



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 114**

51 Int. Cl.:  
**C07K 7/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06729849 .7**

96 Fecha de presentación : **17.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1866328**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2007**

54 Título: **Péptidos que aumentan la producción de colágeno o de ácido hialurónico.**

30 Prioridad: **22.03.2005 JP 2005-81899**  
**24.10.2005 JP 2005-308356**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.04.2011**

73 Titular/es: **ROHTO PHARMACEUTICAL Co., Ltd.**  
**8-1 Tatsumi Nishi 1-chome**  
**Ikuno-ku, Osaka-shi, Osaka 544-8666, JP**

72 Inventor/es: **Honma, Yoichi;**  
**Kikuchi, Kazuaki;**  
**Uemura, Hiroshi;**  
**Inaoka, Satoshi y**  
**Tsunetsugu, Shuichi**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 114 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

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un nuevo péptido que tiene una secuencia de aminoácidos especificada o su derivado, o sus sales. Además, la presente invención se refiere a una composición que contiene el nuevo péptido o su derivado, o sus sales, a un procedimiento para utilizar el nuevo péptido o su derivado, o sus sales, al uso del nuevo péptido o su derivado, o sus sales. El nuevo péptido de la presente invención o su derivado, o sus sales, puede utilizarse para potenciar la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico en una célula.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

10 De manera tradicional, se sabe que un tejido conectivo de un animal contiene, como componentes principales, colágeno, ácido hialurónico, elastina, sulfato de condroitina, sulfato de heparano, sulfato de dermatano, laminina o similares. Entre estos, el colágeno y el ácido hialurónico desempeñan un papel importante en el tejido conectivo, como se describirá a continuación.

15 En otras palabras, el colágeno es la principal proteína que constituye el tejido conectivo de un animal y, en particular, el colágeno constituye casi 30% de las proteínas totales en el cuerpo humano. Puesto que la principal función del colágeno es la formación de estructuras esqueléticas en un tejido vivo, está ampliamente distribuido en la piel, los tejidos cartilagosos, la córnea, el corazón, el hígado o similares, como componente principal que constituye la estructura esquelética de una forma de tejido en un animal. Puesto que el colágeno actúa de modo específico sobre la adhesión de diversos tipos de células y sobre la diferenciación o la proliferación de células, y también desempeña un papel como factor regulador de la función celular, una disminución en el colágeno puede provocar diversas enfermedades, tales como trastornos corneales, como la úlcera corneal, trastornos articulares, como el reumatismo, la artritis, la artritis degenerativa y la osteoartritis, y enfermedades inflamatorias en algunos casos.

20 En la matriz extracelular de la dermis de la piel, la formación de una red de haces a partir de fibras de colágeno mantiene la forma del tejido. Cuando una fibra de colágeno madura y prolifera puede formar reticulaciones, para producir un haz de fibras de colágeno recta y gruesa, que a su vez aporta una firmeza apropiada a la piel en una piel joven. Sin embargo, en las pieles envejecidas, cuando disminuye la actividad de los fibroblastos (por ejemplo, la actividad de producción de colágeno y similares), puesto que disminuye en gran medida la presencia de fibras de colágeno en la matriz extracelular de la dermis y se forman unas reticulaciones anómalas debido a la edad, la piel se hace rígida y se pierde, de modo indeseable, la firmeza de la piel original que era elástica. Como resultado en la piel se forman arrugas y descolgamientos. Se han estudiado en detalle los cambios en la estructura de los haces de fibras de colágeno de un ratón sin pelo por el fotoenvejecimiento (véase, *Fragrance Journal*, 4, 36-37, 1998). Los resultados demuestran que en un ratón sin pelo irradiado con UVB se forman arrugas, se degrada la estructura de los haces de fibras de colágeno y se reduce la elasticidad de la piel, correspondiendo a la formación de arrugas. Además, también se sabe que el colágeno resulta excelente para la función de retención de la humedad.

35 Para mejorar el estado provocado por la disminución del colágeno, se han descubierto diversas sustancias para potenciar la síntesis de colágeno. Por ejemplo, se conoce el ácido retinoico (véase, por ejemplo, R. Marks et al., *British Journal of Dermatology*, 122, 91-98, 1990), una preparación que contiene tres tipos de aminoácidos que consisten en glicina, prolina y alanina (véase, por ejemplo, la patente japonesa abierta a consulta por el público n° Hei 7-194375), un extracto de plantas de regaliz, corteza de morera, aloe, *Equisetum arvense*, *Lonicerae flos*, corteza de alcornoque, hojas de *Artemisia princeps*, genciana o similares (véase, por ejemplo, la patente japonesa abierta a consulta por el público n° 2001-206835), TGF- $\beta$ , ácido ascórbico y similares. Además, también se conoce otra sustancia para potenciar la síntesis de colágeno, que es un péptido que consiste en los restos aminoácidos del 182 al 241 del procolágeno de tipo I (véase, por ejemplo, K. Katayama et al., *Biochemistry*, 30, 7097-7104, 1991), y un péptido Lys-Thr-Thr-Lys-Ser seleccionado del péptido mencionado anteriormente que consiste en los restos aminoácidos del 182 al 241 del procolágeno de tipo I (véase, por ejemplo, K. Katayama et al., *J. Biol. Chem.*, 268(14), 9941-9944, 1990).

50 Por otra parte, el ácido hialurónico es un tipo de mucopolisacárido ácido que está presente en la piel, el cartílago, el fluido articular, el cordón umbilical, el cuerpo vítreo ocular u otros tejidos conectivos. En la epidermis de la piel, entre otros, se sabe que el ácido hialurónico está ampliamente distribuido desde la capa basal a la capa granular, y que el ácido hialurónico soporta la estructura del espacio extracelular de la epidermis y está implicado en el transporte de sustancias, tales como nutrientes o desechos, desde la capa basal epidérmica a la capa de células corneas, y actúa como activador para potenciar el recambio de células epidérmicas. Además, también se sabe que el ácido hialurónico tiene una fuerte acción retentora de agua y que aproximadamente 6 l de agua pueden ser retenidos por sólo 1 g de ácido hialurónico y que, mediante esta acción, el ácido hialurónico desempeña un papel para retener la humedad en el espacio intercelular. Se sabe que el ácido hialurónico disminuye gradualmente con la edad, y también que esta disminución es un causa del envejecimiento de la piel, tal como la formación de arrugas y descolgamientos, la

disminución de la elasticidad y de la firmeza de la piel, la sequedad de la piel, o la rugosidad de la piel en el caso del colágeno. Sin embargo, el ácido hialurónico es un compuesto polimérico, de modo que no resulta fácil suministrar ácido hialurónico a la epidermis desde fuera de la piel, y para suministrar ácido hialurónico a una parte, tal como el espacio entre células epidérmicas, es importante potenciar la biosíntesis de ácido hialurónico dentro de un cuerpo vivo.

5 Para mejorar el estado provocado por una disminución en el ácido hialurónico, se han descubierto diversas sustancias para potenciar la síntesis de ácido hialurónico. Por ejemplo, se conoce un extracto de aloe, un extracto de okra, un derivado de  $\beta$ -1,3-glucano hidrosoluble, un extracto de levadura (patente japonesa abierta a consulta por el público nº 2004-051533), un extracto de un alga marina del género *Callophyllis* de la familia *Kallymeniaceae* (patente japonesa abierta a consulta por el público nº 2000-136147), un extracto de lavanda (patente japonesa abierta a consulta por el público nº Hei 10-182402), y and un extracto de un alga marina del género *Durvillea* de la familia *Durvilleaceae* (patente japonesa abierta a consulta por el público nº Hei 09-176036).

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 Sin embargo, puesto que los materiales convencionales no son suficientemente satisfactorios con respecto a su seguridad y sus efectos, se ha deseado el desarrollo de un material nuevo que sea seguro y que tenga la capacidad de potenciar significativamente la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico. A la vista de los problemas convencionales, un objeto de la presente invención es proporcionar un material nuevo que sea seguro y que tenga la capacidad de potenciar significativamente la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico.

20 Como resultado de profundos estudios para resolver los problemas mencionados anteriormente, los presentes inventores ha descubierto que un nuevo péptido que tiene una secuencia de aminoácidos especificada puede utilizarse como material nuevo que es seguro y que tiene la capacidad de potenciar significativamente la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico. Así, la presente invención se ha perfeccionado.

Concretamente, la presente invención se refiere a:

25 1. Un péptido que se representa mediante la fórmula:

Leu-Glu-His-Ala (SEQ ID NO:1)

o su derivado, o sus sales,

30 en el que el derivado puede obtenerse mediante acetilación, palmitoilación, miristilación, amidación, acrilación, dansilación, biotinilación, fosforilación, succinilación, formación de anilidas, benciloxycarbonilación, formilación, nitración, sulfonación, formación de aldehídos, ciclación, glicosilación, monometilación, dimetilación, trimetilación, guanidilación, amidinación, maleilación, trifluoroacetilación, carbamilación, trinitrofenilación, nitrotroponilación o acetoacetilación del péptido.

2. Un péptido que se representa mediante la fórmula:

Leu-Asp-His-Ala (SEQ ID NO:19)

35 o su derivado, o sus sales,

40 en el que el derivado puede obtenerse mediante acetilación, palmitoilación, miristilación, amidación, acrilación, dansilación, biotinilación, fosforilación, succinilación, formación de anilidas, benciloxycarbonilación, formilación, nitración, sulfonación, formación de aldehídos, ciclación, glicosilación, monometilación, dimetilación, trimetilación, guanidilación, amidinación, maleilación, trifluoroacetilación, carbamilación, trinitrofenilación, nitrotroponilación o acetoacetilación del péptido.

