

COMPOSICIÓN PARA LA MEDICIÓN, PREVENCIÓN O ALIVIO DEL
ENVEJECIMIENTO DE LA PIEL USANDO HAPLN1

Campo técnico

La presente divulgación se refiere a una composición
5 de biomarcador para medir el envejecimiento de la piel
usando la proteína 1 de unión a hialuronano y proteoglicano
(HAPLN1), y una composición farmacéutica para prevenir o
aliviar el envejecimiento de la piel, composición cosmética,
o nutraceutico.

10 Técnica anterior

Uno de los síntomas más obvios del envejecimiento de
la piel es una disminución en la matriz extracelular
dérmica, causando arrugas. Una matriz extracelular de la
capa dérmica incluye diversas proteínas, tales como
15 colágeno, elastina y glucoproteína, como componentes
principales. Entre estas proteínas, el colágeno representa
más del 90 % y aproximadamente el 90 % del colágeno es
colágeno de tipo I. Se identificó aproximadamente 70 % de
reducción en la cantidad de colágeno de tipo I provocada
20 por el envejecimiento en la matriz extracelular dérmica.

El ácido hialurónico, que es un polisacárido que
consiste en aminoazúcares y ácido urónico, se distribuye en
todos los tejidos del cuerpo vivo y aproximadamente 50 % de
la cantidad total en el cuerpo se distribuye en la piel. El
25 ácido hialurónico puede unir hasta 1000 veces su masa en
agua y llena la matriz extracelular de tejido dérmico.

Además, el ácido hialurónico puede formar agregados de diversas glucoproteínas y proteoglicanos para almacenar o preservar diversos factores de crecimiento en ellos. Según los resultados de ensayos clínicos, el ácido hialurónico
5 aumenta la proliferación de fibroblastos dérmicos, la producción de colágeno y la secreción de factores de crecimiento, y se conoce que los niveles de ácido hialurónico disminuyen más de 40 % con la edad.

El envejecimiento de la piel tiene lugar en dos formas:
10 envejecimiento intrínseco y envejecimiento extrínseco. El envejecimiento extrínseco de la piel se provoca principalmente por factores ambientales externos tales como luz ultravioleta (UV) y fumar, y el envejecimiento intrínseco de la piel está asociado con la edad. Aunque se
15 ha informado de métodos actualmente diversos, por ejemplo, uso de cosméticos bloqueadores de UV, para prevenir el envejecimiento extrínseco de la piel, todavía no se han desarrollado métodos de prevención del envejecimiento intrínseco. Por tanto, se requieren esfuerzos para prevenir
20 o aliviar el envejecimiento intrínseco de la piel.

Descripción de las realizaciones

Problema técnico

Se proporciona una composición de biomarcador para medir el envejecimiento de la piel.

25 Se proporciona un kit para medir el envejecimiento de la piel.

Se proporciona un método de búsqueda de un agente de alivio del envejecimiento de la piel.

Se proporciona una composición farmacéutica para prevenir o aliviar el envejecimiento de la piel.

5 Se proporciona una composición cosmética para prevenir o aliviar el envejecimiento de la piel o una composición cosmética para aliviar arrugas.

Se proporciona un nutracéutico para prevenir o aliviar el envejecimiento de la piel o un nutracéutico para aliviar
10 arrugas.

Solución al problema

Según un aspecto de la presente divulgación, se proporciona una composición de biomarcador para medir el envejecimiento de la piel, incluyendo la composición de
15 biomarcador un agente para detectar la proteína 1 de unión a hialuronano y proteína de proteoglicano (HAPLN1) o gen HAPLN1 de una muestra biológica.

También, según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un kit para medir el envejecimiento de la
20 piel, incluyendo el kit un agente para detectar proteína HAPLN1 o gen HAPLN1 de una muestra biológica.

También, según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método de búsqueda de un agente de alivio del envejecimiento de la piel, incluyendo el método:
25 incubar una muestra biológica con un compuesto; detectar un nivel de expresión de proteína o gen HAPLN1 de la muestra

biológica; y comparar el nivel de expresión con un nivel de expresión de la misma proteína o gen en un control normal no incubado con el compuesto.

También, según otro aspecto de la presente divulgación,
5 se proporciona una composición farmacéutica para prevenir o aliviar el envejecimiento de la piel, incluyendo la composición farmacéutica al menos uno seleccionado del grupo que consiste en proteína HAPLN1, un gen que codifica la proteína HAPLN1 y un agente eficaz para promover la
10 expresión o activación de las funciones de la proteína o gen HAPLN1, como principio activo.

