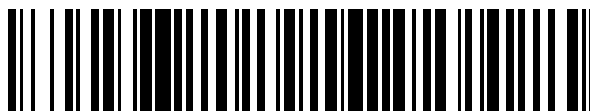


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 145**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 8/18 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2007 E 07808197 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2142572**

54 Título: **Péptido TGFP-CAP y sus usos**

30 Prioridad:

19.04.2007 KR 20070038531

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

04.11.2015

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;
KIM, JIN SEUK;
SONG, SANG SU y
CHO, KYOUNG MI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 550 145 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

Péptido TGFP-CAP y sus usos

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a nuevos péptidos que comprenden péptidos originados en TGF- β y sus usos.

Descripción de la técnica relacionada

El factor beta de crecimiento transformante (TGF- β) es un grupo de factores de crecimiento polipeptídicos que regulan la división y la diferenciación celular. Este grupo también incluye el inhibidor mulleriano (Cate et al., 1986, Cell, 45:685-698), inhibinas (Mason et al., 1985, Nature, 318:659-663), y la proteína Drosophilla DPP-C (complejo del gen decapentaplégico) (Padgett et al., 1987, Nature, 325:81-84). TGF- β consiste en dos unidades similares unidas por un puente disulfuro, cada una de ellas con un peso molecular de 13.000 dalton (Assoian et al., 1983, J. Biol. Chem. 258:7155-7160; Frolik et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3676-3680; Frolik et al., 1984, J Biol. Chem. 260:10995-11000). TGF- β se ha aislado de diferentes tejidos, incluyendo la placenta (Frolik et al., 1983, Nature 325:81-84), plaquetas humanas (Childs et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5312-5316, Assioan et al., 15 1983, J. Biol. Chem. 258:7155-7160), riñón (Roberts et al., 1983, Biochemistry 22:5692-5698), y hueso bovino desmineralizado (Seyedin et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:119-123).

TGF- β puede aumentar el crecimiento de fibroblastos normales de riñón de rata anclados en presencia de un 10% de suero y factor de crecimiento epidérmico (Roberts et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5339-5343; Roberts et al., 1982, Nature 295:417-419; Twardzik et al., 1985, J. Cell Biochem. 28:289-297), e inducir colonias de fibroblastos AKR-2B solamente en un 10% de suero (Tucker et al., 1983, Cancer Res. 43:1518-1586). Asimismo, puede ocasionar la diferenciación de las células mesenquimales del músculo y generar macromoléculas específicas del cartílago en fetos de rata (Seyedin et al., 1986, J. Biol. Chem. 261:5693-5695). A diferencia de sus efectos positivos sobre la proliferación celular, no solamente las proteínas relacionadas con la función aisladas de células epiteliales de riñón de mono verde africano (BSC-1), también el TGF- β purificado de plaquetas humanas puede 25 inhibir el crecimiento celular durante el cultivo celular (Tucker et al., 1984, Science 226:705-707). Además, TGF- β inhibe el crecimiento de algunas células tumorales humanas (Roberts et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:119-123). Esta inhibición de los efectos estimulantes de las TGF- β se ha notificado como dependientes de varios factores tales como la morfología celular y las condiciones fisiológicas de la célula (Spon et al., 1986, Science 232:534).

Se han aislado clones de ADNc de TGF- β de seres humanos (Derynck et al., 1985, Nature 316:701-705), ratones (Derynck et al., 1986, J. Biol. Chem. 261:4377-4379), i virus 40 de simio (Sharples et. al, 1987, DNA 6:239-244). Mediante el análisis de sus secuencias de ADN, se ha notificado que TGF- β fue sintetizado como polipéptido precursor, y después experimenta corte y empalme a un monómero TGF- β . Las proteínas TGF- β precursoras anteriormente descritas muestran una elevada homología en sus secuencias de aminoácidos.