3. Un péptido que se representa mediante la fórmula:

Leu-Glu-His-Ala-Phe (SEQ ID NO:20)

o su derivado, o sus sales,

45 en el que el derivado puede obtenerse mediante acetilación, palmitoilación, miristilación, amidación, acrilación, dansilación, biotinilación, fosforilación, succinilación, formación de anilidas, benciloxycarbonilación, formilación, nitración, sulfonación, formación de aldehídos, ciclación, glicosilación, monometilación, dimetilación, trimetilación, guanidilación, amidinación, maleilación, trifluoroacetilación, carbamilación, trinitrofenilación, nitrotroponilación o acetoacetilación del péptido.

4. Una composición que contiene el péptido o su derivado, o sus sales, según se define en uno cualquiera de [1] a [3].

5. La composición según [4], en la que la composición puede utilizarse para potenciar la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico en una célula.

5 6. La composición según [4] o [5], en la que la composición puede utilizarse como agente para la aplicación externa.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 Según la presente invención, se proporciona un nuevo material que tiene la capacidad de potenciar la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico. Además, se demuestra que el péptido de la presente invención o su derivado, o sus sales, no reduce significativamente el número de células cuando se pone en acción en una célula. Por tanto, según la presente invención se proporciona un nuevo péptido o su derivado, o sus sales, que tiene la capacidad de potenciar la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico, y que puede utilizarse de modo seguro sin mostrar citotoxicidad.

15 Se describe un péptido representado por la fórmula (I):

Leu-Glu-His,

o su derivado, o sus sales.

20 La presente descripción también proporciona un péptido que se caracteriza porque el péptido tiene una sustitución y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por la fórmula (I): Leu-Glu-His, y que tiene la capacidad de potenciar la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico en una célula (en el que el péptido no contiene Lys-Thr-Thr-Lys-Ser), o su derivado, o sus sales.

25 En la presente memoria descriptiva, "un derivado de un péptido" se refiere, por ejemplo, a un derivado obtenido mediante acetilación, palmitoilación, miristilación, amidación, acrilación, dansilación, biotilación, fosforilación, succinilación, formación de anilidas, benciloxicarbonilación, formilación, nitración, sulfonación, formación de aldehídos, ciclación, glicosilación, monometilación, dimetilación, trimetilación, guanidilación, amidinación, maleilación, trifluoroacetilación, carbamilación, trinitrofenilación, nitrotronilación o acetoacetilación del péptido. Entre éstas, se prefiere la palmitoilación, puesto que se espera que aumente la permeabilidad hacia el interior de la célula, y también es preferible la acetilación del N-terminal, la amidación del C-terminal y la metilación del C-terminal, puesto que se espera que confieran resistencia contra las exopeptidasas que degradan al péptido desde su terminal y, por tanto, aumentan la estabilidad en un cuerpo vivo.

30 En la presente memoria descriptiva, una "sal" se refiere a cualquier sal farmacológicamente aceptable (incluyendo sales inorgánicas y sales orgánicas) de un péptido o de su derivado, e incluye, por ejemplo, la sal de sodio, la sal de potasio, la sal de calcio, la sal de magnesio, la sal de amonio, la sal hidrocloreto, sulfato, nitrato, sales orgánicas (acetato, citrato, maleato, malato, oxalato, lactato, succinato, fumarato, propionato, formiato, benzoato, picrato, bencensulfonato), preferiblemente sales de amonio, hidrocloreto, sulfato y acetato, más preferiblemente sales de amonio y acetato de un péptido o su derivado.

35 La sustitución de un aminoácido es preferiblemente una sustitución de un aminoácido conservadora, es decir, una sustitución conservadora de un aminoácido.

40 En la presente memoria descriptiva, la expresión "sustitución conservadora de un aminoácido" se refiere a una sustitución entre aminoácidos dentro de cada grupo que se muestra en la siguiente tabla 1.

Tabla 1

Aminoácidos ácidos	ácido aspártico (D), ácido glutámico (E)
Aminoácidos básicos	arginina (R), lisina (K), histidina (H)
Aminoácidos hidrófilos	serina (S), treonina (T), asparagina (N), glutamina (Q)
Aminoácidos hidrófobos	triptófano (W), fenilalanina (F), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), metionina (M), prolina (P), alanina (A)
Aminoácidos aromáticos	tirosina (Y), triptófano (W), fenilalanina (F)
Hidroxiaminoácidos	serina (S), treonina (T)
Aminoácidos que contienen azufre	cisteína (C), cistina, metionina (M)
Aminoácidos pequeños	glicina (G), alanina (A), serina (S), metionina (M), treonina (T)

5 Entre éstas, las sustituciones conservadoras de aminoácidos preferidas incluyen la sustitución entre ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E), la sustitución entre arginina (R), lisina (K) e histidina (H), la sustitución entre triptófano (W) y fenilalanina (F), la sustitución entre fenilalanina (F) y valina (V), la sustitución entre leucina (L), isoleucina (I) y alanina (A), y la sustitución entre glicina (G) y alanina (A).

La sustitución (conservadora) de uno o más aminoácidos se refiere, preferiblemente, a una sustitución (conservadora) de uno o varios aminoácidos, más preferiblemente la sustitución (conservadora) de 1 a 3 aminoácidos, aún más preferiblemente la sustitución (conservadora) de 1 a 2 aminoácidos, todavía más preferiblemente la sustitución (conservadora) de un aminoácido.

10 La adición de uno o más aminoácidos se refiere a la adición de preferiblemente 1 a 22 aminoácidos, más preferiblemente de 1 a 12 aminoácidos, aún más preferiblemente de 1 a 5 aminoácidos, todavía más preferiblemente de 1 a 3 aminoácidos, aún todavía más preferiblemente de 1 a 2 aminoácidos.

15 Los péptidos que tienen una sustitución conservadora y/o adición de uno o más aminoácidos en Leu-Glu-His (en lo sucesivo denominado LEH según el código de una letra de aminoácidos, en algunos casos) incluyen, por ejemplo, los que contienen una sustitución conservadora de uno o más aminoácidos (por ejemplo, IEH, LDH, LDK, LEK), y los que tienen uno o más aminoácidos añadidos a la secuencia LEH (por ejemplo, LEHA, LEHW, LEHF, LEHV, LEHL, LEHI, LEHM, LEHG, LEHS, LEHT, ALEH, GLEH, SLEH, MLEH, TLEH, LEHAW, LEHAF, LEHAV, LEHAL, LEHAI, LEHAM, LEHAG, LEHAS, LEHAT, ALEHA, GLEHA, SLEHA, MLEHA, TLEHA, FLEHA, SLEHHT, GLEHAL, DLEHAL, QLEHAK, SLEHAD, QLEHAR, EFLEHA, LEHAVV, DPELEHA, HLEHAAS, LEHASVD) y similares. Entre éstos, los péptidos preferidos incluyen IEH, LDH, LDK, LEK, LEHA, LEHF, LEHG, LEHAF, FLEHA, SLEHHT, GLEHAL, DLEHAL, QLEHAK, SLEHAD, QLEHAR, EFLEHA, LEHAW, DPELEHA, HLEHAAS, LEHASVD, y más preferiblemente los péptidos son LEHA y LEHAF.

25 Además, los péptidos que tienen una sustitución conservadora y una adición de uno o más aminoácidos en el péptido LEH incluyen, como ejemplos preferidos, por ejemplo, IEHA, LDHA, LDKA, LEKA. Como ejemplos más preferidos de dichos péptidos se incluyen los péptidos que tienen una sustitución y/o adición de uno o más aminoácidos en el péptido LEHA, más preferiblemente los péptidos que tienen una sustitución conservadora y/o adición de uno o más aminoácidos en el péptido LEHA. En este caso, una sustitución (conservadora) y/o adición de uno o más aminoácidos tiene el mismo significado que el descrito anteriormente.

30 Además, los péptidos que tienen uno o varios aminoácidos delecionados de un péptido que tiene una sustitución conservadora y/o adición de uno o más aminoácidos en el péptido LEH también se incluyen en el péptido de la presente descripción, por cuanto el péptido tenga la capacidad de potenciar la producción de colágeno o ácido hialurónico en una célula. Dicho péptido incluye, por ejemplo, EHA, LHA, LEA y similares, que es un péptido que tiene un aminoácido delecionado del péptido LEHA.

La presente invención proporciona los péptidos LEHA, LDHA y LEHAF.

35 En la presente memoria descriptiva, la expresión "que tiene capacidad de potenciar la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico en una célula" significa que cuando un péptido de interés o su derivado, o sus sales, se pone en acción en una célula, la cantidad de producción de colágeno, ácido hialurónico o ambos en la célula aumenta comparado con el caso en que el péptido de interés o su derivado, o sus sales, no se pone en acción en la célula. Esta expresión significa que, por ejemplo, cuando el péptido de interés o su derivado, o sus sales, se pone en acción a una concentración de 10 µg/ml en un ensayo para un sistema de cultivo de una célula humana, la cantidad de producción de colágeno en la célula

5 alcanza, por ejemplo, aproximadamente 110% o más, más preferiblemente aproximadamente 120% o más, aún más preferiblemente aproximadamente 130% o más, comparado con el caso en que el péptido de interés o su derivado, o sus sales, no se pone en acción. Esta expresión también significa que, por ejemplo, cuando el péptido de interés o su derivado, o sus sales, se pone en acción a una concentración de 100 µg/ml, la cantidad de producción de ácido hialurónico en una célula alcanza, por ejemplo, aproximadamente 110% o más, más preferiblemente aproximadamente 120% o más, aún más preferiblemente aproximadamente 130% o más, comparado con el caso en que el péptido de interés o su derivado, o sus sales, no se pone en acción. En una realización específica, la célula relacionada con la expresión mencionada anteriormente significa un fibroblasto o un queratinocito y, en otra realización específica, significa un fibroblasto de la piel o un queratinocito epidérmico.

