

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 723**

51 Int. Cl.:

C07K 14/485 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2007 E 07833206 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 2078035**

54 Título: **Péptidos que tienen actividades del factor de crecimiento epidérmico y sus usos**

30 Prioridad:

10.10.2006 KR 20060098368

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

23.12.2013

73 Titular/es:

**CAREGEN CO., LTD. (100.0%)
690-3 GEUMJEONG-DONG
GUNPO-SI GYEONGGI-DO 435-862, KR**

72 Inventor/es:

**CHUNG, YONG-JI;
KIM, YOUNG DEUG;
KIM, EUN MI;
CHOI, JUN YOUNG y
SONG, SANG SU**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 435 723 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

Péptidos que tienen actividades del factor de crecimiento epidérmico y sus usos

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a péptidos que tienen las actividades del factor de crecimiento epidérmico y sus usos.

Descripción de la técnica relacionada

10 El factor de crecimiento epidérmico constituido por 53 residuos de aminoácidos fue aislado por primera vez por el Dr. Stanley Cohen de la glándula submandibular de ratón y se dedujo que aceleraba la apertura de los párpados en ratones prematuros (Cohen, S. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1555-1562). El Dr. Stanly Cohen recibió el premio Nobel de medicina en 1986 por los estudios sobre el EGF. El EGF, un polipéptido que tiene 3 puentes disulfuro (Savage, C.t., Jr. et al., (1973) J. Biol. Chem. 248, 7669-7672; Savage, C.R., Jr. et al., (1972) J. Biol. Chem. 247, 7612-7621), desencadena una cascada de transducción de la señal a través del receptor del EGF para inducir el crecimiento y la división de células de mamífero, en particular de células de epitelio y de piel, de modo que estimula el crecimiento de las células epiteliales (Sporn, M. B. et al., (1985) Nature (London) 313, 745-747; Sporn M.B. et al., (1980) N. Engl. J. Med. 303, 878-880). Además, se ha notificado que el EGF desempeña un papel central en la regulación molecular de la cicatrización de heridas ((Buckley, A. et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 7340-7344).

20 El EGF está presente a niveles elevados en varios fluidos corporales tales como saliva, orina, leche, lágrimas y sangre. Tras sufrir una herida, el EGF suministrado en lugares dañados a través de la corriente sanguínea contribuye a la curación de las heridas sin dejar cicatriz. Además, el EGF junto con la FSH (hormona estimulante del folículo) está implicado en la maduración del huevo en el útero y el EGF es responsable de la regeneración de la córnea que es responsable de la degeneración debido a la ausencia de vasos sanguíneos. Además, el EGF desempeña un papel muy importante en la regeneración de la piel a través de las siguientes diversas acciones: estimular la proliferación de las células epiteliales y endoteliales; estimular la proliferación de fibroblastos para sintetizar colágeno en la dermis; estimular la angiogénesis en lugares dañados; inducir la secreción de factores implicados en la regeneración; y estimular la biosíntesis de la fibronectina para formar redes de tejidos cutáneos.

30 El cuerpo humano responde a la aparición de heridas y suministra EGF a tejidos dañados para la curación. No obstante, cuando el suministro de EGF no es suficiente en el cuerpo se deberá proporcionar EGF exógeno para volver a los estados normales y sanos. A este respecto, se considera que el EGF tiene una gran cantidad de aplicaciones. Por ejemplo, el EGF puede aplicarse a la úlcera del pie diabético, a quemaduras, heridas, lesiones corneales, laparotomía, exfoliación cosmética y envejecimiento cutáneo. Además de las potencias proliferativas de las células epiteliales, se ha sugerido que el hEGF es útil en el tratamiento de la úlcera gástrica evitando la secreción de ácido gástrico (ory, H., (1985) J. Cell Sci. Suppl. 3, 11-17).

35 EN 1975, el Dr. Starkey purificó y caracterizó el hEGF en orina; después se han realizado muchos esfuerzos para preparar el hEGF con un rendimiento y cantidad mucho mayores (Starkey, R. H. et al., (1975) Science 189, 800; Cohen. S. et al., (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1317). Varios laboratorios han notificado el éxito de la clonación del gen del hEGF (Smith, J. et al., (1982) Nuclei Acids Res. 10, 4467-4482; Urdea, M. S. et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7461-7465; Oka, T, et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7212-7216). No obstante, el hEGF preparado mediante tecnologías de recombinación genética todavía no se ha producido en grandes cantidades ni con actividades elevadas útiles en los campos de la industria.

40 La mayoría de los factores de crecimiento polipeptídicos presentes en sangre y tejidos tienen una semivida *in vivo* muy corta, de varios minutos. Probablemente, el EGF muestra poca estabilidad estructural. Además, dado que el EGF es biológicamente inestable y fisicoquímicamente heterogéneo, es probable que muestre menores eficacias del tratamiento. Su penetración en la piel es muy baja.

- 45 De acuerdo con lo anterior, sigue existiendo la necesidad de desarrollar nuevas sustancias que tengan mejor estabilidad y mejor potencia de penetración en la piel, además de poseer actividades inherentes al EGF.

Descripción detallada de la presente invención

50 Para desarrollar péptidos que tienen acciones idénticas al factor de crecimiento epidérmico humano natural así como una estabilidad y penetración en la piel más potenciadas que el EGF natural, los presentes inventores han preparado y seleccionado una multitud de péptidos humanos derivados del EGF. Como resultado, los inventores han desarrollado finalmente péptidos con las excelentes características descritas anteriormente.

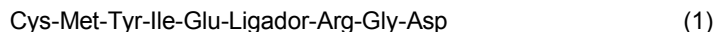
De acuerdo con esto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un péptido que tenga la actividad del factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar una composición para prevenir o tratar un trastorno o afección

en el que el factor de crecimiento epidérmico es eficaz.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción detallada siguiente, junto con las reivindicaciones y figuras adjuntas.

5 En un aspecto de la presente invención se proporciona un péptido que tiene la actividad del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la siguiente fórmula 1:



en la que el ligador está representado por $\text{Xaa}_{(n)}$, Xaa es cualquier aminoácido y n es un número entero de 2-18.

10 También se describe una composición para prevenir o tratar un trastorno o afección en el que el factor de crecimiento epidérmico es eficaz, que comprende como principio activo el presente péptido que tiene la actividad del factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Para desarrollar péptidos que tienen acciones idénticas al factor de crecimiento epidérmico humano natural así como una estabilidad y penetración en la piel más potenciadas que el EGF natural, los presentes inventores han preparado y seleccionado una multitud de péptidos humanos derivados del EGF. Como resultado, los inventores han descubierto finalmente péptidos con las excelentes características descritas anteriormente.

15 Las estrategias de desarrollo de la presente invención son las siguientes: En primer lugar, los presentes péptidos están diseñados para comprender dos regiones, una secuencia derivada del EGF (es decir, la región activa del EGF) y una región de unión celular. La región activa del EGF se selecciona de la secuencia de aminoácidos del EGF natural. Para potenciar las actividades del EGF de los presentes péptidos, la región de unión celular se selecciona de fibronectina, una de las proteínas de la matriz extracelular.

20 La región activa del EGF seleccionada al final comprende la secuencia de aminoácidos "Cys-Met-Tyr-Ile-Glu" y la región de unión celular seleccionada al final comprende la secuencia de aminoácidos "Arg-Gly-Asp". Además, los presentes inventores han descubierto que se prefiere la unión indirecta de dos regiones mediante ligadores a la unión directa.

25 De acuerdo con las estrategias de desarrollo, se preparan péptidos que imitan al EGF representados por la fórmula 1.

30 El ligador para conectar la región activa del EGF y la región de unión celular comprende cualquier ligador disponible para un experto en la técnica. Preferentemente, el ligador comprende una pluralidad de aminoácidos. Los detalles de los ligadores peptídicos se encuentran en Huston, et al., *Methods in Enzymology*, 203:46-88(1991) y Whitlow, et al., *Protein Eng.*, 6:989(1993). En la presente invención, un ligador adecuado comprende aminoácidos que tienen cadenas laterales sin carga, preferentemente Gly o Gly o Ser. Preferentemente, el ligador tiene una longitud de 2 - 18 residuos de aminoácidos. Más preferentemente, el ligador comprende 12 - 10 residuos de Gly. El ligador compuesto por residuos de aminoácidos, en particular residuos de Gly, contribuye a la estabilidad de los presentes péptidos.