Se ha identificado recientemente que una proteína asilada de hueso bovino desmineralizado estaba relacionada con TGF- β (Seyedin et al., 1987, J. Biol. Chem, 262: 1946-1949). También fue aislada de otras especies, incluyendo plaquetas de sangre de porcino (Cheifetz et al., 1987, Cell 48:409-415), línea celular PC-3 de adenocarcinoma prostático humano (Ikeda et al., 1987, Biochemistry 26:2406-2410), y células glioblastales humanas (Wrann et al., 1987, EMBO 6:1633-1636). Puesto que la secuencia de aminoácidos parcial de esta proteína es homóloga de la de TGF- β , se denominó como TGF- β 2. Las TGF- β asiladas de ser humano (Derynck et al., 1985, Nature 316:701-705), ratones (Derynck et al., 1986, J. Biol. Chem. 261:4377-4379), i virus 40 de simio (Sharples et. al, 1987, DNA 6:239-244) se denominaron como TGF- β 1.

El documento WO 03/093293 describe antagonistas de TGF- β basados en péptidos y su uso en el tratamiento de heridas cutáneas incluyendo quemaduras, laceraciones y arañazos.

45 TGF- β 1 es una proteína muy activa. Desafortunadamente, su uso y su aplicación no se han ampliado debido a su baja expresión, elevados costes de producción y semivida corta.

A lo largo de la presente solicitud, se hace referencia a diferentes patentes y publicaciones, y sus citas se proporcionan entre paréntesis.

Descripción detallada de la presente invención

50 Los presentes inventores han realizado intensas investigaciones para proporcionar nuevos péptidos que tengan efectos blanqueantes de la piel y una estabilidad y un potencial de penetración cutánea mucho mayor que los del TGF- β 1 natural. Han preparado y explorado una amplia variedad de péptidos originados en TGF- β 1 y finalmente han descubierto nuevos péptidos con actividades fisiológicas y estabilidad excelentes, realizando en su caso la presente invención.

De acuerdo con ello, es un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo péptido que tiene una secuencia peptídica derivada de TGF-β1.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición antiangiogénica.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar una composición blanqueante de la piel.

- 5 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento para evitar o tratar las enfermedades relacionadas con la angiogénesis.

Es otro objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento para blanquear la piel.

Otros objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada junto con las reivindicaciones y los dibujos adjuntos.

- 10 En un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido TGFP-CAP que tiene una secuencia de aminoácidos derivada del TGF-β1 (factor -β1 de crecimiento transformante) y una secuencia de adhesión celular, en la que la secuencia de aminoácidos derivada de TGF-β1 consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:1 y en la que el péptido TGFP-CAP es como se especifica adicionalmente en las reivindicaciones.

- 15 Los presentes inventores han realizado intensas investigaciones para proporcionar nuevos péptidos que tengan efectos blanqueantes de la piel y una estabilidad y un potencial de penetración cutánea mucho mayor que los del TGF-β1 natural. Han preparado y explorado una amplia variedad de péptidos originados en TGF-β1 y finalmente han descubierto nuevos péptidos con actividades fisiológicas y estabilidad excelentes.

- 20 Las estrategias principales de la presente invención son: en primer lugar, el presente péptido está diseñado para que comprenda dos partes funcionales, una secuencia originada en TGF-β1 (*es decir*, la parte de actividad de TGF-β) y una secuencia de adhesión a la célula. La secuencia de aminoácidos de la parte de actividad de TGF-β1 se selecciona entre las del TGF-β1 natural. Para potenciar la actividad del TGF-β1 del presente péptido, se adopta una secuencia de adhesión a la célula. Como resultado, la parte de actividad del TGF-β1 se compone de Ile-Trp-Ser-Leu-Asp-Thr-Gln-Tyr (SEC ID N°:1) y la secuencia de adhesión a la célula es RGD (Arg-Gly-Asp). Puesto que el presente péptido construido mediante las estrategias es una proteína de fusión de un péptido derivado de TGF-β1 y un péptido de adhesión a la célula, se ha denominado "péptido TGFP (péptido del factor de crecimiento transformante)-CAP (péptido de adhesión a la célula)".

- 25 La secuencia de adhesión a la célula de la fórmula I es un motivo de adhesión a la célula. Por lo tanto, será evidente para la persona experta en la materia que secuencias de aminoácidos más largas que comprenden la secuencia de adhesión a la célula descrita anteriormente están comprendidas en el alcance de la presente invención.