10 El péptido de la presente invención puede prepararse mediante un procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, el péptido de la presente invención puede sintetizarse mediante un procedimiento quimiosintético (por ejemplo, un procedimiento en fase sólida (por ejemplo, el procedimiento Fmoc), o un procedimiento en fase líquida), o puede prepararse mediante un procedimiento tal como la expresión recombinante. Los aminoácidos que constituyen el péptido de la presente invención pueden ser de tipo L o de tipo D, preferiblemente de tipo L.

15 Además, el péptido de la presente invención también puede prepararse cortando y escindiendo un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de interés procedente de una secuencia de aminoácidos de una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos de interés mediante un procedimiento conocido, tal como un tratamiento con proteasas. Por ejemplo, una proteína que contiene la secuencia LEH y la secuencia LEHA incluye las proteínas que se muestran en la tabla 2.

20 Tabla 2

Organismo fuente	Nombre de la proteína	Porción que contiene la secuencia LEHA	Secuencia
<i>Daucus carota</i>	precursor de clase 3 de la isozima I de la β-fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26), soluble	restos 12-15	LPSRDLEHASSYTP (SEQ ID NO:6)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	3β-hidroxilasa	restos 134-137	IFGSPLEHARQLWP (SEQ ID NO:7)
<i>Solanum tuberosum</i>	precursor de la subunidad beta de chaperonina-60	restos 560-563	VVRCCLEHAASVAK (SEQ ID NO:8)
<i>Oryza sativa</i>	beta chaperonina-60 putativa	restos 562-565	VVRCCLEHAASVAK (SEQ ID NO:9)
<i>Glycine max</i>	precursor de G3 glicinina	restos 228-231	FAPEFLEHAFVVDNR (SEQ ID NO:10)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	homólogo COK-4 de la serina treonina quinasa	restos 334-337	EVEVQLEHALSMQE (SEQ ID NO:11)
<i>Manihot esculenta</i>	flavonol 3-O-glucosiltransferasa y (EC 2.4.1.91) (UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa 7) (fragmento)	restos 168-171	PQVEILEHAALGVF (SEQ ID NO:12)
<i>Prunus persica</i>	MADS6	restos 93-96	TGSWTLEHAKLKAR (SEQ ID NO:13)
<i>Fragaria x ananassa</i>	UDP-glucosa glucosiltransferasa	restos 304-307	EIANALEHAGHRFL (SEQ ID NO:14)
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	canal activado por hiperpolarización (Ih)	restos 406-409	VAINGLEHAHWWEQ (SEQ ID NO:15)
<i>Lethenteron japonicum</i>	homeoproteína LjEMX	restos 193-196	SQLLRLEHAFAEKNH (SEQ ID NO:16)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	paramiosina	restos 618-621	DARSLLEHAERARK (SEQ ID NO:17)

Los expertos en la técnica pueden seleccionar de forma apropiada una proteasa adecuada para cortar y escindir un péptido que consista en la secuencia de aminoácidos de interés a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína que contenga la secuencia de aminoácidos de interés, tomando en consideración la especificidad de secuencia de la proteasa. Por ejemplo, para cortar y escindir la secuencia LEHA de la secuencia mencionada anteriormente derivada de *Daucus carota* (SEQ ID NO:6), un procedimiento para cortar y escindir puede ejemplificarse mediante el uso concomitante de termolisina (derivada de *Bacillus thermoproteolyticus*) y quimotripsina (derivada de páncreas bovino). Además, por ejemplo, para cortar y escindir la secuencia LEHA de la secuencia mencionada anteriormente derivada de *Solanum tuberosum* (SEQ ID NO:8), el procedimiento puede ejemplificarse mediante el uso concomitante de la proteasa M "Amano" G (derivada de *Aspergillus oryzae*, fabricada por Amano Enzyme, Inc.) y la termolisina mencionada anteriormente. Además, por ejemplo, para cortar y escindir la secuencia LEHA de la secuencia mencionada anteriormente derivada de *Oryza sativa* (SEQ ID NO:9), el procedimiento puede ejemplificarse mediante el uso concomitante de la proteasa M "Amano" G mencionada anteriormente y la termolisina mencionada anteriormente. Además, por ejemplo, para cortar y escindir la secuencia LEHA de la secuencia mencionada anteriormente derivada de *Glycine max* (SEQ ID NO:10), el procedimiento puede ejemplificarse mediante el uso de la termolisina mencionada anteriormente. Además, por ejemplo, para cortar y escindir la secuencia LEHA de la secuencia mencionada anteriormente derivada de *Phaseolus vulgaris* (SEQ ID NO:11), el procedimiento puede ejemplificarse mediante el uso concomitante de la quimotripsina mencionada anteriormente y la termolisina mencionada anteriormente. Además, por ejemplo, para cortar y escindir la secuencia LEHA de la secuencia mencionada anteriormente derivada de *Manihot esculenta* (SEQ ID NO:12), el procedimiento puede ejemplificarse mediante el uso concomitante de la quimotripsina y la termolisina mencionada anteriormente. Además, por ejemplo, para cortar y escindir la secuencia LEHA de la secuencia mencionada anteriormente derivada de *Lethenteron japonicum* (SEQ ID NO:16), el procedimiento puede ejemplificarse mediante el uso concomitante de tripsina (derivada de páncreas de cerdo) y la termolisina mencionada anteriormente. La combinación de una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos de interés y una proteasa no se limita a las combinaciones mencionadas anteriormente, y una combinación preferida incluye una combinación de proteína de soja (proteína derivada de *Glycine max*) y termolisina.

Las condiciones de reacción utilizadas cuando se hidroliza una proteína con una proteasa no se limitan de modo específico, y los expertos en la técnica pueden seleccionarlas de modo apropiado según el conocimiento técnico general habitual. Por ejemplo, cuando se emplea una proteasa disponible en el mercado, las condiciones de reacción pueden seleccionarse según sus instrucciones. En general, puede utilizarse una temperatura de reacción de 30 °C a 80 °C, preferiblemente de 40 °C a 70 °C, más preferiblemente de 50 °C a 60 °C. Además, puede utilizarse un tiempo de reacción de 2 a 30 horas, preferiblemente de 3 a 24 horas, más preferiblemente de 10 a 20 horas, en especial preferiblemente de 12 a 18 horas. El pH de la reacción preferiblemente es aproximadamente el pH óptimo de la proteasa utilizada. Los medios para terminar la reacción no se limitan de modo específico, y puede emplearse un procedimiento conocido. Estos medios incluyen, por ejemplo, tratamiento con calor, tal como un calentamiento a 85 °C durante 15 minutos o un calentamiento a 100 °C durante 5 minutos.

Después del tratamiento de hidrólisis con una proteasa, el péptido de interés puede obtenerse mediante una purificación según medios conocidos en la técnica. Como medio conocido se puede utilizar, por ejemplo, una resina de intercambio iónico de ácidos fuertes, o una resina de octadecilsílice (ODS). Por ejemplo, el péptido de interés puede purificarse adsorbiendo una disolución acuosa del péptido tratado con la proteasa sobre una resina de ODS, y eluyendo el péptido con un disolvente orgánico (por ejemplo, acetonitrilo) a cualquier concentración. Como alternativa, por ejemplo, el péptido de interés puede purificarse adsorbiendo una disolución acuosa del péptido tratado con una proteasa sobre una resina de intercambio iónico de ácidos fuertes, y eluyendo el péptido con un eluato (por ejemplo, una disolución de cloruro de sodio o cloruro de potasio) que tenga una concentración salina de 0,18 M a 0,25 M, más preferiblemente de 0,20 M a 0,23 M.

Por tanto, un péptido obtenido hidrolizando una proteína nativa con una proteasa resulta ventajoso desde el punto de vista económico, comparado con el caso de fabricarlo mediante un procedimiento quimiosintético. Además, se supone que un péptido obtenido hidrolizando una proteína nativa con una proteasa es más seguro para un cuerpo vivo. Por tanto, el péptido obtenido de esta manera puede utilizarse, de modo adecuado, para una medicina para la aplicación interna, para un producto alimentario, para un cosmético para pieles sensibles, y para un pienso, cuyas aplicaciones a un cuerpo vivo requieren mayor seguridad.

El derivado del péptido de la presente invención puede prepararse mediante un procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, un ejemplo de procedimiento es el siguiente: se acetila el N-terminal de un péptido LEH, por ejemplo (según el procedimiento de síntesis en fase sólida mediante el procedimiento Fmoc (L.A. Carpino, G.Y. Han, J. Am. Chem. Soc., 92, 5748 (1970)). En primer lugar, el C-terminal de Fmoc-His(1-Trt)-OH se une a una resina para la síntesis en fase sólida, y después se retira el grupo protector (Fmoc) mediante un tratamiento con piperidina. Después, la resina obtenida se neutraliza y se lava, y se introduce Fmoc-Glu(OtBu)-OH en el N-terminal de His. Luego se retira el grupo protector (Fmoc) mediante un tratamiento con piperidina, y la resina obtenida se neutraliza y se vuelve a lavar. Después se introduce N-acetil-leucina en el N-terminal de Glu. Se corta y escinde una

cadena peptídica de la resina obtenida y se realiza la desprotección escindiendo el grupo Trt de His y el grupo tBu de Glu con TFA (ácido trifluoroacético). Por último, se lleva a cabo una purificación retirando las sustancias sin reaccionar mediante HPLC preparativa, para producir LEHA cuyo N-terminal está acetilado. Será evidente para los expertos en la técnica que puede prepararse cualquier derivado modificando de modo apropiado el procedimiento mencionado y que, por ejemplo, cuando se prepara LEH palmitoilada en en N-terminal, la N-acetil-leucina mencionada anteriormente puede reemplazarse por N-palmitoil-leucina.