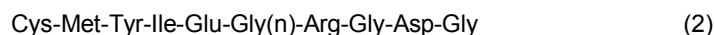
35 Aunque los péptidos de la presente invención *per se* tienen una estabilidad más alta que la del EGF natural, su modificación permite tener una estabilidad mucho más alta. Preferentemente, los péptidos de la presente invención tienen un grupo de protección en el extremo N o el extremo C seleccionado del grupo constituido por grupo acetilo, grupo fluorenilmetoxicarbonilo, grupo formilo, grupo palmitoilo, grupo miristilo, grupo estearilo o polietilenglicol (PEG). Los grupos de protección son también responsables de la estabilidad de los presentes péptidos.

40 Como alternativa, el extremo C del péptido representado por la fórmula 1 se modifica para tener grupos amino, lo que potencia la estabilidad del péptido.

El término usado en el presente documento "estabilidad" se refiere a estabilidad *in vivo* y también a estabilidad durante el almacenamiento (p. ej., estabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente). El grupo de protección descrito anteriormente protege a los péptidos del ataque de proteasas *in vivo*.

45 De acuerdo con una realización preferida, el residuo de Asp situado en el extremo C del péptido está unido adicionalmente a un residuo de Ala o Gly (más preferentemente, residuo de Gly) como grupo de protección.

De acuerdo con la realización más preferida, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos representada por la siguiente fórmula 2:



en la que n es un número entero de 2 a 8.

50 La secuencia de aminoácidos del péptido de ejemplo se expone en la SEC ID N°: 1.

El péptido de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos representada por la Fórmula 1.

Preferentemente, el péptido está constituido esencialmente por la secuencia de aminoácidos representada por la fórmula 1. Lo más preferentemente, el péptido está constituido por la secuencia de aminoácidos representada por la fórmula 1.

5 El término usado en el presente documento "péptido" se refiere a una molécula formada mediante la unión de los residuos de aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

Los péptidos de la invención se pueden preparar mediante procesos de síntesis química convencionales conocidos para el experto en la técnica, en particular técnicas de síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)).

10 El principio subyacente a la estructura de los presentes péptidos es la unión de secuencias derivadas del EGF y secuencias de unión celular derivadas de fibronectina. Por tanto, será obvio para los expertos en la técnica que la fórmula 1 se describe para indicar los péptidos de la presente invención de un modo más conveniente y las modificaciones o variantes de la fórmula 1 que entran dentro del alcance de la invención están abarcadas por el alcance de la presente invención. Además, los péptidos que comprenden residuos de aminoácidos adicionales (p. ej., 1-2 residuos de aminoácidos) en la secuencia derivada del EGF y/o la secuencia de unión celular derivada de fibronectina entran dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, cuando el extremo C de la secuencia de unión celular Arg-Gly-Asp está modificado para que contenga además un residuo de Ser, el péptido entra dentro del alcance de la presente invención.

20 Los presentes péptidos poseen actividades de EGF humano natural y muestran mayor estabilidad a los factores fisicoquímicos tales como ácidos y bases. Los péptidos de la presente invención que tienen una estabilidad significativa durante un almacenamiento prolongado se pueden aplicar de forma ventajosa a productos que requieren almacenamiento prolongado, tales como fármacos, similares a fármacos, cosméticos y productos de limpieza o cuidados dentales/bucales.

25 También se describe una composición para prevenir o tratar un trastorno o afección en el que el factor de crecimiento epidérmico es eficaz, que comprende como principio activo el presente péptido que tiene la actividad del factor de crecimiento epidérmico (EGF).

También se describe un procedimiento para prevenir o tratar un trastorno o afección en el que el factor de crecimiento epidérmico es eficaz, que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende el péptido de la presente invención.

30 En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un uso del péptido de la presente invención para fabricar un medicamento para prevenir o tratar un trastorno o afección en el que el factor de crecimiento epidérmico es eficaz seleccionado de cicatrización de heridas, tratamiento de enfermedades periodontales y mejora de afecciones cutáneas.

35 Dado que la presente composición comprende el péptido de la presente invención como principios activos descritos en lo que antecede, se omiten las descripciones comunes entre ellos con el fin de evitar redundancias innecesarias que conduzcan a la complejidad de la presente memoria descriptiva.

40 El péptido de la presente invención como principio activo contenido en la presente composición tiene actividades del EGF y muestra funciones y eficacias *in vivo* idénticas o similares al EGF natural. El término usado en el presente documento "actividades del EGF" hace referencia a todas y cada una de las actividades del EGF natural conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, incluida la estimulación de la proliferación y división celular. Dado que el péptido de la presente invención está preparado para imitar las acciones del EGF natural, puede ejercer todas las actividades *in vivo* del EGF natural.

45 Dado que el péptido de la presente invención exhibe funciones y acciones idénticas o similares al EGF natural y muestra actividades biológicas mayores que el EGF natural, puede aplicarse de forma ventajosa para prevenir o tratar trastornos o afecciones en los que el EGF es eficaz. La expresión usada en el presente documento "trastornos o afecciones en los que el EGF es eficaz" hace referencia a trastornos o afecciones que se pueden prevenir o tratar con EGF natural.

50 Cuando la presente composición se aplica al tratamiento de enfermedades periodontales, se puede formular para proporcionar pastas de dientes o composiciones para la limpieza y el cuidado de los dientes y de la boca. La expresión "composición para tratar enfermedades periodontales" se puede usar de forma intercambiable en el presente documento con otras expresiones, "composición para el cuidado dental y bucal" y "composición para la limpieza dental y bucal". El péptido de la presente invención estimula las actividades biológicas de las células epiteliales presentes en los tejidos de la encía y cura las heridas en las encías para regenerar los tejidos de las encías dañados, de modo que trata o previene enfermedades periodontales.

55 Más preferentemente, la composición de la presente invención induce la mejora de afecciones cutáneas. En particular, los péptidos usados como principios activos en la presente composición muestran una excelente penetración en la piel por su bajo peso molecular. De acuerdo con lo anterior, cuando la presente composición se aplica tópicamente en la piel, se hace evidente que las afecciones cutáneas mejoran considerablemente. Todavía

más preferentemente, la mejora de la afección cutánea mediante la presente composición incluye la mejora de las arrugas o de la elasticidad de la piel, la prevención del envejecimiento de la piel, la prevención de la pérdida de cabello, la estimulación del crecimiento del cabello, la mejora de la humedad de la piel, la eliminación de manchas oscuras, el tratamiento del acné, la cicatrización de heridas y la regeneración de la piel, más preferentemente, la mejora de las arrugas o de la elasticidad de la piel y la prevención del envejecimiento de la piel, la cicatrización de heridas y la regeneración de la piel.

Por ejemplo, los péptidos usados como principios activos en la presente composición pueden estimular la proliferación de queratinocitos, inducir la biosíntesis de procolágeno y fibronectina e inducir la generación autocrina del EGF natural (una de las sustancias de crecimiento de la piel) para regenerar la capa de queratinocitos, la epidermis y la dermis, de modo que tiene como resultado mejoras en las arrugas, la elasticidad de la piel y la humedad de la piel, la prevención del envejecimiento de la piel, la cicatrización de heridas y la regeneración de la piel.

La presente composición puede prepararse como composición farmacéutica o cosmética.

Se describe una composición farmacéutica que comprende (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de los péptidos de la presente invención; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La expresión usada en el presente documento "cantidad farmacéuticamente eficaz" hace referencia a una cantidad suficiente para mostrar y conseguir eficaces y actividades del péptido de la presente invención.