También, según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona una composición cosmética para prevenir o aliviar el envejecimiento de la piel o una composición
15 cosmética para aliviar arrugas, incluyendo cada una una proteína HAPLN1 o un agente eficaz para promover la expresión o activación de las funciones de la proteína HAPLN1, como principio activo.

También, según otro aspecto de la presente divulgación,
20 se proporciona un nutraceutico para prevenir o aliviar el envejecimiento de la piel o un nutraceutico para aliviar arrugas, incluyendo cada uno proteína HAPLN1 o un agente eficaz para promover la expresión o activación de las funciones de proteína HAPLN1, como principio activo, .

25 La composición farmacéutica, la composición cosmética, o el nutraceutico pueden incluir además ácido hialurónico.

Efectos ventajosos de la divulgación

Según la presente divulgación, la proteína HAPLN1 tiene expresión reducida en un individuo envejecido y tiene excelente efecto de alivio y reversión del envejecimiento de la piel que incluye arrugas cuando se administra. Por tanto, la presente divulgación puede proporcionar eficazmente una composición de biomarcador y un kit para medir el envejecimiento de la piel, cada uno capaz de diagnosticar el envejecimiento de la piel y que incluye un agente que detecta proteína HAPLN1 o gen HAPLN1, un método de búsqueda de un agente para prevenir o aliviar el envejecimiento de la piel, incluyendo el método detectar un nivel de expresión de proteína HAPLN1 o gen HAPLN1, una composición farmacéutica, composición cosmética, o nutraceutico para prevenir o aliviar el envejecimiento de la piel, y una composición cosmética o nutraceutico para aliviar arrugas.

Breve descripción de los dibujos

Las FIGS. 1A y 1B muestran los resultados de identificar la producción de colágeno en un par parabiótico heterocrónico de un ratón anciano O y un ratón joven Y.

Las FIGS. 2A y 2B muestran los resultados de identificar los niveles de ácido hialurónico (HA) de ratón anciano (YO-O) y ratón joven (YO-Y) respectivos en un par parabiótico heterocrónico de un ratón anciano O y un ratón joven Y; nivel de HA de ratón joven (YY-Y) en un par

parabiótico heterocrónico de un ratón joven Y y un ratón joven Y; y nivel de HA de ratón anciano (OO-O) en un parabiótico heterocrónico de un ratón anciano O y un ratón anciano O.

5 La FIG. 3 muestra resultados que confirman que un factor intrínseco relacionado con el envejecimiento de la piel es HAPLN1.

 Las FIGS. 4A y 4B muestran los resultados de comparar cantidades de ARNm de pro-colágeno y distribuciones de pro-
10 colágeno entre pieles de ratones ancianos y ratones jóvenes.

 Las FIGS. 5A y 5B muestran los resultados de comparar concentraciones y distribuciones de ácido hialurónico entre pieles de ratones ancianos y ratones jóvenes.

 Las FIGS. 6A y 6B muestran los resultados de comparar
15 concentraciones y distribuciones de HAPLN1 entre pieles de ratones ancianos y ratones jóvenes.

 Las FIGS. 7A y 7B muestran los resultados de identificar aumentos en colágeno en ratones ancianos por administración de HAPLN1.

20 Las FIGS. 8A y 8B muestran los resultados de identificar aumentos en ácido hialurónico en ratones ancianos por administración de HAPLN1.

 La FIG. 9 muestra los resultados de identificar aumentos en colágeno inducido por TGF- β en células de
25 fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) por tratamiento con HAPLN1.

Las FIGS. 10A a 10C muestran los resultados de identificar aumentos en los niveles de expresión de la proteína de receptor II de TGF- β en las vías de señalización de la síntesis de colágeno en células NHDF por
5 tratamiento con HAPLN1.

La FIG. 11 muestra los resultados de identificar un aumento en la estabilidad de receptor II de TGF- β en células NHDF por tratamiento con HAPLN1.

La FIG. 12 muestra los resultados de identificar un
10 aumento en el nivel de expresión de la proteína ácido hialurónico sintasa 2 (HAS2) inducida por TGF- β en células NHDF por tratamiento con HAPLN1.