Los expertos en la técnica también pueden preparar con facilidad la sal del péptido de la presente invención mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica.

El péptido de la presente invención o su derivado, o sus sales, obtenido de esta manera puede utilizarse para potenciar la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico en una célula.

Como se muestra en los siguientes ejemplos, se confirma que el cultivo de fibroblastos de la piel en una disolución de cultivo a la cual se añade dicho péptido o su derivado, o sus sales, produce un aumento en la producción del colágeno de tipo I en la célula, y que el cultivo de queratinocitos epidérmicos en la disolución de cultivo produce un aumento en la producción de ácido hialurónico en la célula.

La presente invención también proporciona una composición caracterizada porque la composición contiene el péptido de la invención mencionado anteriormente o su derivado, o sus sales. Debido a estas características, la composición puede utilizarse de modo adecuado, por ejemplo, como una composición farmacéutica, un producto alimentario, un cosmético o un pienso y, además, como reactivo de investigación para ayudar a comprender trastornos fisiológicos asociados con el colágeno o con el ácido hialurónico.

La composición farmacéutica incluye, por ejemplo, un agente terapéutico o un agente profiláctico para una enfermedad provocada por la disminución en la cantidad de colágeno y/o ácido hialurónico en un mamífero representado por un ser humano. De modo específico, la composición de la presente invención puede utilizarse de modo adecuado como agente terapéutico y/o agente profiláctico para una enfermedad articular, tal como artritis reumatoide, artritis degenerativa u osteoartritis, o como un agente profiláctico y/o agente terapéutico para las arrugas o el descolgamiento de la piel debido a la exposición a luz ultravioleta, o al envejecimiento, y además, como un agente profiláctico y/o agente terapéutico para la disminución de la elasticidad o firmeza de la piel.

Los productos alimentarios incluyen, por ejemplo, un producto alimentario para mejorar o prevenir trastornos provocados por una disminución en la cantidad de colágeno y/o ácido hialurónico en un mamífero representado por un ser humano. De modo específico, la composición de la presente invención puede utilizarse de modo adecuado como un producto alimentario para la mejora o la prevención de síntomas, tales como la artralgia, o como un producto alimentario para la mejora o la prevención de las arrugas o el descolgamiento de la piel debido a la exposición a luz ultravioleta, o al envejecimiento, y además, como un producto alimentario para la prevención o la disminución de la elasticidad o firmeza de la piel.

El cosmético incluye, por ejemplo, un cosmético para la prevención y/o la mejora de las arrugas o el descolgamiento de la piel debido a la exposición a luz ultravioleta, al envejecimiento o similares, y un cosmético para la prevención y/o la mejora de la disminución de la elasticidad o firmeza de la piel.

El pienso incluye, por ejemplo, un pienso para mejorar o prevenir trastornos provocados por una disminución en la cantidad de colágeno y/o ácido hialurónico en ganado, tales como bóvidos, cerdos, aves de corral, ovejas y caballos, o en animales domésticos, tales como perros y gatos. De modo específico, la composición de la presente invención puede utilizarse de modo adecuado como un pienso para mejorar o prevenir diversas enfermedades provocadas por una disminución en la cantidad de colágeno y/o ácido hialurónico, tales como enfermedades corneales, como úlcera corneal, trastornos articulares, como reumatismo, artritis, artritis degenerativo y osteoartritis, y enfermedades inflamatorias.

El contenido en péptido mencionado anteriormente o su derivado, o sus sales, en la composición de la presente invención varía dependiendo del tipo de péptido o su derivado, o sus sales, de la forma de dosificación y similares de la composición. En general, desde el punto de vista de obtener un gran efecto de potenciación de la producción de colágeno y/o ácido hialurónico, el contenido es preferiblemente del 0,0001% al 70% en peso, más preferiblemente del 0,001% al 50% en peso, aún más preferiblemente del 0,001% al 20% en peso, todavía más preferiblemente del 0,01% al 10% en peso, todavía más preferiblemente del 0,05% al 10% en peso, todavía más preferiblemente del 0,12% al 10% en peso.

La composición de la presente invención puede prepararse combinando de modo apropiado un vehículo, una base y/o un aditivo que normalmente se emplea en el campo de la formulación, o un producto alimentario además de péptido mencionado anteriormente o su derivado, o sus sales, dentro del intervalo en que se puede lograr el objeto de la presente invención.

- 5 En una realización, la presente composición puede prepararse combinando lo obtenido después de purificar el péptido mencionado anteriormente o su derivado, o sus sales, de modo que se logre una concentración, por ejemplo, del 0,05% en peso o más, preferiblemente del 0,08% en peso o más, más preferiblemente del 0,1% en peso o más, aún más preferiblemente del 0,12% en peso o más, para conseguir el contenido mencionado anteriormente.
- 10 El vehículo puede utilizarse junto con uno o más tipos de, por ejemplo, azúcares (por ejemplo, manitol, lactosa o dextrina), celulosas (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa o celulosa cristalina), gomas poco hidrosolubles (por ejemplo, goma arábiga o goma de tragacanto), polímeros vinílicos reticulados, o lípidos.
- 15 La base puede utilizarse junto con uno o más tipos de, por ejemplo, agua, grasas y aceites, aceites minerales, ceras, ácidos grasos, aceites de silicona, esteroides, ésteres, jabones metálicos o alcoholes.
- 20 El aditivo puede utilizarse junto con uno o más tipos de, por ejemplo, tensioactivos, componentes solubilizantes, emulgentes, componentes oleosos, estabilizantes, espesantes, conservantes, ligantes, lubricantes, agentes dispersores, reguladores del pH, humectantes, absorbentes de ultravioleta, agentes quelantes, potenciadores de la absorción percutánea, antioxidantes, agentes disgregantes, plastificantes, tampones, vitaminas, aminoácidos, agentes colorantes o agentes perfumantes.
- 25 Además, para añadir otra acción útil si es necesario, la composición de la presente invención puede contener una combinación de uno o más tipos de diversos componentes, tales como un componente de aclaramiento de la piel, un componente antiinflamatorio, un componente antibiótico, un componente activador de células, un componente astringente, un componente antioxidante, un componente que mejora el acné, un componente para potenciar la síntesis de un componente biológico, tal como colágeno, un componente para potenciar la circulación, un componente humectante y un componente antienvjecimiento.
- 30 La composición de la presente invención puede tomar la forma de cualquier forma de dosificación, tal como un agente para la aplicación externa (incluyendo un cosmético), un agente para la aplicación interna (incluyendo un producto alimentario y un pienso), y puede utilizarse preferiblemente como un agente para la aplicación externa.
- 35 El agente para la aplicación externa puede utilizarse en cualquier forma, tal como, por ejemplo, un líquido, una emulsión, una crema, una loción, una pasta, una espuma, un gel, una lámina (soportada por un sustrato), un aerosol y un pulverizado.
- 40 EL cosmético puede utilizarse en cualquier forma, tal como, por ejemplo, un cosmético para el cuidado básico de la piel, tal como una loción, una emulsión, una crema, un aceite y una mascarilla, así como maquillaje, tal como maquillaje de base, colorete y barra de labios, y además una preparación limpiadora, tal como un limpiador facial, una preparación limpiadora y una preparación limpiadora corporal, y un agente para baño.
- 45 El agente para la aplicación interna (incluyendo un producto alimentario y un pienso) puede utilizarse en cualquier forma, tal como, por ejemplo, un comprimido, una píldora, un gránulo, un gránulo fino, un polvo, una cápsula dura, una cápsula blanda, un jarabe seco, una disolución (incluyendo una preparación, suspensión y jarabe bebibles), una preparación en gel, una preparación de liposomas, una preparación de extractos, una tintura, una preparación de limonada y una preparación de gelatina.
- 50 Además, en el caso de un producto alimentario, la composición puede proporcionarse en cualquier forma general de producto alimentario, tal como pan, fideos, alimentos precocinados, productos cárnicos procesados (por ejemplo, jamón, salchichas o similares), productos marinos procesados, salsas (por ejemplo, aliños o similares), productos lácteos, productos de pastelería (por ejemplo, galletas, caramelos, gelatina, helados o similares), sopa y zumos. Cuando se preparan dichas formas, el péptido de la presente invención o su derivados, o sus sales, puede combinarse de modo apropiado mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, dependiendo de las propiedades del producto alimentario de interés.
- 55 El pienso no se limita de modo específico, puesto que el pienso puede utilizarse en cualquier forma.
- 60 La composición de la presente invención puede utilizarse para potenciar la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico en una célula, que emplea la capacidad del péptido mencionado anteriormente o su derivado, o sus sales, para potenciar la producción de colágeno y/o ácido hialurónico en una célula.
- 65 La presente descripción contempla además un procedimiento para potenciar la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico en una célula, que se caracteriza porque se emplea el péptido mencionado anteriormente o su derivado, o sus sales, o la composición mencionada anteriormente.

En el procedimiento de la presente descripción, el péptido mencionado anteriormente o su derivado, o sus sales, o la composición mencionada anteriormente puede utilizarse en una cantidad eficaz o más para obtener el efecto potenciador para la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico.

5 De modo específico, la cantidad del péptido mencionado anteriormente o su derivado, o sus sales, utilizado en el procedimiento de la presente descripción es normalmente, en el caso de un agente para la aplicación externa, preferiblemente de aproximadamente 0,1  $\mu\text{g}$  a 2 g/diarios por adulto que pese aproximadamente 50 kg. La cantidad utilizada en el caso de un agente para la aplicación interna normalmente es preferiblemente de aproximadamente 0,001 mg a 10.000 mg/diarios, más preferiblemente de aproximadamente 1 a 1.000 mg/diarios, aún más preferiblemente de aproximadamente 1 a 100 mg/diarios, por adulto que pese aproximadamente 50 kg.