El vehículo farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente invención que normalmente se usa en formulaciones farmacéuticas incluye, entre otros, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, caucho, fosfato potásico, alginato, gelatina, silicato potásico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede además incluir un lubricante, un humectante, un edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión y un conservante. Los detalles de vehículos y formulaciones adecuados farmacéuticamente aceptables se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).

La composición farmacéutica se puede administrar por vía oral o parenteral, y, preferentemente, se puede administrar por vía parenteral, por ejemplo administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, transdérmica o local.

Una cantidad de dosis adecuada de la composición farmacéutica puede variar en función de los procedimientos de formulación farmacéutica, los procedimientos de administración, la edad del paciente, el peso corporal, el sexo, el estado patógeno, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la sensibilidad para una composición farmacéutica usada. Preferentemente, la composición farmacéutica se puede administrar con una dosis diaria de 0,0001-100 µg.

De acuerdo con las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, la composición farmacéutica se puede formular con un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable como se ha descrito con anterioridad, proporcionado en último término varias formas de una forma de dosificación unitaria y de múltiples dosis. Ejemplos no limitantes de la formulación incluyen, entre otros, una solución, una suspensión o una emulsión en aceite o medio acuoso, un extracto, un elixir, un polvo, un gránulo, un comprimido y una cápsula, y puede comprender además un agente de dispersión o un estabilizante.

Asimismo, se describe una composición cosmética que comprende (a) una cantidad cosméticamente eficaz del péptido de la presente invención; y (b) un vehículo cosméticamente aceptable.

La expresión usada en el presente documento "cantidad cosméticamente eficaz" hace referencia a una cantidad suficiente para conseguir eficaces sobre las mejoras en las afecciones cutáneas descritas anteriormente en el presente documento.

Las composiciones cosméticas pueden formularse en una amplia variedad de formas incluyendo, por ejemplo, una solución, una suspensión, una emulsión, una pasta, una pomada, un gel, una crema, una loción, un polvo, un jabón, un limpiador que contiene tensioactivo, un aceite, un fondo en polvo, un fondo en emulsión, un fondo en cera y un aerosol. Específicamente, las composiciones cosméticas de la presente invención se pueden formular en forma de suavizante cutáneo, líquido nutritivo, crema nutritiva, crema para masajes, esencia, crema para ojos, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, en envase, aerosol o polvo.

Cuando la composición cosmética está en forma de pasta, crema o gel, puede comprender grasas animales y vegetales, ceras, parafinas, almidón, goma de tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, sílice, talco, óxido de cinc, o mezclas de estas sustancias.

En la formulación de polvo o aerosol, puede comprender lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato cálcico, polvo de poliamida y mezclas de estas sustancias. El aerosol puede comprender, adicionalmente, los propulsores habituales, por ejemplo clorofluorohidrocarburos, propano/butano o dimetiléter.

La formulación de solución y emulsión puede comprender disolvente, solubilizante y emulsionante, por ejemplo agua, etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilglicol, aceites, ésteres grasos de glicerol, polietilenglicol y ésteres de ácido graso de sorbitano.

5 La formulación de suspensión puede comprender diluyentes líquidos, por ejemplo agua, etanol o propilenglicol, agentes de suspensión, por ejemplo alcoholes de isoestearilo etoxilado, polioxietilensorbitol y ésteres de polioxietilensorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar y goma de tragacanto, o mezclas de estas sustancias.

10 La formulación de composiciones de limpieza con tensioactivo puede comprender sulfato de alcohol alifático, éter sulfato de alcohol alifático, sulfosuccinato monoéster, isocianato, derivados de imidazolio, metiltaurato, sarcocinato, amida de ácido graso étersulfato, alquilamidobetaína, alcohol alifático, glicérido de ácido graso, dietanolamida de ácido graso, aceite vegetal, derivados de lanolina, éster de glicerol de ácido graso etoxilado o mezclas de estos ingredientes.

15 Además, las composiciones cosméticas pueden contener adyuvantes además de péptidos como principios activos y excipientes. Ejemplos no limitantes de adyuvantes incluyen conservantes, antioxidantes, estabilizantes, solubilizantes, vitaminas, colorantes, agentes para mejorar el olor o mezclas de estas sustancias.

A continuación se resumirán las características y ventajas de la presente invención:

- (i) los péptidos similares al EGF de la presente invención poseen funciones o actividades idénticas al EGF humano natural;
- (ii) los péptidos de la presente invención pueden estimular la generación de EGF autocrino en las células;
- 20 (iii) los péptidos de la presente invención tienen una estabilidad y una potencia de penetración en la piel mucho más altas que el EGF natural;
- (iv) por tanto, la composición que comprende el péptido exhibe excelentes eficacias de tratamiento y prevención en enfermedades o afecciones que demandan actividades del EGF; y
- 25 (v) el péptido de la presente invención puede aplicarse ventajosamente a composiciones farmacéuticas, productos similares a fármacos y cosméticos.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 representa resultados del análisis por HPLC (cromatografía de líquidos de alto rendimiento) del tridecapéptido preparado en el Ejemplo.

30 La Fig. 2 representa los resultados del análisis de estabilidad del tridecapéptido de la presente invención. "Péptido" y "rhEGF" indican el tridecapéptido y EGF recombinante, respectivamente.

La Fig. 3 es una imagen de microscopio que demuestra los efectos del tridecapéptido para estimular el crecimiento de los queratinocitos humanos. El panel A representa el control no tratado y el panel B el grupo de tratamiento.

35 La Fig. 4 es un gráfico que demuestra que el tridecapéptido estimula el crecimiento de los queratinocitos humanos de un modo dependiente de la dosis.

La Fig. 5 es una imagen de microscopio que demuestra la potenciación de la adherencia de los queratinocitos humanos por el tridecapéptido.

40 La Fig. 6 es una imagen de microscopio que aborda el incremento de la motilidad de las células NIH 3T3 tratadas con el tridecapéptido.

La Fig. 7 representa que las células cultivadas con el tridecapéptido generan EGF autocrino a un nivel más alto.

La Fig. 8 representa un grafico para mostrar el incremento de los niveles de ácido hialurónico cuando se cultivan las células con el tridecapéptido.

45 La Fig. 9 es una imagen de microscopio que muestra el cambio en el grosor de la piel de ratones Balb C a los que se ha administrado cosméticos que contienen el tridecapéptido.

La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle mediante ejemplos. Será obvio para los expertos en la técnica que con estos ejemplos se pretende ser más concretamente ilustrativo y el alcance de la presente invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas no está limitado a o por los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de NH₂-Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-Gly(n)-Arg-Gly-Asp-Gly-OH

En un reactor se introdujeron 700 mg de resina de cloruro de clorotritilo (resina CTL, Nova Biochem Cat No. 01-64-0021) y se añadieron 10 ml de cloruro de metileno (CM). seguidos de agitación durante 3 minutos. Después de la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF) a la resultante y después se llevó a cabo agitación durante 3 minutos, tras lo cual se eliminó el disolvente. Se añadieron 10 ml de la solución de diclorometano al reactor y, después, al reactor se añadieron 200 mmol de Fmoc-Gly-OH Tyr(tBu)-OH (Nova Biochem, USA) y 400 mmol de DIEA (N,N'-diisopropiletilamina), tras lo cual la mezcla se disolvió mediante agitación y a continuación se realizó la reacción con agitación durante 1 hora. Después de lavar, metanol y DIEA (2:1) disueltos en MC se hicieron reaccionar con la resina durante 10 minutos y, después, el resultante se lavó usando exceso de DCM/DMF (1:1). Después de retirar la solución se añadieron 10 ml de DMF al resultante y se procedió a agitar durante 3 minutos, seguido por la eliminación del disolvente. Al reactor se añadieron 10 ml de una solución de desprotección (20% de piperidina/DMF) y se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de la eliminación de la solución. Después de añadir el mismo volumen de la solución de desprotección se realizó la reacción durante 10 minutos y se retiró la solución, seguido de lavado secuencial con DMF, MC y DMF, para dar resinas de Gly-CTL. A un nuevo reactor se añadieron 10 ml de solución de DMF y después se añadieron 200 mmol de Fmoc-Asp(tBu)-OH (Nova Biochem, USA), 200 mmol de HoBt y 200 mmol de Bop, seguido de agitación para solubilizar. Al reactor se añadieron 400 mmol de DIEA y se agitó para disolver todo el contenido de sólidos. La solución de aminoácidos disueltos se introdujo en el reactor que contenía la resina desprotegida y la reacción se llevó a cabo con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la eliminación de la solución de reacción, el resultante se agitó tres veces con una solución de DMF para eliminar los residuos sin reaccionar. La resina que había reaccionado se recogió para evaluar la extensión de las reacciones mediante ensayo con ninhidrina. Usando la solución de desprotección, la desprotección se realizó dos veces del mismo modo que se ha descrito anteriormente, para dar Asp(tBu)-Gly-resina CTL. Después de lavar con DMF y MC, se llevó a cabo un ensayo de ninhidrina y se realizaron uniones secuenciales de aminoácidos como se ha descrito anteriormente. En base a la secuencia de aminoácidos diseñada por los presentes inventores, se fijaron secuencialmente a las resinas Fmoc-Gly, Fmoc-Arg(pbf), Fmoc-Gly(n veces), Fmoc-Glu(tBu), Fmoc-Ile, Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Met y Fmoc-Cys(trt). El número de un residuo de Gly colocado en la porción media de los péptidos se varió llevando a cabo las reacciones 2-8 veces con Fmoc-Gly, generando 7 tipos de resinas de peptidilo.