Mejor modo

Los presentes inventores han encontrado que los
15 niveles de expresión de la proteína 1 de unión a hialuronano y proteoglicano (HAPLN1) disminuyen en los ratones ancianos en comparación con los niveles de expresión de proteína entre ratones ancianos y ratones jóvenes, completando así la presente invención. HAPLN1 es
20 una proteína que estabiliza el ácido hialurónico uniendo ácido hialurónico a proteoglicano y no se han informado hasta la fecha los efectos de HAPLN1 en aliviar el envejecimiento de la piel.

La presente divulgación proporciona una composición de
25 biomarcador para medir el envejecimiento de la piel, incluyendo la composición de biomarcador un agente para

detectar proteína HAPLN1 o gen HAPLN1 de una muestra biológica.

La proteína HAPLN1 puede ser HAPLN1 de ratón (acceso de NCBI: NP_038528.3, Gene ID: 12950) o HAPLN1 humana
5 (acceso de NCBI: AAH57808.1, Gene ID: 1404), sin estar limitada a estas.

El agente puede incluir, pero no se limita a, al menos uno seleccionado de un anticuerpo, un ARN antisentido, un aptámero y un compuesto.

10 El envejecimiento de la piel puede incluir arrugas provocadas por una disminución en la matriz extracelular dérmica de piel.

La presente divulgación también proporciona un kit para medir el envejecimiento de la piel, incluyendo el kit
15 un agente para detectar proteína HAPLN1 o gen HAPLN1 de una muestra biológica.

El agente puede incluir, pero no se limita a, al menos uno seleccionado de un anticuerpo, un ARN antisentido, un aptámero y un compuesto.

20 El anticuerpo es un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo policlonal se puede preparar inyectando una proteína expresada por el gen o un fragmento del mismo en un hospedador como inmunogén según cualquier método
25 conocido en la técnica. El hospedador puede incluir un mamífero tal como un ratón, una rata, una oveja o un conejo.

El inmunogén se inyecta por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, o por vía subcutánea y normalmente se administra con un adyuvante para mejorar la antigenicidad. Se puede recoger suero periódicamente del hospedador para
5 obtener suero que tiene un incrementado título y especificidad por antígenos y purificar un anticuerpo del mismo.

El anticuerpo monoclonal se puede preparar por una técnica de producción de líneas celulares immortalizadas
10 mediante fusión bien conocida en la técnica. Por ejemplo, se puede inmunizar un ratón por una proteína expresada por el gen o péptido sintético conjugado con albúmina de suero bovino. Se fusionan los linfocitos B productores de antígeno de un ratón con células de mieloma humanas o de
15 ratón para preparar células de hibridoma immortalizadas. La producción de un anticuerpo monoclonal se identifica analizando las células de hibridoma usando enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) indirecto. Se puede seleccionar y cultivar un clon positivo y se puede
20 aislar del mismo un anticuerpo y purificar. Alternativamente, el clon positivo se puede inyectar por vía intraperitoneal en ratas y se puede obtener ascitis de las mismas para obtener un anticuerpo monoclonal.

En general, el anticuerpo monoclonal se puede analizar
25 cuantitativamente por reacción de color usando un anticuerpo secundario conjugado con una enzima tal como

fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sustrato de las mismas o se puede analizar cuantitativamente usando la AP o HRP directamente conjugadas con el anticuerpo monoclonal de la proteína.

5 La reacción entre la proteína y el anticuerpo se puede identificar por experimentos de identificación de proteína tales como transferencia Western, inmunoprecipitación (IP), enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) e inmunohistoquímica (IHC), sin estar limitados a estos.

10 Un kit que incluye el anticuerpo puede generalmente incluir un anticuerpo liofilizado y un tampón, un estabilizador, una proteína inactivada, o similares, y el anticuerpo se puede marcar con un radionúclido, un colorante fluorescente, una enzima, o similares.

15 La presente divulgación también proporciona un método de búsqueda de un agente de alivio del envejecimiento de la piel, incluyendo el método: incubar una muestra biológica con un compuesto; detectar un nivel de expresión de proteína o gen HAPLN1 de la muestra biológica; y comparar
20 el nivel de expresión con un nivel de expresión de la misma proteína o gen en un control normal no incubado con el compuesto.

 La muestra biológica puede incluir al menos una seleccionada de tejido, células, sangre completa, suero y
25 plasma.

La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica para prevenir o aliviar el envejecimiento de la piel, incluyendo la composición farmacéutica al menos una seleccionada del grupo que
5 consiste en proteína HAPLN1, un gen que codifica la proteína HAPLN1, y un agente eficaz para promover la expresión o activación de las funciones de proteína o gen HAPLN1, como principio activo.