10 El procedimiento de la presente descripción puede comprender también la etapa de aplicar el péptido mencionado anteriormente o su derivado, o sus sales, o la composición mencionada anteriormente a la piel. La cantidad del péptido mencionado anteriormente o su derivado, o sus sales, aplicada a la piel en este caso es preferiblemente de aproximadamente 1 ng a 500  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , aún más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

15 La presente descripción contempla además el uso del péptido mencionado anteriormente o su derivado, o sus sales, para la fabricación de una composición para potenciar la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico en una célula, preferiblemente una composición que puede utilizarse como un agente para la aplicación externa.

20 El péptido mencionado anteriormente o su derivado, o sus sales, puede utilizarse de forma que tenga el contenido mencionado anteriormente en la composición.

La presente descripción contempla además un polinucleótido que se caracteriza porque el polinucleótido consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido mencionado anteriormente.

25 El polinucleótido de la presente descripción no se limita de modo específico, con la condición de que el polinucleótido codifique el péptido mencionado anteriormente. Por ejemplo, con respecto a un polinucleótido que codifique LEHA, cualquier secuencia que sea obvio que codifique LEHA según la tabla del código genético puede utilizarse de modo apropiado dependiendo de la utilización de los codones. Preferiblemente, el polinucleótido se ejemplifica mediante las siguientes secuencias:

TTG GAA CAT GCG (SEQ ID NO:2)

30 TTG GAA CAT GCA (SEQ ID NO:3)

CTT GAA CAC GCG (SEQ ID NO:4)

CTG GAG CAC GCA (SEQ ID NO:5)

35 El polinucleótido de la presente descripción puede prepararse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polinucleótido puede prepararse utilizando un sintetizador de ADN disponible en el mercado (por ejemplo, el sintetizador de ADN Applied Biosystems 3400, fabricado por Applied Biosystems).

Utilizando un polinucleótido obtenido como se describió anteriormente, puede prepararse un plásmido o un vector de expresión descrito a continuación.

40 La presente descripción contempla además un polinucleótido que se caracteriza porque el polinucleótido consiste en una secuencia antisentido con respecto a una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido mencionado anteriormente.

Este polinucleótido también puede prepararse de la misma manera que se describió anteriormente.

El polinucleótido de la presente descripción puede utilizarse para expresar el péptido mencionado anteriormente mediante modificación genética, o en terapia génica, o como un reactivo para ayudar a comprender trastornos fisiológicos asociados con el colágeno o con el ácido hialurónico.

45 Además, utilizando dicho polinucleótido, puede prepararse un plásmido o un vector de expresión de la presente descripción descritos a continuación.

La presente descripción contempla además un plásmido que se caracteriza porque el plásmido contiene el polinucleótido mencionado anteriormente.

El plásmido de la presente descripción puede prepararse incorporando el polinucleótido de la presente invención en un plásmido conocido que incluye, pero no se limita de modo específico a, por ejemplo, un plásmido pBR o un plásmido pUC, utilizando una técnica general para experimentos de biología molecular.

5 La presente descripción contempla además un vector de expresión que se caracteriza porque el vector de expresión contiene el polinucleótido de la presente descripción.

El vector de expresión de la presente descripción puede prepararse incorporando el polinucleótido de la presente descripción en un vector conocido que incluye, pero no se limita de modo específico a, por ejemplo, pcDNA3, pSD64, o el vector del fago  $\lambda$ , utilizando una técnica general para experimentos de biología molecular de modo que el polinucleótido pueda expresarse.

10 Utilizando el plásmido o un vector de expresión obtenido como se describió anteriormente, puede prepararse un transformante descrito a continuación.

La presente descripción contempla además un transformante que se caracteriza porque el transformante contiene el polinucleótido mencionado anteriormente.

15 El transformante de la presente descripción puede obtenerse introduciendo el plásmido o el vector de expresión mencionados anteriormente en un hospedante deseado, incorporando directamente el polinucleótido mencionado anteriormente en un cromosoma del hospedante. El hospedante es, por ejemplo, *E. coli*, levaduras, células de insecto o células animales. Como procedimiento para introducir el vector de expresión en el hospedante puede utilizarse un procedimiento conocido, como por ejemplo el procedimiento de tratamiento con calcio, el procedimiento de protoplastos, el procedimiento de electroporación, o el procedimiento de DEAE dextrano.

20 El péptido mencionado anteriormente también puede obtenerse cultivando el transformante obtenido como se describió anteriormente bajo condiciones apropiadas para expresar el péptido mencionado anteriormente y purificando el péptido.

#### EJEMPLOS

25 La presente invención se describirá a continuación basándose en ejemplos, ejemplos comparativos y ejemplos de referencia.

#### Ejemplo de referencia 1 - Preparación de LEH

##### 1) Síntesis del péptido

30 Se sintetizó un péptido mediante el procedimiento de la síntesis en fase sólida con el procedimiento de Fmoc utilizando un sintetizador de péptidos automático (fabricado por SHIMADZU CORPORATION: PSSM8). El procedimiento específico fue el siguiente: en primer lugar, el C-terminal de Fmoc-His(1-Trt)-OH se unió a una resina para la síntesis en fase sólida, y después el grupo protector (Fmoc) se retiró mediante un tratamiento con piperidina. Después la resina se neutralizó y se lavó, y se introdujo Fmoc-Glu(OtBu)-OH en el N-terminal de His. Luego se retiró el grupo protector (Fmoc) mediante un tratamiento con piperidina, y esta resina se neutralizó y se lavó de nuevo. Después se introdujo Fmoc-Leu-OH en el N-terminal de Glu. Después se retiró el grupo protector (Fmoc) mediante un tratamiento con piperidina, y se cortó y escindió una cadena peptídica de esta resina. La desprotección se realizó cortando y escindiendo el grupo Trt de His y el grupo tBu de Glu con TFA (ácido trifluoroacético). Por último, la purificación se realizó eliminando las sustancias sin reaccionar mediante HPLC preparativa, para producir LEH.

##### 2) Ensayo de pureza para el péptido sintético

40 El producto purificado resultante se sometió a una cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa para su análisis [columna:  $\mu$ Bondasphere 5  $\mu$  C18-100 Å (diámetro interno: 3,9 mm, longitud: 150 mm), fabricada por Waters Corporation; fase móvil: gradiente de disolvente A que contiene ácido trifluoroacético al 0,1% y disolvente B que contiene ácido trifluoroacético al 0,1% y acetonitrilo al 90% desde el minuto 0 (disolvente B = 7%) al minuto 20 (disolvente B = 12%); caudal: 1 ml/min; procedimiento de detección: absorbancia a una longitud de onda de 220 nm]. Apareció un único pico puntiagudo en el minuto 13,1, y la pureza fue de 99%.

#### Ejemplo 1 - Preparación de LEHA

50 El péptido LEHA se sintetizó y se purificó de la misma manera que en el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 1. El producto purificado resultante se sometió a una cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa para su análisis [columna:  $\mu$ Bondasphere 5  $\mu$  C18-100 Å (diámetro interno: 3,9 mm, longitud: 150 mm), fabricada por Waters Corporation; fase móvil: gradiente de disolvente A que contiene ácido trifluoroacético al 0,1% y disolvente B que contiene ácido trifluoroacético al 0,1% y acetonitrilo al 90% desde el minuto 0 (disolvente B

= 12%) al minuto 20 (disolvente B = 17%); caudal: 1 ml/min; procedimiento de detección: absorbancia a una longitud de onda de 220 nm]. Apareció un único pico puntiagudo en el minuto 12,8, y la pureza fue de 99%.

Ejemplo 2 - Ensayo para la producción de colágeno en fibroblastos de la piel utilizando LEH y LEHA

5 Se cultivaron fibroblastos derivados de piel humana normal (CRL-1836; ATCC) en una placa de cultivo de 48 pocillos. De modo más específico, las células se cultivaron en una placa a una densidad de 12.500 células/cm<sup>2</sup>, y se cultivaron a 37 °C durante aproximadamente 72 horas en una atmósfera de dióxido de carbono gaseoso al 5% y aire al 95%. Como disolución de cultivo se utilizó medio de Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM) que contenía suero bovino fetal (FBS) a una concentración del 10% en peso, en una cantidad de 500 µl por pocillo. Cuando las células alcanzan el estado confluyente se retiró la disolución de cultivo y se añadió un medio preparado añadiendo LEH o LEHA sintetizado en el ejemplo de referencia 1 o en el ejemplo 1 al D-MEM a una concentración de 10 µg/ml, en una cantidad de 500 µl por pocillo. Aquí se utilizaron como control células a las cuales se les añadió un medio sin el péptido añadido, en una cantidad de 500 µl por pocillo. Después de 72 horas de cultivo se recogió la disolución de cultivo y se cuantificó la concentración de colágeno de tipo I en la disolución de cultivo recogida mediante un ensayo inmunoabsorbente de enzimas ligados (kit de EIA anti-péptido C de procolágeno humano de tipo I; fabricado por TAKARA BIO INC.). Basándose en los resultados de la cuantificación, se calculó la cantidad de colágeno de tipo I en la disolución de cultivo a la cual se añadió el péptido, definiéndose la cantidad de colágeno de tipo I en la disolución de cultivo control como 100%. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)	Cantidad de producción de colágeno (%)
Control	0	100
LEH	10	132,2
LEHA	10	137,5

20 Tal como se muestra en la tabla 3, se descubrió que la cantidad de producción de colágeno en los fibroblastos derivados de piel humana normal aumentó significativamente cultivando las células en cada una de las disoluciones de cultivo a las cuales se les hubo añadido un péptido.

