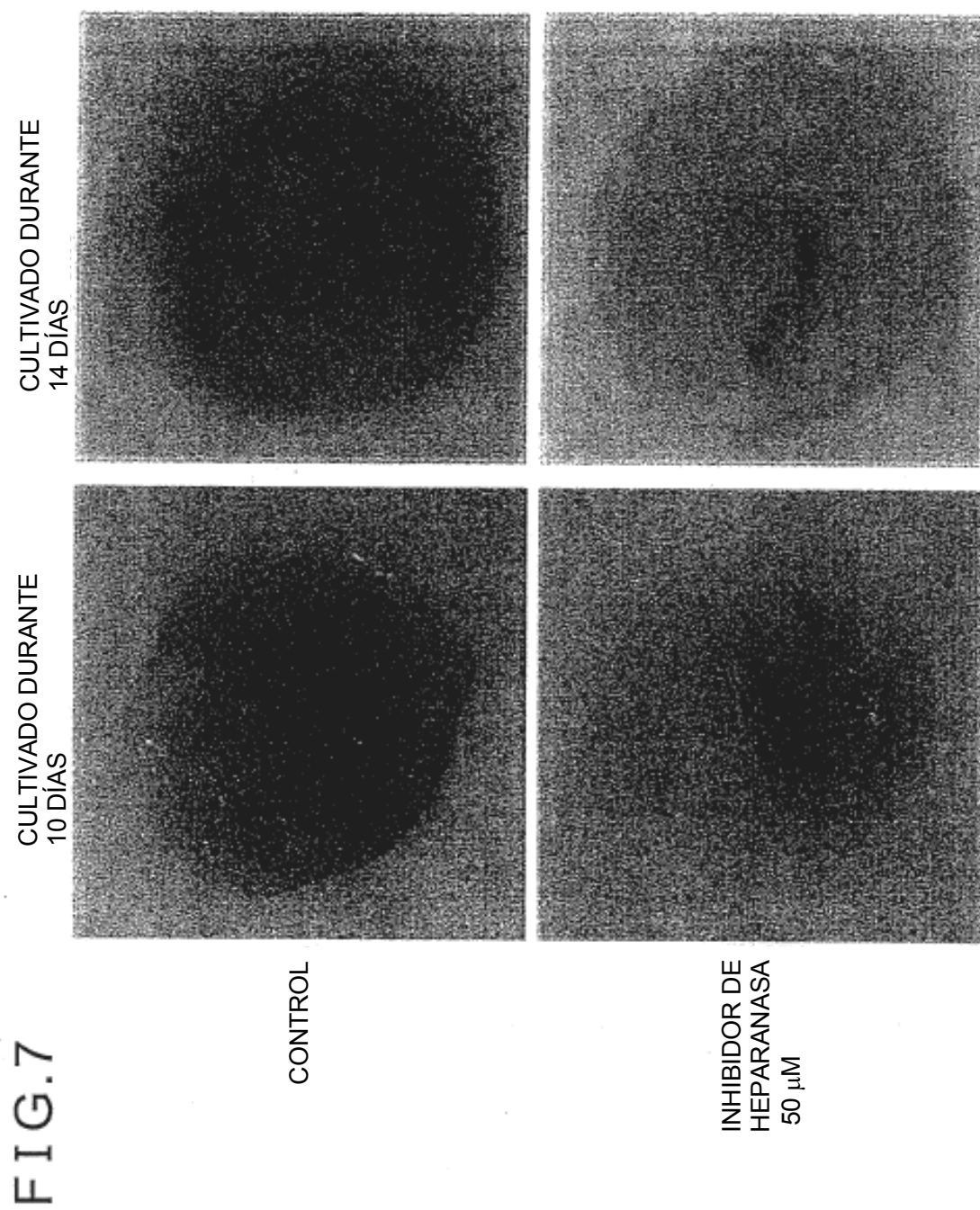


FIG.8