La composición farmacéutica puede incluir además ácido
10 hialurónico (HA).

La composición farmacéutica se puede proporcionar en una o más formulaciones seleccionadas del grupo que consiste en geles, emulsiones, inyecciones, polvos, gránulos, aerosoles, pastas, absorbentes percutáneos y
15 parches según un método convencional, pero no se limita a estas.

Según otra realización de ejemplo, la composición farmacéutica puede incluir además al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en vehículos,
20 excipientes, disgregantes, edulcorantes, recubrimientos, agentes de hinchamiento, lubricantes, deslizantes, aromatizantes, antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, diluyentes, dispersantes, tensioactivos y aglutinantes adecuados que se usan comúnmente en la preparación de
25 composiciones farmacéuticas.

Específicamente, los vehículos, excipientes y diluyentes pueden incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábiga, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones sólidas para administración por vía oral pueden incluir comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, y similares, y las formulaciones sólidas se pueden preparar mezclando al menos un excipiente, tal como almidón, carbonato cálcico, sacarosa, lactosa o gelatina con la composición. También se puede usar lubricantes tales como estearato de magnesio y talco, además de un simple excipiente. La formulación líquida para administración por vía oral puede ser suspensiones, formulaciones para uso interno, emulsiones, jarabes, o similares, y puede incluir diversos excipientes tales como humectantes, edulcorantes, fragancias y conservantes, además de simples diluyentes comunes tales como agua y parafina líquida. Las formulaciones para administración parenteral pueden incluir disoluciones acuosas estériles, disolventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, liofilizados, supositorios y similares. Las disoluciones y suspensiones no líquidas pueden ser propilenglicol, polietilenglicol, aceites

vegetales tales como aceite de oliva, ésteres inyectables
tales como oleato de etilo, o similares. Las bases para los
supositorios pueden incluir WITEPSOL, Macrogol, TWEEN 61,
manteca de cacao, manteca de laurina, glicerogelatina, o
5 similares.

La dosificación de la proteína HAPLN1 y el agente
eficaz puede variar según condiciones y peso de un sujeto,
tipo y grado de envejecimiento, formulación de un fármaco,
vía de administración, y duración de la administración, y
10 se puede ajustar apropiadamente por los expertos habituales
en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término
'sujeto' puede ser un mamífero que incluye un ser humano,
sin estar limitado esto.

15 La presente divulgación también proporciona una
composición cosmética para prevenir o aliviar el
envejecimiento de la piel que incluye proteína HAPLN1 o un
agente eficaz para promover la expresión o activación de
las funciones de proteína HAPLN1, como principio activo.

20 La composición cosmética puede incluir además ácido
hialurónico.

La composición cosmética puede incluir además
adyuvantes comunes tales como estabilizadores,
solubilizantes, vitaminas, pigmentos y fragancias, y
25 vehículos, además de la proteína HAPLN1 y el agente eficaz
que son los principios activos.

La composición cosmética se puede preparar en cualquier formulación comúnmente preparada en la técnica, por ejemplo, disoluciones, suspensiones, emulsiones, pastas, geles, cremas, lociones, polvos, aceites, bases en polvo, bases en emulsión, bases de cera y esprays, sin estar limitada a estas. Más particularmente, la composición cosmética se puede formular en cremas solares, lociones emolientes, lociones astringentes, lociones nutritivas, cremas nutritivas, cremas para masaje, esencias, cremas para el contorno de ojos, mascarillas, esprays, o polvos.

Cuando la composición cosmética se formula en pastas, cremas o geles, el vehículo puede ser aceite animal, aceite vegetal, cera, parafina, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicol, silicona, bentonita, sílice, talco, óxido de cinc, o similares.

Cuando la composición cosmética se formula en polvos o esprays, el vehículo puede ser lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio, o polvo de poliamida. Particularmente, en forma de esprays, la composición cosmética puede incluir además un propulsor tal como clorofluorohidrocarburo, propano/butano, o dimetil éter.

Cuando la composición cosmética se formula en disoluciones o emulsiones, el vehículo puede ser un disolvente, un solubilizante, o un emulsionante, por ejemplo, agua, etanol, isopropanol, carbonato de etilo,

acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, aceite de 1,3-butilglicol, éster alifático de glicerol, polietilenglicol, o éster de ácido graso de sorbitano.