Ejemplo 3 - Ensayo de toxicidad utilizando LEH y LEHA

25 Se añadieron 250 microlitros de D-MEM a las células después de recoger la disolución de cultivo en el ejemplo 2, y después se contó el número de células viables con el kit de recuento de células-8 (fabricado por DOJINDO LABORATORIES). Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)	Número de células viables (células)
Control	0	2,8 x 10 <sup>4</sup>
LEH	10	2,8 x 10 <sup>4</sup>
LEHA	10	2,9 x 10 <sup>4</sup>

30 Tal como se muestra en la tabla 4, no se observó una disminución significativa en el número de células viables cultivando las células en cada una de las disoluciones de cultivo a las cuales se les hubo añadido un péptido.

Ejemplo 4 - Preparación de los péptidos LEH y LEHA a partir de proteína de soja

1) Degradación con proteasas de la proteína de soja

35 Se dispersó 1 g de polvo de soja descascarillada en 40 ml de agua destilada, y el pH de la dispersión se ajustó a 8,5 con NaOH 0,1 N. Se añadieron 50 miligramos de termolisina (derivada de *Bacillus thermoproteolyticus*, nombre comercial: THERMOASE PC10F, fabricada por DAIWA KASEI K.K.), y la degradación se realizó a 60 °C durante 15 horas. Después de la reacción, la termolisina se desactivó hirviendo la dispersión a 100 °C durante 10

minutos. Después de dejar enfriar la dispersión, se añadió 1 g de adyuvante de filtro (nombre comercial: Radiolight 500, fabricado por SHOWA CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD) y la mezcla se agitó. Después se realizó una filtración.

## 2) Recogida del péptido bruto

5 El filtrado obtenido como se describió anteriormente se hizo pasar a través de una columna de 150 ml cargada con una resina de intercambio iónico de ácidos fuertes (nombre comercial: Dowex 50W X 2, forma H+, malla 50-100, fabricada por The Dow Chemical Company), y la columna se lavó con agua desionizada con 5 veces el volumen de la columna, para eliminar los componentes no peptídicos. Los componentes adsorbidos sobre la columna se eluyeron haciendo pasar una disolución de amoníaco 2 M a través de la columna, y se recogió una fracción peptídica. El amoníaco se eliminó mediante destilación con un evaporador, y la fracción se volvió a concentrar y se secó hasta que solidificó. El producto seco se disolvió añadiendo 5 ml de agua, y las sustancias no disueltas se retiraron realizando una centrifugación (10,000 rpm, 30 minutos). Se cuantificó el péptido en la disolución con un kit de análisis (nombre comercial: kit de ensayo QuantiPro BCA, SIGMA). Como resultado, se confirmó que se habían recogido 140 mg del péptido bruto.

## 15 3) Fraccionamiento del peso molecular

20 Una columna de filtración en gel ( $\phi$  2,6 x 100 cm) cargada con Sephadex G-25 (de tipo medio, fabricado por Amersham Biosciences) se equilibró con tampón fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,0), y se aplicaron 140 mg del péptido bruto obtenido como se describió anteriormente. La elución se realizó con un caudal de 1,0 ml/min, y con detección a 280 nm, y se recogió una fracción que tenía un peso molecular de 1.000 o menor. La fracción obtenida mediante la recolección se desmineralizó y se concentró hasta un volumen de 2 ml.

## 4) Separación mediante una resina de intercambio iónico de ácidos fuertes

25 Una columna de 20 ml cargada con una resina de intercambio iónico de ácidos fuerte (nombre comercial: SP Sephadex C-25, forma H+, fabricada por Amersham Biosciences) se equilibró con agua desionizada, y se aplicaron 2,0 ml de la fracción concentrada que tenía un peso molecular de 1.000 o menor obtenida como se describió anteriormente. La columna se lavó con agua desionizada con 5 veces el volumen de la columna, y se eluyó un componente con un gradiente lineal de una disolución acuosa de cloruro de sodio de 0 a 0,256 M. El eluido se recogió mediante un recolector de fracciones en una cantidad de 2,0 ml para cada fracción. En el cromatograma resultante se detectaron seis picos principales. Estos seis picos principales recogidos fueron, específicamente, 14 ml de una fracción eluida con cloruro de sodio a una concentración de 0,026 a 0,062 M (en lo sucesivo SP [1]), 12 ml de una fracción eluida con cloruro de sodio a una concentración de 0,062 a 0,092 M (en lo sucesivo SP [2]), 8 ml de una fracción eluida con cloruro de sodio a una concentración de 0,092 a 0,113 M (en lo sucesivo SP [3]), 22 ml de una fracción eluida con cloruro de sodio a una concentración de 0,113 a 0,168 M (en lo sucesivo SP [4]), 14 ml de una fracción eluida con cloruro de sodio a una concentración de 0,20 a 0,23 M (en lo sucesivo SP [5]), y 16 ml de una fracción eluida con cloruro de sodio a una concentración de 0,256 o mayor (en lo sucesivo SP [6]), respectivamente.

## 35 5) Análisis de HPLC

Después de una desmineralización, SP [1] a SP [6] obtenidas como se describió anteriormente se sometieron a un análisis de HPLC bajo las siguientes condiciones:

Columna: Inertsil ODS-2,  $\phi$  4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m (GL Science Inc.)

40 Detección: 214 nm

Caudal: 1,0 ml/min

Condiciones de separación:

- disolvente (a): una disolución que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%

- disolvente (b): una disolución que contiene ácido trifluoroacético al 0,05% y acetonitrilo al 20%

45 Después del equilibrio de la columna con disolvente (a) al 100% se realizó la elución con un gradiente lineal, de forma que el disolvente (b) estaría al 100% en el minuto 60.

Volumen de inyección: 20  $\mu$ l

Temperatura de la columna: temperatura ambiente

Utilizando como patrones Leu-Glu-His y Leu-Glu-His-Ala preparados mediante síntesis química, el tiempo de elución de la fracción se comparó con el de estos patrones. Como resultado, la única fracción en que se detectó un pico en el mismo tiempo de elución que los patrones fue SP [5], y no se observaron más picos significativos en el mismo tiempo de elución que los patrones en otras fracciones que no fueran SP [5].

## 5 6) Análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal

Se dispensaron dos picos en SP [5] detectados en el mismo momento de elución que los patrones, y el análisis se realizó con un analizador de secuencias de aminoácidos N-terminales (sistemas de secuenciación de proteínas Procise 494 HT, Applied Biosystems). Como resultado, se confirmó que estos dos picos se correspondían con Leu-Glu-His y Leu-Glu-His-Ala.

## 10 7) Cuantificación

Un cálculo a partir de los resultados del análisis de HPLC descubrió que cuando 1 g de polvo de soja descascarillada se trataba con termolisina se generaban 30,1 µg de Leu-Glu-His y 20,1 µg de Leu-Glu-His-Ala.

Ejemplo 5 - Ensayo para la producción de colágeno en fibroblastos de la piel utilizando LEH y LEHA derivados de proteína de soja

15 Se estudió el efecto potenciador de la producción de colágeno en fibroblastos de la piel de la misma manera que en el ejemplo 2, excepto que el péptido contenido en la fracción SP [5] obtenido en el ejemplo 4 se ajustó para que tuviese una concentración de 10 µg/ml y se empleó en lugar de LEH y LEHA sintetizados. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)	Cantidad de producción de colágeno (%)
Control	0	100
SP [5]	10	177

20

Tal como se muestra en la tabla 5, se descubrió que la cantidad de producción de colágeno en los fibroblastos derivados de piel humana normal aumentó significativamente cultivando las células en una disolución de cultivo a la cual se le hubo añadido SP [5].

Ejemplo 6 - Ensayo de toxicidad utilizando LEH y LEHA derivados de proteína de soja

25 Para las células después de recoger la disolución de cultivo en el ejemplo 5 se contó el número de células viables de la misma manera que en el ejemplo 3. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)	Número de células viables (células)
Control	0	$2,2 \times 10^4$
SP [5]	10	$2,2 \times 10^4$

30 Tal como se muestra en la tabla 6, no se observó una disminución significativa en el número de células viables cultivando las células en una disolución de cultivo a la cual se le hubo añadido SP [5].

35 También se descubre un efecto potenciador de la producción de colágeno similar al que muestran los péptidos LEH y LEHA sintetizados en el caso en que se realiza un ensayo para la producción de colágeno de la misma manera que se describió anteriormente utilizando péptidos LEH y LEHA preparados a partir de proteína de soja como se describe en el ejemplo 4. Además, no se descubrió una disminución significativa en el número de células viables cuando se realiza un ensayo de toxicidad como se describió anteriormente utilizando los péptidos LEH y LEHA preparados a partir de proteína de soja.

Ejemplo 7 - Preparación de LEHA acetilada en el N-terminal

Se preparó un derivado acetilado en el N-terminal del péptido LEHA siguiendo el procedimiento de síntesis en fase sólida mediante el procedimiento de Fmoc (L.A. Carpino, G.Y. Han, J. Am. Chem. Soc., 92, 5748 (1970)). En primer lugar, el C-terminal de Fmoc-Ala-OH se unió a una resina para la síntesis en fase sólida, y después se retiró el grupo protector (Fmoc) mediante un tratamiento con piperidina. Después, esta resina se neutralizó y se lavó, y se introdujo Fmoc-His(1-Trt)-OH en el N-terminal de Ala. Luego se retiró el grupo protector (Fmoc) mediante un tratamiento con piperidina, y esta resina se neutralizó y se volvió a lavar. Después se introdujo Fmoc-Glu(OtBu)-OH en el N-terminal de His. Después se retiró el grupo protector (Fmoc) mediante un tratamiento con piperidina. Después la resina se neutralizó y se lavó, y se introdujo N-acetil-leucina en el N-terminal de Glu. Se cortó y escindió una cadena peptídica de esta resina y se realizó la desprotección escindiendo el grupo Trt de His y el grupo tBu de Glu con TFA (ácido trifluoroacético). Por último, se realizó una purificación retirando las sustancias sin reaccionar mediante HPLC preparativa, para producir LEHA cuyo N-terminal está acetilado. La pureza del producto purificado resultante fue de 96,8%.