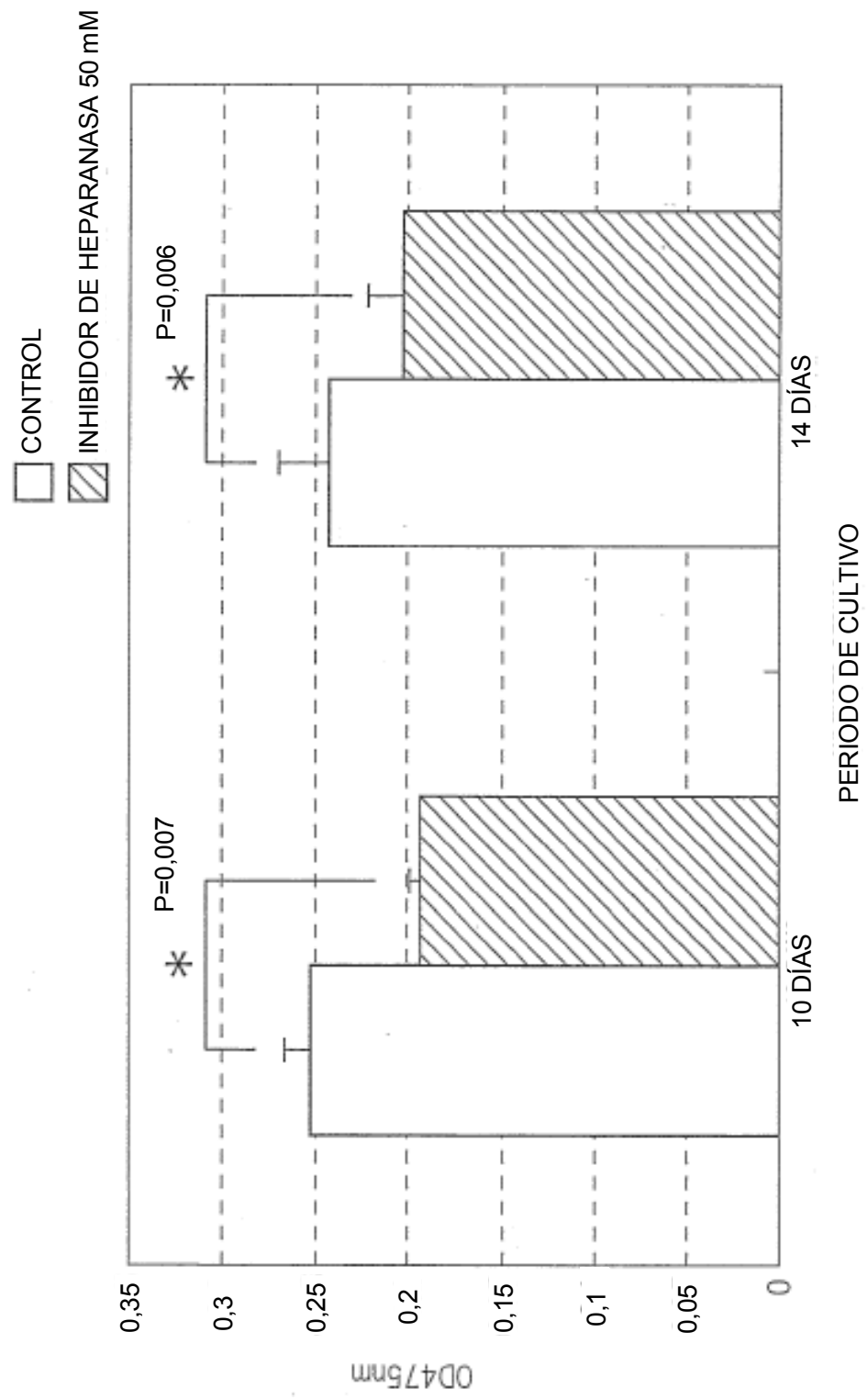


FIG.9