5 Cuando la composición cosmética se formula en suspensiones, el vehículo puede ser un diluyente líquido tal como agua, etanol o propilenglicol, un agente de suspensión tal como alcohol isoestearílico etoxilado, éster de polioxietilensorbitol, y éster de polioxietilensorbitano,
10 celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar y tragacanto.

La presente divulgación también proporciona un nutracéutico para prevenir o aliviar el envejecimiento de la piel o un nutracéutico para aliviar arrugas, incluyendo
15 cada uno proteína HAPLN1 o un agente eficaz para promover la expresión o activación de las funciones de proteína HAPLN1, como principio activo.

El nutracéutico puede incluir además ácido hialurónico.

El nutracéutico se puede proporcionar en forma de
20 polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, jarabes, o bebidas, y el nutracéutico se puede usar apropiadamente según cualquier método conocido en combinación con cualquier otro alimento o aditivos alimentarios, además de la proteína HAPLN1 o el agente eficaz según la presente divulgación
25 usado como principios activos. La cantidad del principio activo a mezclar con él se puede determinar apropiadamente

según sus fines, por ejemplo, prevención, salud o tratamiento.

Las dosis eficaces de la proteína HAPLN1 y el agente eficaz contenido en el nutraceutico se pueden ajustar según
5 la dosis eficaz de la composición farmacéutica. Sin embargo, cuando está prevista la ingesta prolongada con el fin de salud e higiene, las dosis eficaces pueden estar por debajo del intervalo anterior. Además, puesto que no existe problema de seguridad, el principio activo se puede usar en
10 una cantidad por encima del intervalo.

Los tipos de nutraceutico no están particularmente limitados y ejemplos del nutraceutico puede incluir carnes, salchichas, panes, chocolates, caramelos, snacks, galletas, pizzas, ramens, otras noodles, chicles, productos lácteos
15 que incluyen helados, diversos tipos de sopas, bebidas, té, bebidas, bebida alcohólica y complejos vitamínicos.

Modo de la divulgación

En lo sucesivo, la presente divulgación se describirá con más detalle según los siguientes ejemplos. Sin embargo,
20 los siguientes ejemplos se presentan simplemente para ejemplificar la presente divulgación, y el alcance de la presente divulgación no se limita a estos. El ejemplo de la presente divulgación se proporciona para explicar más completamente la presente divulgación a los expertos medios
25 en la técnica.

<Ejemplo 1> Búsqueda de factor intrínseco de envejecimiento de la piel

La parabiosis heterocrónica es un experimento de conexión de vasos sanguíneos de un ratón anciano y un ratón
5 joven de la misma especie para compartir sangre. Se usa un modelo de experimento de parabiosis heterocrónica para buscar e identificar un factor interno que cause el envejecimiento de nervios, corazones y músculos en organismos vivos.

10 Así, para confirmar la presencia del factor interno relacionado con el envejecimiento de la piel en organismos vivos, se anestesiaron un ratón anciano C57BL/6J de 20 meses de edad comprado del Instituto de Ciencias Básicas de Corea y un ratón joven C57BL/6J de 6 semanas de edad
15 comprado de Central Lab Animal Inc. y se unieron juntos por parabiosis las pieles y los músculos abdominales de los ratones obtenidos por incisión. En caso del ratón joven, se cortó la piel de una pata delantera derecha hasta una pata trasera derecha en aproximadamente 5 cm y luego se cortaron
20 los músculos abdominales derechos en aproximadamente 1 cm. En caso del ratón anciano, se cortó la piel de una pata delantera izquierda hasta una extremidad trasera izquierda en aproximadamente 5 cm y luego se cortaron los músculos abdominales izquierdos en aproximadamente 1 cm. Se unieron
25 los músculos abdominales cortados y las pieles y se suturaron para parabiosis. Después de mantenerse los

ratones durante 3 semanas y sacrificarse, se recogieron plasma y tejido de piel de los ratones de cada grupo. Se recogió una cantidad total de sangre por extracción orbital de sangre y se incubó en un tubo de extracción de sangre
5 recubierto con ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) durante aproximadamente 30 minutos y luego se centrifugó a una velocidad de 10,000 x g para separar el plasma. Se almacenó el plasma separado a -70 °C. Como tejido de piel, se recogió piel cervical de los ratones hasta un tamaño de
10 1 cm × 1 cm después de la retirada de pelo.