Ejemplo 8 - Preparación de LEHA amidada en el C-terminal

Se preparó un derivado amidado en el C-terminal del péptido LEHA siguiendo el procedimiento de síntesis en fase sólida mediante el procedimiento de Fmoc (L.A. Carpino, G.Y. Han, J. Am. Chem. Soc., 92, 5748 (1970)). En primer lugar, el C-terminal de Fmoc-Ala-OH se unió a una resina de 4-metilbenzidrilamina, y después se retiró el grupo protector (Fmoc) mediante un tratamiento con piperidina. Después, esta resina se neutralizó y se lavó, y se introdujo Fmoc-His(1-Trt)-OH en el N-terminal de Ala. Luego se retiró el grupo protector (Fmoc) mediante un tratamiento con piperidina, y esta resina se neutralizó y se volvió a lavar. Después se introdujo Fmoc-Glu(OtBu)-OH en el N-terminal de His. Después se retiró el grupo protector (Fmoc) mediante un tratamiento con piperidina. Después la resina se neutralizó y se lavó, y se introdujo Fmoc-Leu-OH en el N-terminal de Glu. Se cortó y escindió una cadena peptídica de esta resina y se realizó la desprotección escindiendo el grupo Trt de His y el grupo tBu de Glu con TFA (ácido trifluoroacético). Por último, se realizó una purificación retirando las sustancias sin reaccionar mediante HPLC preparativa, para producir LEHA cuyo C-terminal está amidado. La pureza del producto purificado resultante fue de 94,0%.

Ejemplo 9 - Ensayo para la producción de colágeno en fibroblastos de la piel utilizando derivados de péptidos

Se estudió el efecto potenciador de la producción de colágeno en fibroblastos de la piel de la misma manera que en el ejemplo 2, excepto que se utilizaron LEHA acetilado en el N-terminal y LEHA amidado en el C-terminal preparados en los ejemplos 7 y 8, en lugar de LEH y LEHA sintetizados en el ejemplo de referencia 1 y en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)	Cantidad de producción de colágeno (%)
Control	0	100
LEHA acetilado en el N-terminal	10	124
LEHA amidado en el C-terminal	10	121

Tal como se muestra en la tabla 7, se descubrió que la cantidad de producción de colágeno aumentó significativamente en los fibroblastos derivados de piel humana normal cultivando las células en cada una de las disoluciones de cultivo a las cuales se les hubo añadido un derivado de péptido.

Ejemplo 10 - Ensayo de toxicidad utilizando un derivado de péptido

Para las células después de recoger la disolución de cultivo en el ejemplo 9 se contó el número de células viables de la misma manera que en el ejemplo 3. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)	Número de células viables (células)
Control	0	2,6 x 10 <sup>4</sup>
LEHA acetilado en el N-terminal	10	2,8 x 10 <sup>4</sup>
LEHA amidado en el C-terminal	10	2,6 x 10 <sup>4</sup>

Tal como se muestra en la tabla 8, no se observó una disminución significativa en el número de células viables cultivando las células en cada una de las disoluciones de cultivo a las cuales se les hubo añadido un derivado de péptido.

#### 5 Ejemplo 11 - Ensayo para la producción de ácido hialurónico en queratinocitos epidérmicos de la piel

10 Se cultivaron queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK, fabricados por KURABO INDUSTRIES LTD.) en una placa de cultivo de 48 pocillos. De modo más específico, las células se cultivaron en una placa a una densidad de 25.000 células/cm<sup>2</sup>, y se cultivaron a 37 °C durante aproximadamente 72 horas en una atmósfera de dióxido de carbono gaseoso al 5% y aire al 95%. Como disolución de cultivo se utilizó HuMedia KG-2 (fabricado por KURABO INDUSTRIES LTD.), en una cantidad de 400 µl por pocillo. La disolución de cultivo se retiró después de 72 horas de cultivo, y se añadió medio HuMedia KG-2 al cual se le había añadido LEHA sintetizado como se describió en el ejemplo 1 a una concentración de 100 ó 300 µg/ml, en una cantidad de 400 µl por pocillo. Aquí se utilizaron como control células a las cuales se les había añadido HuMedia KG-2 sin LEHA, en una cantidad de 400 µl. Después de 72 horas más de cultivo se recogió la disolución de cultivo y se cuantificó la concentración de ácido hialurónico en la disolución de cultivo recogida mediante un ensayo inmunoabsorbente de enzimas ligados (kit de determinación de ácido hialurónico; fabricado por Seikagaku Corporation). Basándose en los resultados de la cuantificación, se calculó la cantidad de ácido hialurónico en la disolución de cultivo a la cual se añadió LEHA, definiéndose la cantidad de ácido hialurónico en la disolución de cultivo control como 100%. Los resultados se muestran en la tabla 9.

20 Tabla 9

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)	Cantidad de producción de ácido hialurónico (%)
Control	0	100
LEHA	100	154
	300	193,3

25 Tal como se muestra en la tabla 9, se descubrió que la cantidad de producción de ácido hialurónico en los queratinocitos epidérmicos humanos normales aumentó significativamente cultivando las células en cada una de las disoluciones de cultivo a las cuales se les hubo añadido LEHA. De forma sorprendente, cuando se utilizó LEHA a una concentración de 300 µg/ml, se produce un efecto de potenciación extraordinariamente grande del ácido hialurónico, en el que se produce el ácido hialurónico en una cantidad que es aproximadamente 200% comparada con la que se encuentra en el control.

#### Ejemplo de referencia 2 - Preparación de LEKA

30 El péptido LEKA se preparó de la misma manera que en el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 1. Después se realizó una purificación retirando las sustancias sin reaccionar mediante HPLC preparativa, para producir LEKA.

#### Ejemplo de referencia 3 - Ensayo para la producción de colágeno en fibroblastos de la piel utilizando LEKA

35 Se estudió el efecto potenciador de la producción de colágeno en fibroblastos de la piel de la misma manera que en el ejemplo 2, excepto que se utilizó el péptido LEKA sintetizado como se describió anteriormente, en lugar de LEH y LEHA sintetizados en el ejemplo de referencia 1 y en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)	Cantidad de producción de colágeno (%)
Control	0	100
LEKA	10	112,2

5 Tal como se muestra en la tabla 10, se descubrió que la cantidad de producción de colágeno en los fibroblastos derivados de piel humana normal aumentó cultivando las células en la disolución de cultivo a la cual se le hubo añadido el péptido LEKA.

Ejemplo de referencia 4 - Ensayo de toxicidad utilizando LEKA

Para las células después de recoger la disolución de cultivo en el ejemplo de referencia 3 se contó el número de células viables de la misma manera que en el ejemplo 3. Los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)	Número de células viables (células)
Control	0	$2,9 \times 10^4$
LEKA	10	$3,6 \times 10^4$

10

Tal como se muestra en la tabla 11, no se observó una disminución en el número de células viables cultivando las células en la disolución de cultivo a la cual se le hubo añadido el péptido LEKA.

Ejemplo 12 - Preparación de LDHA

15

El péptido LDHA se sintetizó de la misma manera que en el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 1. Después se realizó una purificación retirando las sustancias sin reaccionar mediante HPLC preparativa, para producir LDHA.

Ejemplo 13 - Ensayo para la producción de colágeno en fibroblastos de la piel utilizando LDHA

20

Se estudió el efecto potenciador de la producción de colágeno en fibroblastos de la piel de la misma manera que en el ejemplo 2, excepto que se utilizó el péptido LDHA sintetizado como se describió anteriormente, en una cantidad de 1 µg/ml, en lugar de utilizar LEH y LEHA sintetizados en el ejemplo de referencia 1 y en el ejemplo 1, en una cantidad de 10 µg/ml. Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)	Cantidad de producción de colágeno (%)
Control	0	100
LDHA	1	130,5

25

Tal como se muestra en la tabla 12, se descubrió que la cantidad de producción de colágeno en los fibroblastos derivados de piel humana normal aumentó cultivando las células en la disolución de cultivo a la cual se le hubo añadido el péptido LDHA.

Ejemplo 14 - Ensayo de toxicidad utilizando LDHA

Para las células después de recoger la disolución de cultivo en el ejemplo 13 se contó el número de células viables de la misma manera que en el ejemplo 3. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)	Número de células viables (células)
Control	0	$3,1 \times 10^4$
LDHA	1	$3,3 \times 10^4$

Tal como se muestra en la tabla 13, no se observó una disminución en el número de células viables cultivando las células en la disolución de cultivo a la cual se le hubo añadido el péptido LDHA.

#### Ejemplo 15 - Preparación de LEHAF

- 5 El péptido LEHAF se sintetizó de la misma manera que en el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 1. Después se realizó una purificación retirando las sustancias sin reaccionar mediante HPLC preparativa, para producir LEHAF.

#### Ejemplo 16 - Ensayo para la producción de colágeno en fibroblastos de la piel utilizando LEHAF

- 10 Se estudió el efecto potenciador de la producción de colágeno en fibroblastos de la piel de la misma manera que en el ejemplo 2, excepto que se utilizó LEHAF sintetizado como se describió anteriormente, en una concentración de 1 ó 3 µg/ml, en lugar de utilizar LEH y LEHA sintetizados en el ejemplo de referencia 1 y en el ejemplo 1, en una cantidad de 10 µg/ml. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)	Cantidad de producción de colágeno (%)
Control	0	100
LEHAF	1	119,2
LEHAF	3	121,0

- 15 Tal como se muestra en la tabla 14, se descubrió que la cantidad de producción de colágeno en los fibroblastos derivados de piel humana normal aumentó cultivando las células en la disolución de cultivo a la cual se le hubo añadido el péptido LEHAF.