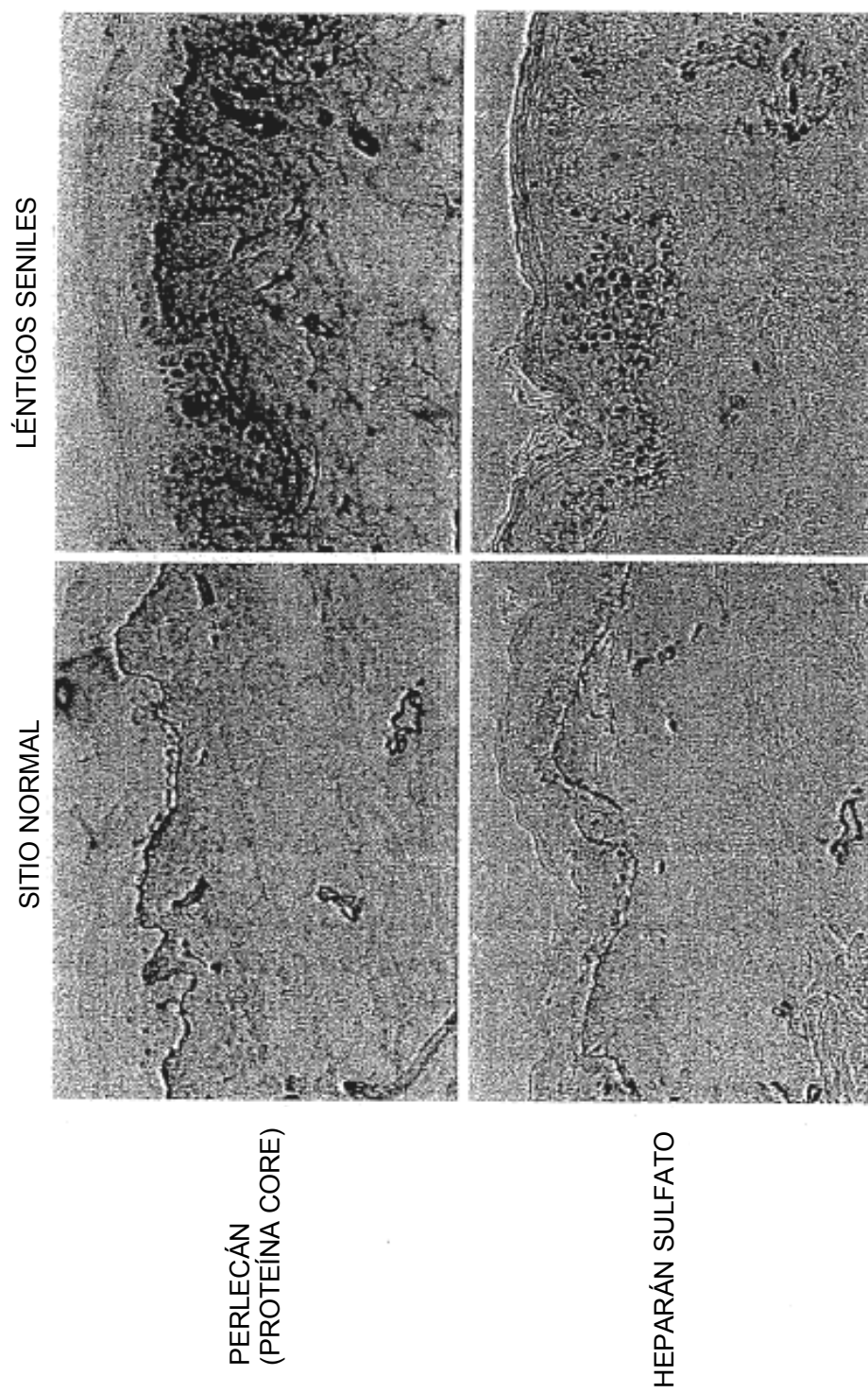


FIG.10