La resina de peptidilo preparada se lavó tres veces con DMF, MC y metanol, respectivamente, y se secó en atmósfera de nitrógeno, tras lo cual se secó a vacío en P₂O₅. Las resinas secas se hicieron reaccionar con 30 ml de una solución saliente [que contenía 81,5% de ácido trifluoroacético (TFA), 5% de agua destilada, 5% de tioanisol, 5% de fenol, 2,5% de EDT y 1% de TIS] durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación intermitente. La resina se filtró y se lavó con un pequeño volumen de solución de TFA, tras lo cual el filtrado se combinó con las aguas madre. Tras destilar a presión reducida para reducir el volumen total a la mitad, la precipitación se indujo usando 50 ml de éter frío y los precipitados formados se recogieron mediante centrifugación, seguido de lavado dos veces con éter frío. Después de retirar las aguas madre, el resultante se secó en atmósfera de nitrógeno dando 7 tipos de péptidos no purificados, NH₂-Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-Gly(n)-Arg-Gly-Asp-Gly-OH. De ellos, el péptido constituido por NH₂-Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp-Gly-OH (en lo sucesivo en el presente documento denominado tridecapéptido) se produjo en la cantidad de 0,82 mg y su peso molecular se midió en 1.272,0 usando un analizador de peso molecular (Perseptive Pioneer DE-STR ABI, EE.UU.).

La Fig. 1 representa los resultados del análisis por HPLC de péptidos sintetizados. Para el análisis de HPLC se usó una bomba Gilson (Korea Analytical Instruments Co., Ltd., Corea) y una columna C₁₈ de 4,6 x 250 mm. El sistema de disolventes contenía disolvente A (0,1% de TFA) y disolvente B (0,1% de MeCN). El tridecapéptido sintetizado de la presente invención se analizó por su tiempo de retención de aproximadamente 20 minutos, abordando que el péptido se obtuvo con una pureza adecuada. Los siguientes experimentos se realizaron usando el tridecapéptido.

Ejemplo 2: Evaluación de la estabilidad del tridecapéptido

Para evaluar la estabilidad del tridecapéptido sintetizado y purificado del Ejemplo 1, el tridecapéptido se disolvió en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) hasta una concentración de 10 µg /ml. La proteína EGF recombinante (Sigma-Aldrich) producida en *E. coli* se preparó como control en el mismo tampón hasta una concentración de 1 µg /ml. Las soluciones preparadas se introdujeron en viales de vidrio y se mantuvieron en reposo a 37 °C. Después, las soluciones se recogieron los días 0, 1, 10, 25, 50, 75 y 100 y se sometieron a ensayo MTT (Scudiero, D. A., et al. Cancer Res. 48:4827-4833(1988)) usando células NIH-3T3 (Korean Cell Line Bank) para determinar las actividades residuales del péptido y el EGF (Fig. 2). Los resultados se dieron como valores relativos con respecto a la actividad (100%) de la muestra tomada el día 0.

Como se representa en la Fig. 2, la actividad de la proteína EGF recombinante disminuyó bruscamente con el tiempo. Por el contrario, se mostró que la actividad del presente tridecapéptido no disminuía con el tiempo, Estos resultados nos inducen a razonar que el péptido EGF de la presente invención tiene una estabilidad significativamente mayor en comparación con la proteína EGF que tiene los residuos de aminoácidos de longitud completa.

Ejemplo 3: Preparación de nanopéptidos

5 50 mg del tridecapéptido sintetizado en el ejemplo 1 se disolvieron en 500 ml de agua destilada. La solución peptídica se mezcló con 5 g de lecitina, 0,3 ml de oleato sódico, 50 ml de etanol y una pequeña cantidad de aceites y su volumen se ajustó con agua destilada hasta 1 l. La solución resultante se sometió a un microfluidizador a presión alta para emulsionar, de modo que se proporcionan nanosomas que tenían un tamaño de 100 nm. Los nanosomas se prepararon para tener una concentración final de aproximadamente 50 ppm y se usaron como ingredientes para cosméticos.

Ejemplo de formulación 1: suavizante de la piel

10 Un suavizante de la piel que comprendía nanosomas que contenían tridecapéptido preparados en el Ejemplo 3 se formuló de acuerdo con la composición siguiente:

TABLA 1

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Tridecapéptido	0,001
1,3-butilenglicol	6,0
Glicerina	4,0
PEG 1500	1,0
Hialuronato sódico	1,0
Polisorbato 20	0,5
Etanol	8,0
Conservante, pigmento	Cantidad adecuada
Benzofenona-9	0,05
Perfume	Cantidad mínima
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de formulación 2: crema nutritiva

15 Una crema nutritiva que comprendía nanosomas que contenían tridecapéptido preparados en el Ejemplo 3 se formuló de acuerdo con la composición siguiente:

TABLA 2

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Tridecapéptido	0,001
Aceite de hierba de la pradera	3,0
Alcohol cetarílico	1,5
Ácido esteárico	1,5

(continuación)

Estearato de glicerilo	1,5
Parafina líquida	10,0
Cera	2,0
Polisorbato 60	0,6
Sesquiolato de sorbitano	2,5
Escualano	3,0
1,3-butilenglicol	3,0
Glicerina	5,0
Trietanolamina	0,5
Acetato de tocoferilo	0,5
Conservante, pigmentos	Cantidad adecuada
Perfume	Cantidad adecuada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de formulación 3: Líquido nutritivo

5 Un líquido nutritivo que comprendía nanosomas que contenían tridecapéptido preparados en el Ejemplo 3 se formuló de acuerdo con la composición siguiente:

TABLA 3

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Tridecapéptido	0,002
1,3-butilenglicol	4,0
Glicerina	4,0
Alcohol cetearílico	0,8
Estearato de glicerilo	1,0
Trietanolamina	0,13
Acetato de tocoferilo	0,3
Parafina líquida	5,0
Escualano	3,0

(continuación)

Aceite de nuez de macadamia	2,0
Polisorbato 60	1,5
Sesquiolato de sorbitán	0,5
Polímero de carboxivinilo	1,0
Conservante, pigmentos	Cantidad adecuada
Perfume	Cantidad adecuada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de formulación 4: esencia

5 Una esencia que comprendía nanosomas que contenían tridecapéptido preparados en el Ejemplo 3 se formuló de acuerdo con la composición siguiente:

TABLA 4

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Tridecapéptido	0,005
Glicerina	10,0
1,3-butilenglicol	5,0
PEG 1500	2,0
Alantoína	0,1
DL-pantenol	0,3
EDTA-2Na	0,02
Hidroxietilcelulosa	0,1
Hialuronato sódico	8,0
Polímero de carboxivinilo	0,2
Trietanolamina	0,18
Octildodeceth-16	0,4
Etanol	6,0