#### Ejemplo 17 - Ensayo de toxicidad utilizando LEHAF

- 20 Para las células después de recoger la disolución de cultivo en el ejemplo 16 se contó el número de células viables de la misma manera que en el ejemplo 3. Los resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)	Número de células viables (células)
Control	0	$3,0 \times 10^4$
LEHAF	1	$3,0 \times 10^4$
LEHAF	3	$3,0 \times 10^4$

Tal como se muestra en la tabla 15, no se observó una disminución significativa en el número de células viables cultivando las células en la disolución de cultivo a la cual se le hubo añadido el péptido LEHAF.

Ensayo 18 - Ensayo para el efecto antiarrugas utilizando ratones sin pelo

5 Se ensayó el efecto preventivo contra la generación de arrugas mediante luz ultravioleta utilizando ratones sin pelo mediante un ensayo de aplicación del péptido. En otras palabras, se separan ratones sin pelo macho de 5 semanas de vida en 3 grupos (8 ratones/grupo) y los ratones se irradian con luz ultravioleta UVB tres veces semanales durante un periodo de tres semanas (a una densidad de 90 mJ/cm<sup>2</sup> la primera semana, de 120 mJ/cm<sup>2</sup> la segunda semana, y de 150 mJ/cm<sup>2</sup> la tercera semana). Se aplican 50 microlitros de disolución de ensayo que contenía cada péptido de ensayo o similar en la espalda de los ratones sin pelo en cada grupo tres veces diarias, durante las tres semanas. Después de 24 días desde la primera irradiación con luz ultravioleta se puntúan las arrugas de modo visual en siete grados (tabla 16) para evaluar el efecto preventivo contra la generación de arrugas. Basándose en este ensayo para el efecto antiarrugas, se descubrió un gran efecto preventivo contra la generación de arrugas en el grupo al cual se le aplicó la disolución de ensayo que contenía el péptido de la presente invención.

10 Tabla 16: Puntuación para la observación visual de arrugas, haciendo referencia a la puntuación de arrugas que aparece en *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 7, 153-158, 1990

0,0	No se observan estrías en la piel notables en la piel de la espalda
0,5	Se observan estrías en la piel notables en parte de la piel de la espalda
1,0	Se observan estrías en la piel notables por toda la piel de la espalda
1,5	Con respecto a las estrías en la piel que están por toda la piel de la espalda, las estrías en la piel transversales son más profundas que las estrías en la piel longitudinales
2,0	Con respecto a las estrías en la piel que están por toda la piel de la espalda, las estrías en la piel transversales son aún más profundas que las estrías en la piel longitudinales
2,5	Se observan arrugas por toda la piel de la espalda
3,0	Se observan arrugas profundas por toda la piel de la espalda

TEXTO LIBRE DEL LISTADO DE SECUENCIAS

15 SEQ ID NO:1 en el listado de secuencias es un péptido de la presente invención.  
 SEQ ID NO:2 en el listado de secuencias es un ADN que codifica un péptido LEHA.  
 SEQ ID NO:3 en el listado de secuencias es un ADN que codifica un péptido LEHA.  
 SEQ ID NO:4 en el listado de secuencias es un ADN que codifica un péptido LEHA.  
 SEQ ID NO:5 en el listado de secuencias es un ADN que codifica un péptido LEHA.

20 SEQ ID NO:18 en el listado de secuencias es un péptido de la presente invención.  
 SEQ ID NO:19 en el listado de secuencias es un péptido de la presente invención.  
 SEQ ID NO:20 en el listado de secuencias es un péptido de la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ROHTO PHARMACEUTICAL CO., LTD.
- <120> Nuevo péptido
- <130> 06-009-PCTEP
- <150> documento JP 2005-081899
- 5 <151> 22-03-2005
- <150> documento JP 2005-308356
- <151> 24-10-2005
- <160> 20
- <170> Patentin version 3.3
- 10 <210> 1
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 15 <223> el péptido de la presente invención
- Leu Glu His Ala**  
**I**
- <400> 1
- <210> 2
- <211> 12
- <212> ADN
- 20 <213> Artificial
- <220>
- <223> ADN que codifica el péptido LEHA
- <400> 2
- ttggaacatg cg 12
- 25 <210> 3
- <211> 12
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 30 <223> ADN que codifica el péptido LEHA
- <400> 3
- ttggaacatg ca 12

- <210> 4  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> ADN que codifica el péptido LEHA  
 <400> 4  
                   cttgaacacg cg 12
- 10 <210> 5  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ADN que codifica el péptido LEHA
- 15 <400> 5  
                   ctggagcacg ca 12
- 20 <210> 6  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Daucus carota*  
 <400> 6
- Leu Pro Ser Arg Asp Leu Glu His Ala Ser Ser Tyr Thr Pro**  
                   1                  5                  10
- 25 <210> 7  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Lycopersicon esculentum*  
 <400> 7
- Ile Phe Gly Ser Pro Leu Glu His Ala Arg Gln Leu Trp Pro**  
                   1                  5                  10
- 30 <210> 8  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Solanum tuberosum*

<400> 8

Val Val Arg Cys Cys Leu Glu His Ala Ala Ser Val Ala Lys  
 1 5 10

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

5 <213> *Oryza sativa*

<400> 9

Val Val Arg Cys Cys Leu Glu His Ala Ala Ser Val Ala Lys  
 1 5 10

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

10 <213> *Glycine max*

<400> 10

Phe Ala Pro Glu Phe Leu Glu His Ala Phe Val Val Asp Arg  
 1 5 10

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

15 <213> *Phaseolus vulgaris*

<400> 11

Glu Val Glu Val Gln Leu Glu His Ala Leu Ser Met Gln Glu  
 1 5 10

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

20 <213> *Manihot esculenta*

<400> 12

Pro Gln Val Glu Ile Leu Glu His Ala Ala Leu Gly Val Phe  
 1 5 10

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> *Prunus persica*

<400> 13

Thr Gly Ser Trp Thr Leu Glu His Ala Lys Leu Lys Ala Arg  
 1 5 10

<210> 14

5 <211> 14

<212> PRT

<213> *Fragaria x ananassa*

<400> 14

Glu Ile Ala Asn Ala Leu Glu His Ala Gly His Arg Phe Leu  
 1 5 10

<210> 15

10 <211> 14

<212> PRT

<213> *Strongylocentrotus purpuratus*

<400> 15

Val Ala Ile Asn Gly Leu Glu His Ala His Trp Trp Glu Gln  
 1 5 10

<210> 16

15 <211> 14

<212> PRT

<213> *Lethenteron japonicum*

<400> 16

Ser Gln Leu Leu Arg Leu Glu His Ala Phe Glu Lys Asn His  
 1 5 10

<210> 17

20 <211> 14

<212> PRT

<213> *Mytilus galloprovincialis*

<400> 17

**Asp Ala Arg Ser Leu Leu Glu His Ala Glu Arg Ala Arg Lys**  
**1 5 10**

- <210> 18
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 5 <220>
- <223> el péptido de la presente invención
- <400> 18

**Leu Glu Lys Ala**  
**1**

- <210> 19
- <211> 4
- 10 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> el péptido de la presente invención
- <400> 19

**Leu Asp His Ala**  
**1**

- 15 <210> 20
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 20 <223> el péptido de la presente invención
- <400> 20

**Leu Glu His Ala Phe**  
**1 5**

**REIVINDICACIONES**

1.- Un péptido que se representa mediante la fórmula:

Leu-Glu-His-Ala (SEQ ID NO:1)

o su derivado, o sus sales,

5 en el que el derivado puede obtenerse mediante acetilación, palmitoilación, miristilación, amidación, acrilación, dansilación, biotilación, fosforilación, succinilación, formación de anilidas, benciloxycarbonilación, formilación, nitración, sulfonación, formación de aldehídos, ciclación, glicosilación, monometilación, dimetilación, trimetilación, guanidilación, amidinación, maleilación, trifluoroacetilación, carbamilación, trinitrofenilación, nitrotroponilación o acetoacetilación del péptido.

2.- Un péptido que se representa mediante la fórmula:

10 Leu-Asp-His-Ala (SEQ ID NO:19)

o su derivado, o sus sales,

15 en el que el derivado puede obtenerse mediante acetilación, palmitoilación, miristilación, amidación, acrilación, dansilación, biotilación, fosforilación, succinilación, formación de anilidas, benciloxycarbonilación, formilación, nitración, sulfonación, formación de aldehídos, ciclación, glicosilación, monometilación, dimetilación, trimetilación, guanidilación, amidinación, maleilación, trifluoroacetilación, carbamilación, trinitrofenilación, nitrotroponilación o acetoacetilación del péptido.

3.- Un péptido que se representa mediante la fórmula:

Leu-Glu-His-Ala-Phe (SEQ ID NO:20)

o su derivado, o sus sales,

20 en el que el derivado puede obtenerse mediante acetilación, palmitoilación, miristilación, amidación, acrilación, dansilación, biotilación, fosforilación, succinilación, formación de anilidas, benciloxycarbonilación, formilación, nitración, sulfonación, formación de aldehídos, ciclación, glicosilación, monometilación, dimetilación, trimetilación, guanidilación, amidinación, maleilación, trifluoroacetilación, carbamilación, trinitrofenilación, nitrotroponilación o acetoacetilación del péptido.

25 4.- Una composición que contiene el péptido o su derivado, o una de sus sales, según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5.- La composición según la reivindicación 4, en la que la composición puede utilizarse para potenciar la producción de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en colágeno y ácido hialurónico en una célula.

30 6.- La composición según la reivindicación 4 ó 5, en la que la composición puede utilizarse como agente para la aplicación externa.