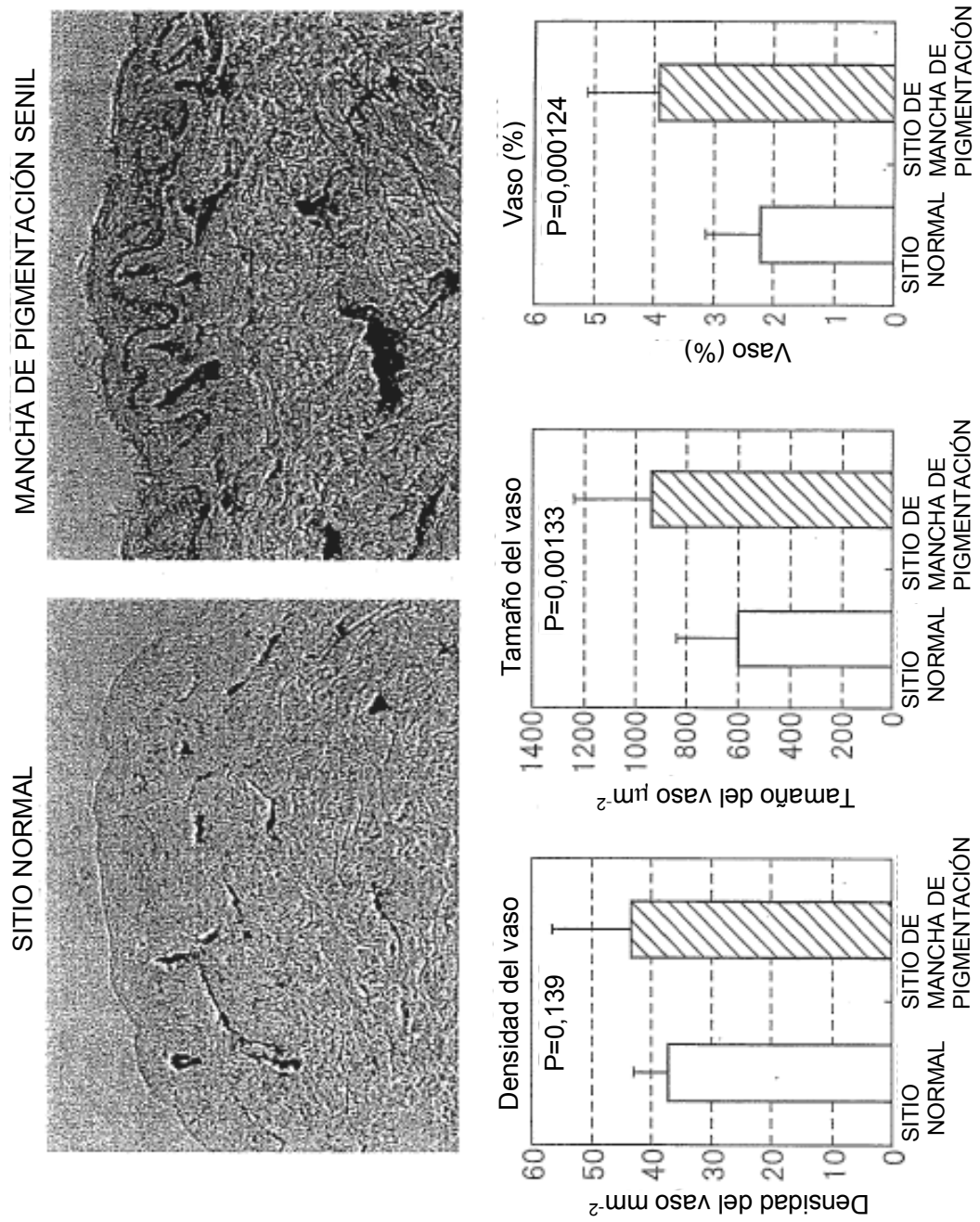


FIG.11