(continuación)

Perfume, conservante, pigmentos	Cantidad adecuada
Agua destilada	Cantidad restante
Total	100

EJEMPLO 4: Análisis de los efectos de los péptidos sobre el crecimiento de los queratinocitos HaCaT

5 Para analizar los efectos de los péptidos de la presente invención sobre la proliferación de queratinocitos, se llevó a cabo un ensayo colorimétrico con SRB (sulforrodamina V) usando queratinocitos HaCaT de acuerdo con el procedimiento de Rizzino et al (Rizzino, et al. Cancer Res., 48:4266(1988)). Se cultivaron queratinocitos HaCaT(Banco de Líneas Celulares de Corea) en matraces de 250 ml que contienen EMEM (medio esencial mínimo de Eagle, Gibco, EE.UU.) suplementado con 100% de FBS (suero bovino fetal). Los queratinocitos HaCaT cultivados se trataron con solución de tripsina al 0,25% para desprender las células del fondo de los matraces de cultivo y se centrifugaron recogiendo los sedimentos celulares. Las células se resuspendieron en EMEM sin FBS, a cada pocillo de placas de 96 pocillos se añadieron sus células del alícuota (4×10^3) y se cultivaron en CO₂ al 7% durante 24 horas a 37 °C. Después de cultivar durante 24 horas, el medio se cargó con un medio fresco que no contenía suero y las células se incubaron con EGF humano o el tridecapéptido (10 ng/ml o 1.000 ng/ml) disueltas en 10% de DMSO durante 72 horas en las mismas condiciones que se ha descrito anteriormente. Después de retirar los sobrenadantes, las células se lavaron una vez usando PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se incubaron con solución SRB (Sigma-Aldrich). Las células se lavaron con PBS y se observaron al microscopio para analizar la viabilidad celular (Fig. 3). Además, se midió la absorbancia a 590 nm para analizar la proliferación celular (Fig. 4). Se analizó la adherencia celular a las placas de cultivo usando placas de cultivo no tratadas y placas de cultivo previamente tratadas con péptido. Se sembraron queratinocitos humanos en las placas de cultivo y después se incubaron durante 24 horas, seguido de observación en un microscopio. Como se muestra en la Fig. 5, se observó que el número de células adheridas a las placas de cultivo tratadas con péptidos de la presente invención era aproximadamente tres veces mayor que el de las placas de cultivo no tratadas.

Los inventores analizaron la motilidad celular para verificar después la potencia de la proliferación celular. Las células NIH3T3 se sembraron en placas de cultivo de 60 mm y se cultivaron hasta una fluencia adecuada. La superficie inferior de las placas de cultivo se raspó usando una pipeta y se incubó con 1 µg/ml de los presentes péptidos, seguido de observación de la motilidad celular. En la Fig. 6, los paneles A y B muestran muestras de células no tratadas con péptidos y los paneles C y D, muestras de células tratadas con 1 µg /ml de péptidos. Las imágenes A y C se tomaron después de 1 día de tratamiento y las de B y D tras 3 días de tratamiento.

Para examinar los efectos autocrinos, las líneas celulares HaCaT se incubaron durante 6 días con los tridecapéptidos de la presente invención (1 µg /ml) y después se midió el nivel de EGF en cultivo usando el kit de ELISA (R&D, EE.UU.). Los inventores han encontrado que los tridecapéptidos de la invención tienen efectos autocrinos sobre el EGF significativamente más altos (Fig. 7).

Además, las líneas celulares HaCaT se incubaron durante 72 horas con 5 µmol de los presentes tridecapéptidos y el nivel de ácido hialurónico, un marcador indicador de la mejora de las arrugas en la piel, se midió usando el kit de ELISA de ácido hialurónico Echelon Biosciences Inc, USA) (Fig. 8).

Como se representa en las figuras 3, 4 y 5, el péptido de la presente invención exhibe una potencia significativamente alta sobre el crecimiento celular, la viabilidad celular y la adherencia. Además, se reveló que el péptido de la presente invención estimulaba la motilidad celular. El tratamiento con el presente péptido de los queratinocitos HaCaT también indujo un incremento considerable de los niveles intracelulares de EFG, como se muestra en la Fig. 7. El nivel de ácido hialurónico aumentó significativamente mediante el tratamiento del presente péptido (Fig. 8).

En conjunto, puede apreciarse que los péptidos de la presente invención exhiben efectos significativamente potenciados sobre la mejora de las afecciones cutáneas.

Ejemplo 5: Análisis de los efectos de los péptidos sobre el espesor de la piel

45 Para evaluar la aplicabilidad a los cosméticos y las eficacias *in vivo* de los péptidos de la presente invención, la crema nutritiva formulada en la formulación del ejemplo 2 se aplicó a la piel de ratón.

Ratones Balb C macho de 6 semanas de edad (Central Lab. Animal, Inc., Corea) se sometieron a una estabilización de una semana y se retiró parcialmente pelo de su parte dorsal usando crema que contenía ácido tioglicólico. Los

5 ratones se dividieron en dos grupos, en uno de estos grupos se administró tópicamente la crema que comprendía nanosomas que contenían tridecapéptido y en el otro grupo se administró tópicamente crema sin nanosomas. La aplicación de cremas se realizó todas las mañanas (8:30 am) y todas las tardes (18:30) durante 5 días a la dosis de 100 mg. Tras la aplicación se sacrificó a los ratones mediante dislocación cervical y se parafinizaron los tejidos de la piel. Los tejidos parafinizados se seccionaron usando un microtomo con un espesor de 8 µm y se tiñeron con hematoxilina/eosina, seguido de observación con un microscopio óptico (Fig. 9).

10 Como se representa en la Fig. 9, los cosméticos con nanosomas que comprenden el tridecapéptido de la presente invención permitieron estimular la formación y el crecimiento de la capa de queratinocitos y la capa epidérmica. De acuerdo con esto, puede apreciarse que los cosméticos que comprenden péptidos de la presente invención ejercen las mejoras de las arrugas de la piel y la elasticidad de la misma.

15 Los péptidos similares al EGF de la presente invención poseen actividades del EGF humano natural y estimulan la generación de EGF autocrino en las células; Además, los péptidos de la presente invención exhiben eficacias superiores y una estabilidad y penetración en la piel mucho mejor que el EGF natural. A este respecto, podría entenderse que la composición que comprende los péptidos de la presente invención puede exhibir eficacias excelentes en el tratamiento, prevención y mejora de las enfermedades o afecciones que demandan actividades del EGF. Además, los péptidos de la presente invención pueden aplicarse ventajosamente a composiciones farmacéuticas, productos similares a fármacos, cosméticos y cosmeceúticos.

<110> CareGen. Co. Ltd.

<120> Péptidos que tienen actividades del factor de crecimiento epidérmico y sus usos

20 <160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

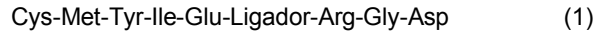
<223> Péptido similar al EGF

<400> 1

30 Cys Met Tyr Ile Glu Gly Gly Gly Gly Arg Gly Asp Gly
1 5 10

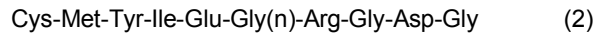
REIVINDICACIONES

1. Un péptido que tiene la actividad de crecimiento celular del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la siguiente fórmula 1:



5 en la que el ligador está representado por $\text{Xaa}_{(n)}$, Xaa es cualquier aminoácido y n es un número entero de 2-18.

2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ligador comprende 2-10 residuos de Gly.
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, péptido que tiene en su extremo N o su extremo C un grupo de protección seleccionado del grupo constituido por grupo acetilo, grupo fluorenilmetoxicarbonilo, grupo formilo, grupo palmitoilo, grupo miristilo, grupo estearilo o polietilenglicol (PEG).
- 10 4. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el residuo de Asp situado en el extremo C del péptido está unido adicionalmente a un residuo de Ala o Gly como grupo de protección.
5. El péptido de acuerdo con la reivindicación 4, péptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la siguiente fórmula 2:



15 en la que n es un número entero de 2 a 8.