Para inmunofluorescencia, se fijó el tejido de piel recogido en 10 % (v/v) de formalina para preparar una sección de parafina. Se desparafinó el portaobjetos preparado y se rehidrató y luego se tiñó por
15 inmunofluorescencia usando anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-pro-colágeno tipo I $\alpha 2$ (COL1A2) de ratón (Santa Cruz Biotechnology) y de burro anti-IgG(H+L) de cabra Alexa Fluor 594 (Life technologies).

Para qRT-PCR, se cultivó el tejido de piel separado
20 durante la noche en 0.25 % (p/v) de tripsina/EDTA a 4 °C, y luego se separó la capa dérmica del mismo y se extrajo ARNm total usando un reactivo TRIzol. A partir del ARNm extraído, se sintetizó ADNc usando un kit de síntesis de ADNc (Life technologies). Entonces, se cuantificaron proCOL1A1,
25 proCOL1A2, proCOL3A1 y GAPDH por qRT-PCR (reacción en

cadena de la polimerasa cuantitativa por transcripción inversa).

Como resultado, como se muestra en las FIGS. 1A, 1B, 2A y 2B, se confirmó que las producciones de colágeno (FIGS. 1A y 1B) y ácido hialurónico (FIGS. 2A y 2B) aumentaron en el tejido de piel del ratón anciano (YO-O) en el par parabiótico heterocrónico del ratón anciano O y el ratón joven Y, cuando se comparan con las del ratón anciano (OO-O) en el par parabiótico isocrónico del ratón anciano O y el ratón anciano O.

Así, se confirmó que pudo haber un factor intrínseco relacionado con el envejecimiento de la piel en organismos vivos.

Además, se aisló plasma de los ratones de cada experimento y se identificó factor intrínseco por proteómica SomaScan (SomaLogic, Inc.). Como resultado, se identificó HAPLN1 como proteína relacionada con el envejecimiento como se muestra en la FIG. 3.

<Ejemplo 2> Identificación de la disminución cuantitativa de HAPLN1 por el envejecimiento de la piel

1. Disminución en la producción de colágeno por el envejecimiento de la piel

Se recogió tejido de piel cervical de un ratón C57BL/6J macho anciano de 20 meses de edad y un ratón C57BL/6J macho joven de 6 meses de edad hasta un tamaño de 1 cm × 1 cm y se extrajo ARNm total de la misma del mismo

modo que en el Ejemplo 1. A partir del ARNm extraído, se sintetizó ADNc usando un kit de síntesis de ADNc y luego se cuantificaron por qRT-PCR cantidades de ARNm de pro-colágeno tipo I (proCOL1A1 y proCOL1A2) y tipo III (proCOL3A1).

Como resultado, como se muestra en la FIG. 4A, los niveles de ARNm de proCOL1A1, proCOL1A2 y proCOL3A1 en el ratón anciano disminuyeron hasta 1/4.3, 1/4.2 y 1/5.6, respectivamente, cuando se comparan con los del ratón joven.

Además, se preparó una sección de parafina usando el tejido de piel cervical recogido del ratón anciano y el ratón joven y se tiñó por inmunofluorescencia del mismo modo que en el Ejemplo 1. Como resultado de la observación usando un microscopio confocal, se confirmó que la distribución del pro-colágeno tipo I disminuyó en la piel del ratón anciano como se muestra en la FIG. 4B.

2. Disminución en la cantidad de ácido hialurónico por el envejecimiento de la piel

Se recogió tejido de piel cervical de un ratón C57BL/6J macho anciano de 20 meses de edad y un ratón C57BL/6J macho joven de 6 meses de edad hasta un tamaño de 1 cm × 1 cm del mismo modo que en el Ejemplo 1 y se sometió a enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Primero, se retiró la grasa subcutánea del tejido de piel separado usando una cuchilla y se homogeneizó el tejido de piel en una disolución de solución salina tamponada con fosfato

(PBS) complementada con 1X inhibidor de la proteasa. Se cuantificó el ácido hialurónico según instrucciones del fabricante usando un kit de ELISA de ácido hialurónico (CUSABIO).

5 Como resultado, la concentración de ácido hialurónico en el ratón anciano disminuyó a aproximadamente 1/4.2 de aquella en el ratón joven como se muestra en la FIG. 5A.