- 30 La secuencia de adhesión a la célula es RGD (Arg-Gly-Asp).

La secuencia RGD se selecciona de fibronectina como proteínas de la matriz celular.

Las dos partes funcionales están unidas indirectamente mediante engarces. El péptido TGFP-CAP se representa mediante la siguiente fórmula II:



- 35 en la que la secuencia de adhesión a la célula es la misma que de la fórmula I.

- Una variedad de engarces accesibles a las personas expertas en la materia se puede usar como engarces para enlazar la parte de actividad del TGF-β1 y la parte de adhesión a la célula. Los engarces que comprenden restos de aminoácidos se describen en Huston, et al., *Methods in Enzymology*, 203:46-88(1991), y Whitlow, et al., *Protein Eng.*, 6:989(1993). Los engarces útiles en la presente invención comprenden restos Gly o Gly y Ser. La longitud preferida de los engarces está comprendida entre 2 y 18. El engarce utilizado en la presente invención comprende 2-10 restos Gly. Los engarces compuestos por restos de aminoácidos, en particular por restos Gly pueden contribuir a la estabilidad de los presentes péptidos.

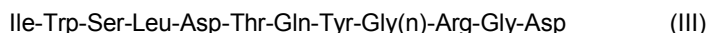
- 40 Incluso aunque el péptido de la presente invención tenga de por sí mayor estabilidad que el TGF-β1 natural, su modificación permite mostrar una estabilidad muy superior. Preferentemente, el extremo N o el C de los presentes péptidos representados mediante la fórmula I tiene al menos un resto de aminoácido protegido con un grupo acetilo, grupo fluorenilo metoxycarbonilo, grupo formilo, grupo palmitoilo, grupo miristilo, grupo estearilo o polietilenglicol (PEG). Los grupos de protección mejoran la estabilidad de los presentes péptidos.

Como alternativa, el extremo C del presente péptido se modifica con un grupo amino, dando lugar a un aumento de la estabilidad de los presentes péptidos.

- 50 El término "estabilidad", usado en el presente documento, se refiere a la estabilidad *in vivo* y a la estabilidad durante el almacenamiento (*por ejemplo*, estabilidad en almacenamiento a temperatura ambiente) por igual. El grupo de

protección anteriormente descrito protege a los péptidos del ataque de las proteasas *in vivo*.

Preferentemente, el péptido TGFP-CAP se representa mediante la siguiente fórmula III:



en la que n es un entero de 2-8.

- 5 Un péptido ilustrativo de la presente invención se describe en la SEC ID N°:2.

El término "péptido", usado en el presente documento, se refiere a una molécula lineal formada por la unión de restos de aminoácido mediante enlaces peptídicos.

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

- 15 La estructura fundamental de los presentes péptidos es una estructura de enlace de una secuencia derivada de TGF-β1 y una secuencia de adhesión a la célula. En esta línea, una persona experta en la materia reconocerá que las fórmulas I y II están previstas para describir la estructura de los presentes péptidos de una forma más cómoda, y sus modificaciones están comprendidas en el alcance de la presente invención. Por ejemplo, será evidente para una persona experta en la materia que los péptidos que tengan posiciones invertidas de la secuencia derivada de TGF-β1 y la secuencia de adhesión a la célula en las fórmulas I y II, *es decir*, "secuencia de adhesión a la célula-Ile-Trp-Ser-Leu-Asp-Thr-Gln-Tyr" y "secuencia de adhesión a la célula-engarce-Ile-Trp-Ser-Leu-Asp-Thr-Gln-Tyr" están comprendidas en el alcance de la presente invención. Además, los péptidos que comprenden restos de aminoácidos adicionales (*por ejemplo*, 1-2 restos) en la secuencia derivada de TGF-β1 y/o la secuencia de adhesión a la célula quedarían abarcadas por la presente invención. Por ejemplo, si la secuencia de adhesión a la célula (Arg-Gly-Asp) contiene restos Ser adicionales en su extremo C, también quedaría abarcada por la presente invención.