6. Un uso del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 la para fabricar un medicamento para prevenir o tratar un trastorno o afección en el que el factor de crecimiento epidérmico es eficaz seleccionado de cicatrización de heridas, tratamiento de enfermedades periodontales y mejora de afecciones cutáneas.

20 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el péptido induce la mejora de afecciones cutáneas.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la mejora de las afecciones cutáneas es la mejora de las arrugas o la elasticidad de la piel, la prevención del envejecimiento de la piel, la prevención de la pérdida de cabello, la estimulación del crecimiento de cabello, el tratamiento de la atopia, la mejora de la humedad de la piel o el tratamiento del acné.

25

Fig. 1

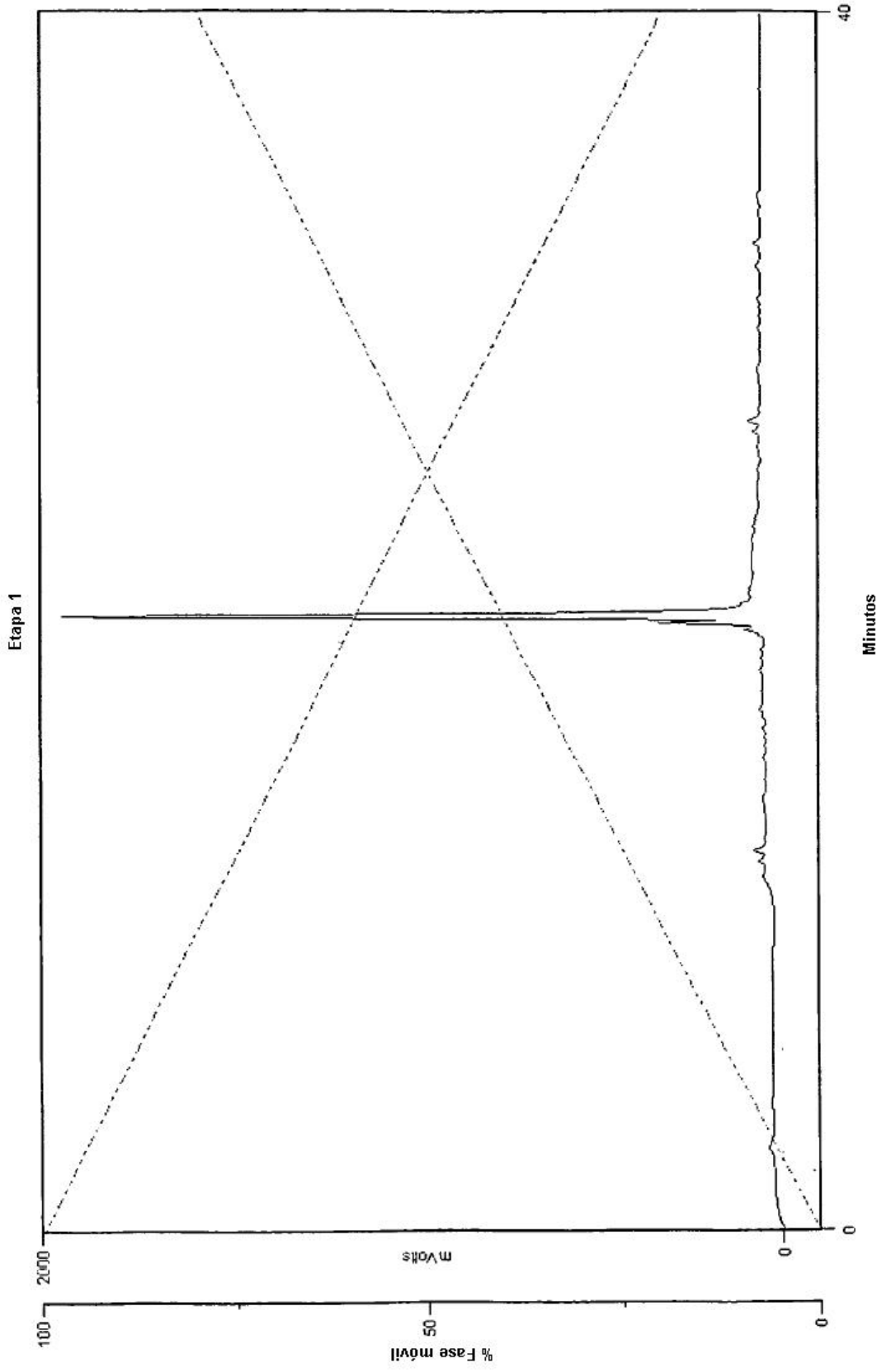


Fig. 2

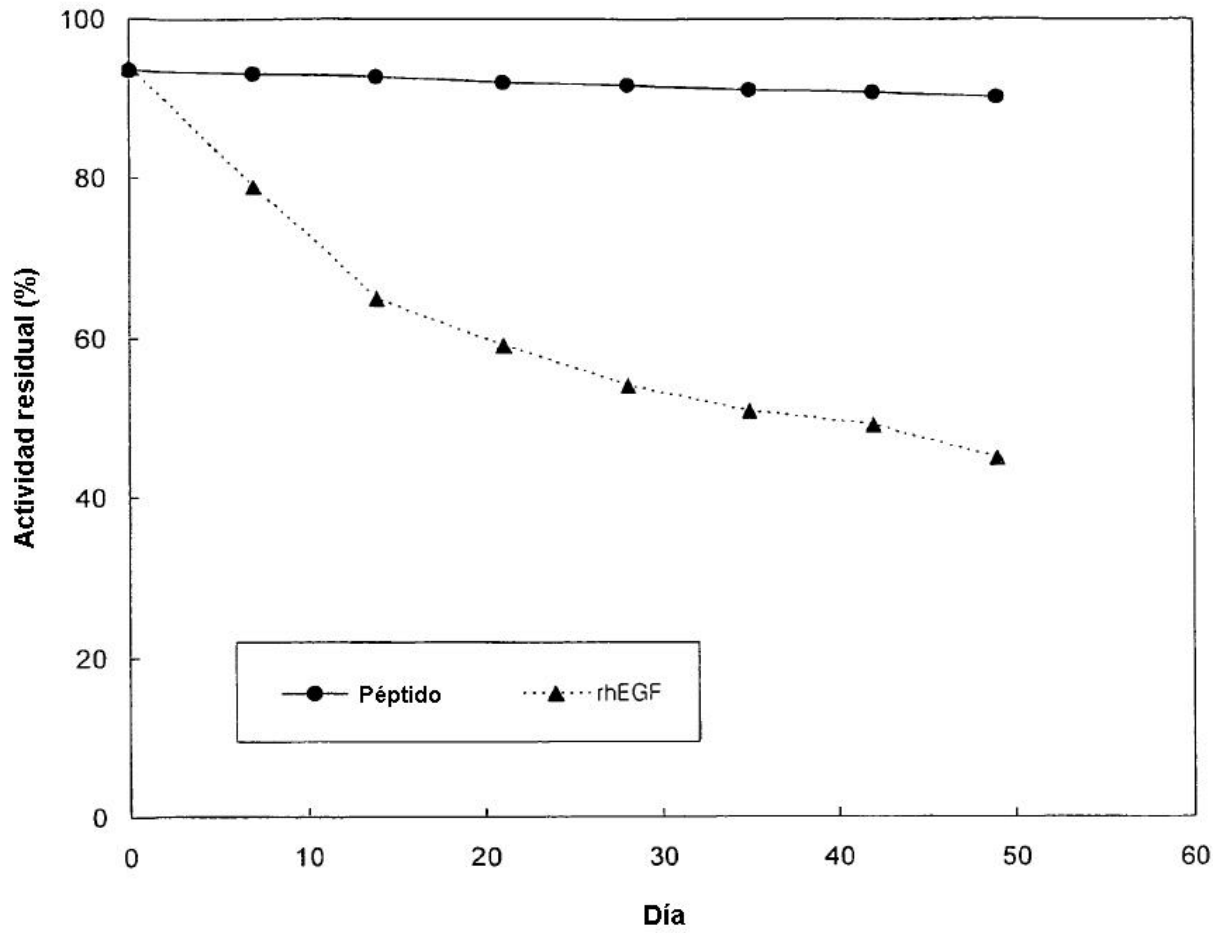


Fig. 3

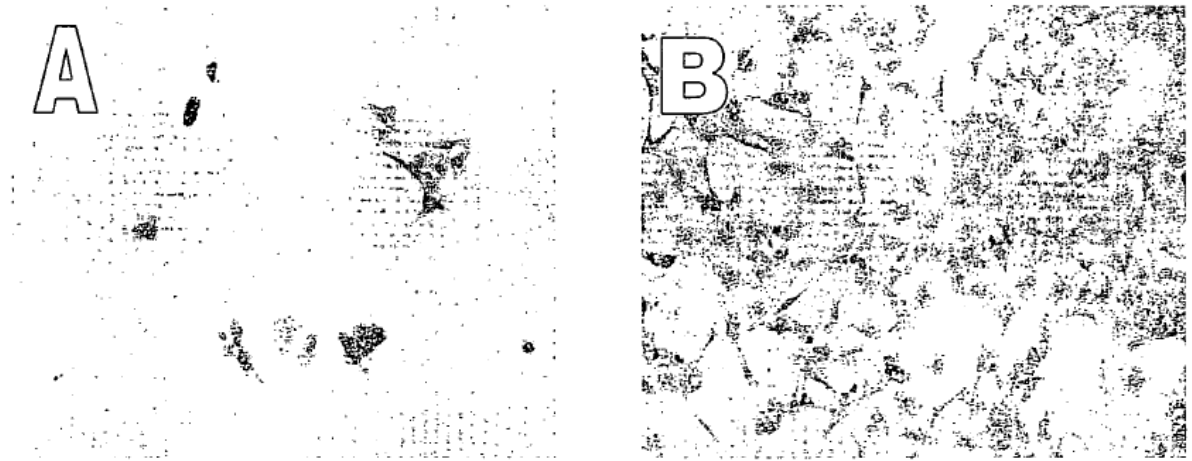


Fig. 4

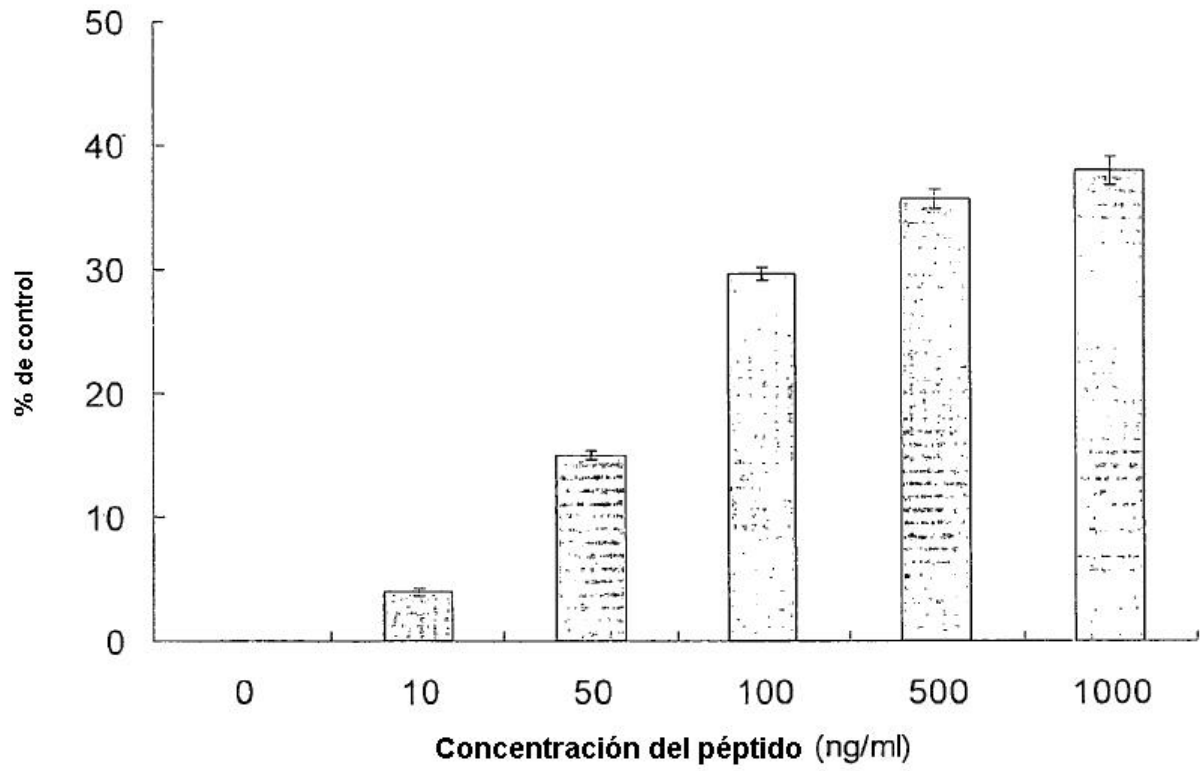


Fig. 5

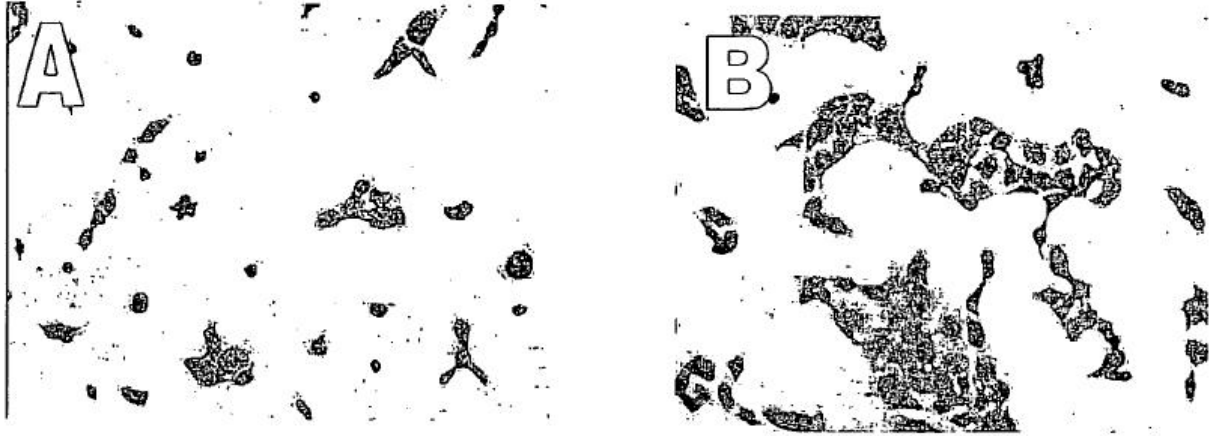


Fig. 6

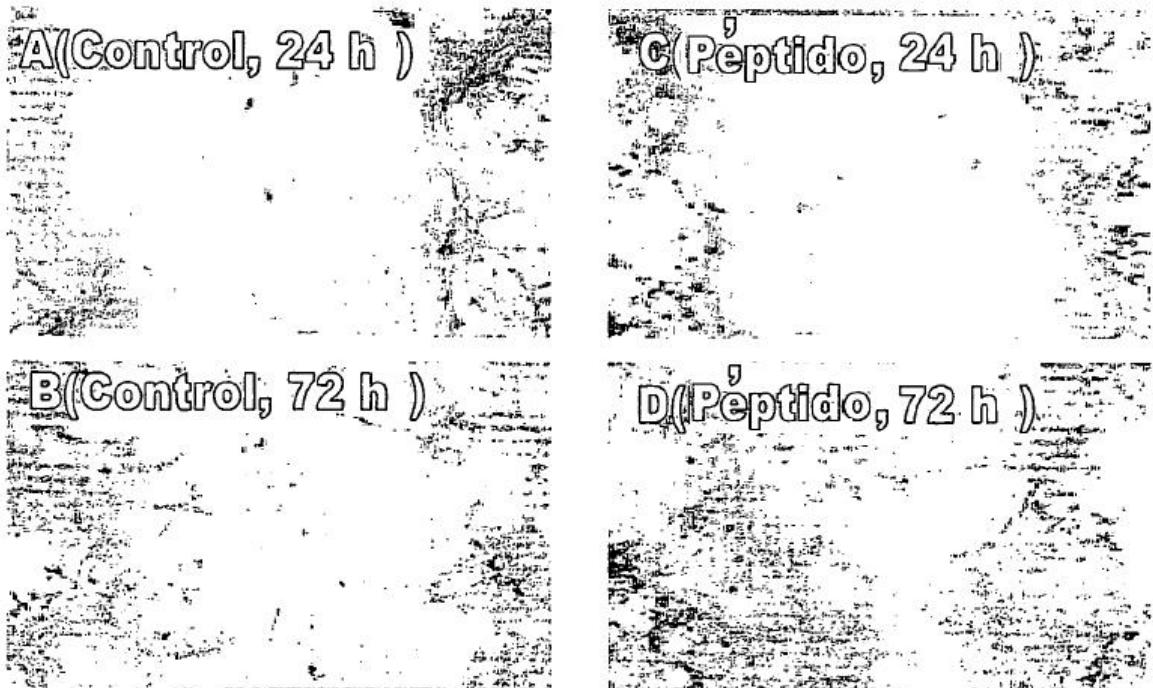


Fig. 7

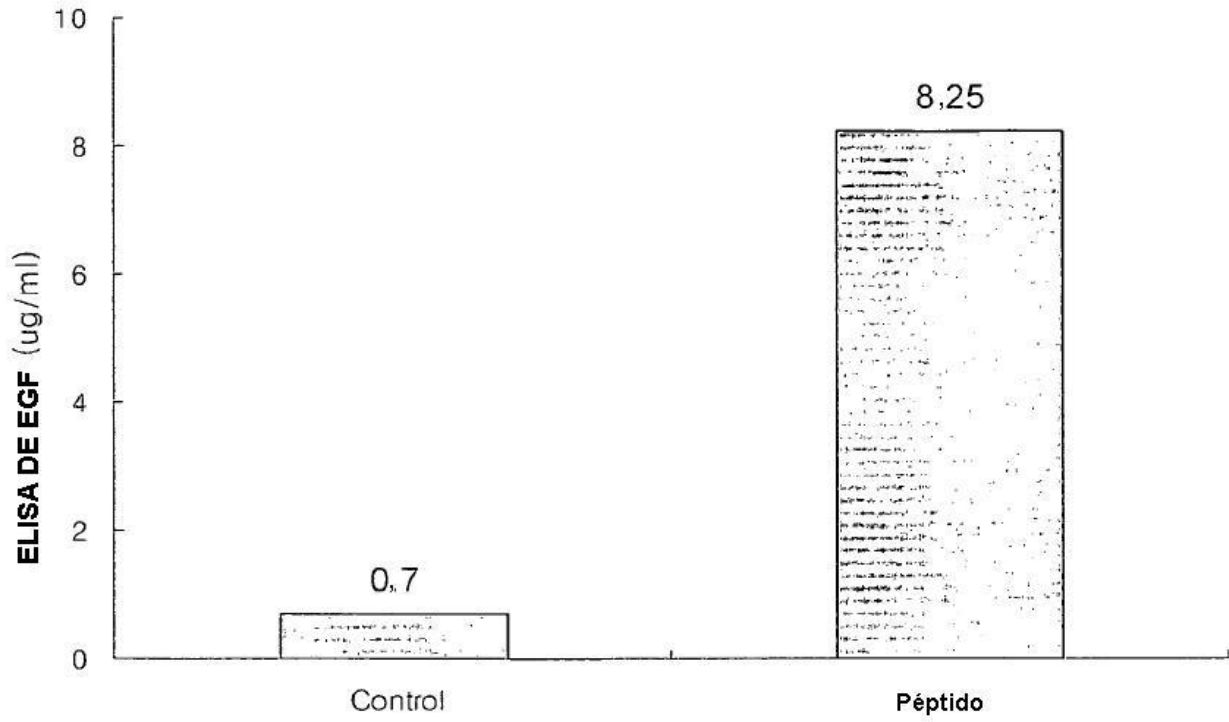


Fig. 8

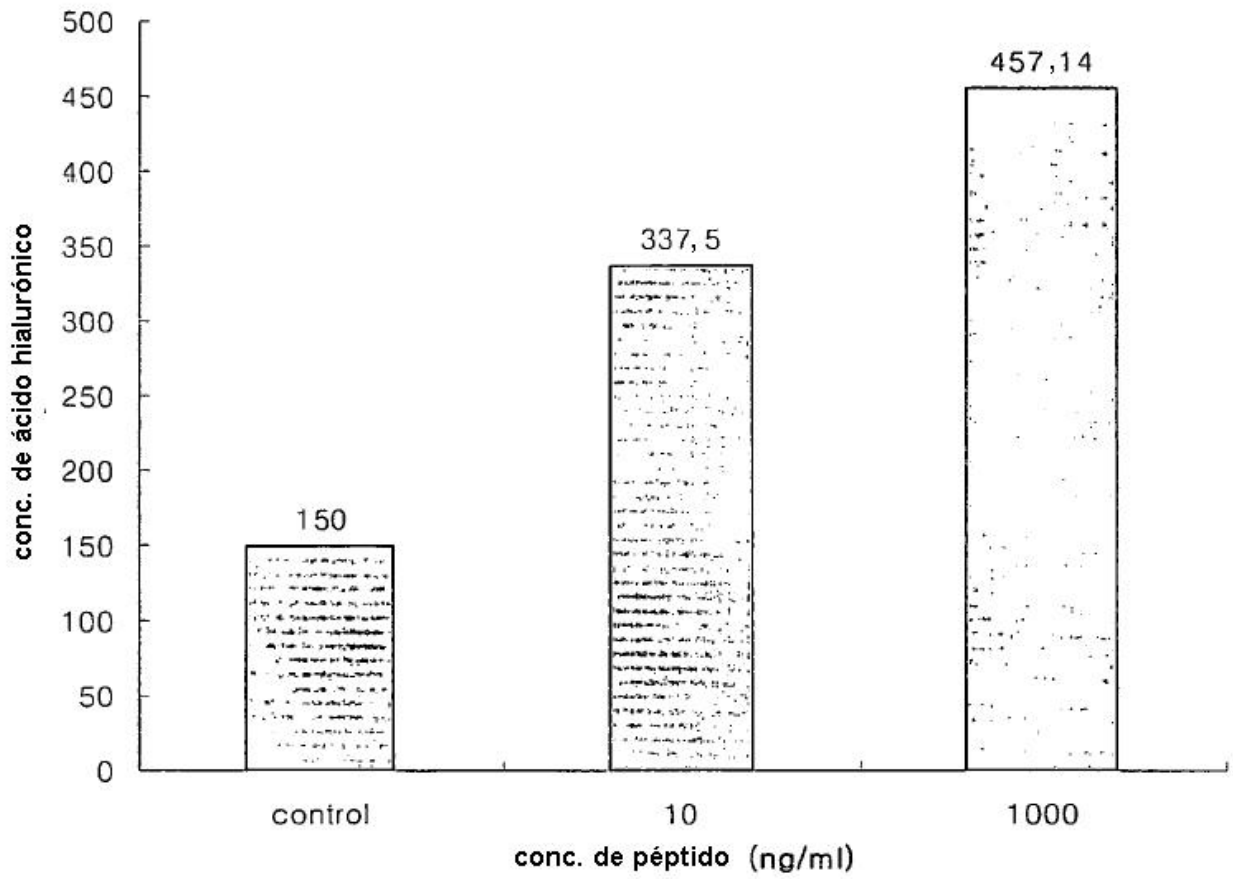


Fig. 9