Se tiñeron por inmunofluorescencia secciones de tejido de piel del ratón anciano y el ratón joven del mismo modo
10 que en el Ejemplo 1. En este caso, se usaron anticuerpo policlonal de oveja anti-ácido hialurónico (Abcam) y de burro anti-IgG H&L de oveja Alexa Fluor 488 (Abcam) como anticuerpos anti-ácido hialurónico. Como resultado de la observación usando un microscopio confocal, se confirmó que
15 la distribución de ácido hialurónico disminuyó en la piel del ratón anciano como se muestra en la FIG. 5B.

3. Disminución en el nivel de expresión de HAPLN1 por el envejecimiento de la piel

Se recogió tejido de piel cervical de un ratón
20 C57BL/6J macho anciano de 20 meses de edad y un ratón C57BL/6J macho joven de 6 meses de edad y se homogeneizó en una disolución de PBS del mismo modo que en el Ejemplo 2-2 descrito anteriormente, y luego se midió la concentración de HAPLN1 usando un kit de ELISA de HAPLN1 de ratón
25 (CUSABIO).

Como resultado de la medición, la concentración de HAPLN1 disminuyó en el ratón anciano hasta 1/4.2 de aquella en el ratón joven como se muestra en la FIG. 6A.

Se tiñeron por inmunofluorescencia secciones de tejido
5 de piel del ratón anciano y el ratón joven del mismo modo que en el Ejemplo 1. En este caso, se usaron IgG policlonal de cabra anti-HAPLN1 (Santa Cruz Biotechnology) y de burro anti-IgG(H+L) de cabra Alexa Fluor 594 (Life technologies).

Como resultado de la observación usando un microscopio
10 confocal, se confirmó que la distribución de HAPLN1 disminuyó en la piel del ratón anciano como se muestra en la FIG. 6B.

**<Ejemplo 3> Identificación de los efectos de la
administración de HAPLN1 sobre el alivio del envejecimiento
15 de la piel**

Se disolvió HAPLN1 de ratón recombinante (comprado de Cusabio Biotech Co) en PBS y se administró a un ratón C57BL/6J macho anciano de 20 meses de edad mediante una vía intraperitoneal a una dosis de 0.1 mg/kg una vez al día
20 durante 14 días. Se administró la misma cantidad de PBS a un ratón anciano y un ratón joven (6 meses de edad) para preparar grupos de control para comparación entre ellos.

**1. Identificación del aumento en el colágeno en ratón
anciano por administración de HAPLN1**

25 Después del fin de la administración, se separó la capa dérmica del tejido de piel de cada uno del grupo

experimental y los grupos de control del mismo modo que en el Ejemplo 1 y se extrajo ARN del mismo para cuantificar pro-colágeno tipo I (proCOL1A1 y proCOL1A2) y tipo III (proCOL3A1) por qRT-PCR.

5 Como resultado, como se muestra en la FIG. 7A, se confirmó que los niveles de ARNm de proCOL1A1, proCOL1A2 y proCOL3A1 aumentaron en 2.6 veces, 2.5 veces y 2.8 veces, respectivamente, en el grupo administrado con HAPLN1, cuando se compara con el grupo sin administración, que
10 indica restauración hasta un nivel similar al del ratón joven. Además, se tiñeron secciones de tejido de piel por anticuerpo anti-pro-colágeno tipo I y se observaron usando un microscopio confocal del mismo modo que en el Ejemplo 2-1. Como resultado, se confirmó que la distribución del pro-
15 colágeno tipo I en el grupo administrado con HAPLN1 se incrementó hasta un nivel similar al del ratón joven como se muestra en la FIG. 7B.

2. Identificación del aumento en ácido hialurónico en ratón anciano por administración de HAPLN1

20 Después del fin de la administración, se recogió tejido de piel cervical de cada uno del grupo experimental y los grupos de control y se homogeneizaron en una disolución de PBS del mismo modo que en el Ejemplo 2-2, y luego se cuantificó el ácido hialurónico usando un kit de
25 ELISA de ácido hialurónico (CUSABIO) según instrucciones del fabricante.

Como resultado, como se muestra en la FIG. 8A, se confirmó que la cantidad de ácido hialurónico aumentó en el grupo administrado con HAPLN1 en 1.5 veces, cuando se compara con el grupo sin administración, que indica restauración hasta un nivel similar al del ratón joven.

Además, se tiñó por inmunofluorescencia ácido hialurónico en las secciones de tejido de piel del mismo modo que en el Ejemplo 2-2 y se observó usando un microscopio confocal. Como resultado, se confirmó que la distribución de ácido hialurónico aumentó en el grupo administrado con HAPLN1 hasta un nivel similar al del ratón joven, cuando se compara con el grupo sin administración, como se muestra en la FIG. 8B.