- 25 Los presentes péptidos muestran efectos blanqueantes de la piel y efectos antiangiogénicos excelentes, así como una estabilidad plausible a factores fisicoquímicos tales como el calor, los ácidos y los álcalis. Por lo tanto, los péptidos de la presente invención que tienen almacenamiento a largo plazo significativo se pueden aplicar ventajosamente a productos que requieren un almacenamiento prolongado tales como fármacos, cuasi-fármacos, cosméticos y productos para limpieza de dientes/boca o cuidado oral.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición antiangiogénica que comprende el péptido TGFP- CAP de la presente invención anteriormente descrito.

- 30 También se describe un procedimiento para prevenir o tratar la angiogénesis y las enfermedades asociadas, que comprende administrar a un sujeto una composición de la invención a un sujeto (a) una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido TGFP-CAP de la presente invención y (b) un transportador farmacéuticamente aceptable.

- 35 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de un péptido TGFP-CAP de la presente invención para su uso en un procedimiento para prevenir o tratar las enfermedades relacionadas con la angiogénesis, en la que la enfermedad asociada con la angiogénesis es cáncer, por ejemplo, cáncer de piel.

Puesto que la presente composición comprende el péptido TGFP-CAP como principio activo, las descripciones comunes entre los mismos se omiten para evitar una excesiva redundancia que aumente la complejidad de la presente memoria descriptiva.

- 40 Los péptidos utilizados como principios activos muestran excelentes actividades antiangiogénicas descritas en los Ejemplos. La presente composición es útil en la prevención, mejora o tratamiento de enfermedades o dolencias causadas por un exceso de angiogénesis.

El término usado en el presente documento "enfermedades asociadas con la angiogénesis" significa enfermedades, trastornos o dolencias causadas por el crecimiento no regulado de los vasos sanguíneos.

- 45 La presente composición se utiliza para prevenir o tratar cánceres. En particular, la presente composición se utiliza para prevenir, mejorar o tratar cánceres. En particular, la presente composición es muy eficaz en el tratamiento del cáncer de piel.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición blanqueante de la piel que comprende el péptido TGFP-CAP de la presente invención como principio activo.

- 50 En otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un procedimiento para blanquear la piel, que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende el péptido TGFP-CAP de la presente invención.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso del péptido TGFP-CAP de la presente invención para fabricar una composición para blanqueamiento de la piel.

El péptido TGFP-CAP de la presente invención previene eficazmente la generación de melanina en la piel para mostrar efectos blanqueantes. La composición blanqueante de la piel de la presente invención permite un color de piel brillante, iguala el tono de la piel y elimina los pigmentos cutáneos y las manchas negras.

La presente composición se puede preparar como una composición farmacéutica o cosmética.

De acuerdo con una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica que comprende (a) una cantidad terapéuticamente eficaz del presente péptido; y (b) un transportador farmacéuticamente aceptable.

El término usado en el presente documento "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para mostrar y conseguir eficacias y actividades del péptido de la presente invención.

El transportador farmacéuticamente aceptable incluido en la composición farmacéutica de la presente invención, que se utiliza habitualmente en formulaciones farmacéuticas, incluye pero no se limita a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, caucho arable, fosfato de potasio, arginato, gelatina, silicato de potasio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabes, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, y aceites minerales. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender además un lubricante, un humectante, un edulcorante, un aromatizante, un emulsionante, un agente suspensor, y un conservante. Los detalles de los transportadores farmacéuticamente aceptables y las formulaciones se puede encontrar en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19ª ed., 1995).

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral, y preferentemente, por vía parenteral, *por ejemplo*, administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, transdérmica o local.

Una cantidad de dosis adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo de los procedimientos de la composición farmacéutica, de los procedimientos de administración, la edad del paciente, el peso corporal, sexo, estado patológico, la dieta, el momento de administración, la vía de administración, velocidad de excreción y una sensibilidad para una composición farmacéutica utilizada. Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar con una dosis diaria de 0,0001-100 µg.

De acuerdo con las técnicas convencionales conocidas de los expertos en la materia, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede formular con un transportador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable tal como se ha descrito anteriormente, proporcionando finalmente varias formas de dosis unitaria y una forma multidosis. Los ejemplos no limitantes de las formulaciones incluyen, pero sin limitación, una disolución, una suspensión o una emulsión en medio acuoso u oleoso, un extracto, un elixir, un polvo, un gránulo, un comprimido y una cápsula, y puede comprender además un agente de dispersión o un estabilizador.