<Ejemplo 4> Identificación del aumento en la producción de colágeno de receptor II de TGF- β inducida por TGF- β 1, y enzima de síntesis de ácido hialurónico (HAS2) por tratamiento con HAPLN1

1. Identificación del aumento en la producción de colágeno inducida por TGF- β 1 en célula NHDF por tratamiento con HAPLN1

Se sometieron líneas celulares de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) a ensayo de transferencia Western para identificar si HAPLN1 afectaba la producción de proCOL1 α 2 inducida por TGF- β 1. TGF- β es un factor que induce la producción de colágeno. 30 minutos después de que se trataran las líneas celulares NHDF con diferentes

concentraciones de HAPLN1 humana recombinante (rhHAPLN1) (0, 25, 50 y 100 ng/mL), se trataron las líneas celulares NHDF con 1 ng/mL de TGF- β 1 humano recombinante durante 24 horas.

Como resultado, se confirmó que la producción de proCOL1 α 2 inducida por TGF- β 1 aumentó por tratamiento con HAPLN1 como se muestra en la FIG. 9.

2. Identificación del aumento en el receptor II de TGF- β en célula NHDF por tratamiento con HAPLN1

Para identificar si HAPLN1 afectaba la señalización de TGF- β , se trataron líneas celulares NHDF con diferentes concentraciones de HAPLN1 humana recombinante (rhHAPLN1) (0, 25, 50 y 100 ng/mL). Después de 24 horas, se midieron los niveles de expresión de proteína de receptores de TGF- β por transferencia Western.

Como resultado, se confirmó que el nivel de expresión de proteína del receptor II de TGF- β entre los dos tipos de receptores como se muestra en la FIG. 10A aumentó en un modo dependiente de la concentración por tratamiento con HAPLN1. Como resultado de la medición de niveles de ARNm de expresión de los receptores de TGF- β por qRT-PCR en las mismas condiciones, se confirmó que no hubo diferencia por tratamiento con HAPLN1 como se muestra en las FIGS. 10B y 10C.

Así, para identificar si HAPLN1 aumentó la cantidad del receptor II de TGF- β por regulación de la estabilidad en lugar de regulación transcripcional, se trataron las

células, que se pretrataron con cicloheximida como inhibidor de la síntesis de proteínas a una concentración de 10 μ M durante 1 hora, con 100 ng/mL de rhHAPLN1 durante 6 horas o 24 horas, y se identificaron los niveles de expresión de proteína del receptor II de TGF- β por transferencia Western.

Como resultado, se confirmó que la cantidad de receptor II de TGF- β aumentó por tratamiento con rhHAPLN1 incluso en presencia de cicloheximida como se muestra en la FIG. 11. Así, se puede observar que HAPLN1 aumenta la estabilidad del receptor II de TGF- β .

3. Identificación del aumento de la expresión de ácido hialurónico sintasa (HAS2) inducida por TGF- β 1 en célula NHDF por tratamiento con HAPLN1

En fibroblastos dérmicos, existe ácido hialurónico sintasa 2 HAS2 principalmente entre tres tipos de ácido hialurónico sintasas HAS1, HAS2 y HAS3. Para identificar si HAPLN1 afecta la expresión de HAS2 inducida por TGF- β 1 en líneas celulares NHDF, 30 minutos después de que las líneas celulares NHDF se trataran con diferentes concentraciones de HAPLN1 humana recombinante (rhHAPLN1) (0, 25, 50 y 100 ng/mL), se trataron las líneas celulares NHDF con 1 ng/mL de TGF- β 1 humano recombinante durante 24 horas y se identificaron los niveles de expresión de proteína de HAS2 por transferencia Western.

Como resultado, se confirmó que el nivel de expresión de HAS2 inducida por TGF- β 1 aumentó por tratamiento con HAPLN1 como se muestra en la FIG. 12.

La descripción anterior de la divulgación se
5 proporciona con el fin de ilustración, y se entendería por los expertos en la técnica que las realizaciones anteriormente descritas de la divulgación son ilustrativas en todos los aspectos y no limitan la divulgación. Por tanto, el alcance de la divulgación se define por las
10 siguientes reivindicaciones y sus equivalentes en vez de por la descripción detallada de las realizaciones ilustrativas.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la
15 práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