De acuerdo con una realización preferida, la composición es una composición cosmética que comprende (a) una cantidad cosméticamente eficaz del presente péptido; y (b) un transportador cosméticamente aceptable.

El término usado en el presente documento "cantidad cosméticamente aceptable" se refiere a una cantidad suficiente para conseguir eficacias sobre mejoras en las condiciones de la piel anteriormente descritas.

Las composiciones cosméticas de la presente invención pueden formularse en una amplia variedad de formas, por ejemplo, que incluyen 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, una base en polvo, una base en emulsión, una base en cera y un pulverizador. Específicamente, las composiciones cosméticas de la presente invención pueden formularse en una amplia variedad de suavizantes de la piel, líquido nutritivo, crema nutritiva, crema de masaje, esencia, crema para ojos, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, envase, pulverizador o polvo.

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

Si la formulación está en polvo o en un pulverizador, puede comprender lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio, polvo de poliamida y mezclas de estas sustancias. El pulverizador comprende adicionalmente los propulsores habituales, por ejemplo, clorofluorocarbonos, propano/butano o dimetil éter.

La formulación de la solución y la 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 sorbitán.

La formulación de la suspensión puede comprender diluyentes líquidos, por ejemplo, agua, etanol o propilenglicol, agentes suspensores, por ejemplo, alcoholes de isostearilo etoxilados, sorbitol polioxietilenado y ésteres de sorbitán.

polioxietilenados, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar y tragacanto o mezclas de estas sustancias.

La formulación de las composiciones limpiadoras con tensioactivo puede comprender sulfato de alcohol alifático, éter sulfato de alcohol alifático, monoéster de sulfosuccinato, isotinato, derivados de imidazolio, taurato de metilo, sarcosinato, éter sulfato de amida de ácido graso, amidobetaina de alquilo, alcohol alifático, glicérido de ácido graso, dietanolamida de ácido graso, aceite vegetal, derivados de lanolina, éster de ácido graso de glicerol etoxilado o mezclas de dichos ingredientes.

Además, las composiciones cosméticas de la presente invención pueden incluir sustancias auxiliares así como péptidos como principios activos y transportadores. Los ejemplos no limitantes de las sustancias auxiliares incluyen conservantes, antioxidantes, estabilizantes, solubilizantes, vitaminas, colorantes, mejoradores del olor o mezclas de dichas sustancias.

Las características y ventajas de la presente invención se resumen de la siguiente forma:

- (i) El péptido TGFP-CAP de la presente invención presenta una excelente actividad antiangiogénica.
- (ii) El péptido TGFP-CAP de la presente invención previene eficazmente la generación de melanina en la piel para tener efectos blanqueantes.
- (iii) El presente péptido muestra una estabilidad y permeabilidad cutánea mucho más altas que el TGF- β 1 natural.
- (iv) Las actividades plausibles y la seguridad del presente péptido anteriormente descrito permite ventajosamente la aplicación a fármacos, cuasi-fármacos y cosméticos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa los resultados del análisis mediante cromatografía líquida de alto rendimiento del tridecapéptido preparado en el Ejemplo.

La Fig. 2 representa los resultados del análisis de estabilidad del tridecapéptido preparado en el Ejemplo. El término "Péptido" denota el presente péptido que comprende dos restos Gly como enlazante sintetizado en el Ejemplo 1. El término "TGFb-1" denota TGF- β 1.

La Fig. 3 representa los efectos inhibidores dependientes de la dosis del presente tridecapéptido sobre la generación de melanina mediante α -MSH en células de melanoma B16F10.

La Fig. 4 representa los efectos inhibidores del presente tridecapéptido sobre la actividad de la tirosinasa en células de melanoma B16F10. TGF- β 1 se usó como control.

La Fig. 5 es una imagen de microscopio que representa la influencia del presente tridecapéptido sobre la activación de ERK 1/2 en células de melanoma B16F10. Se evaluó el número de melanosomas. TGF- β 1 se usó como control. El término "TGP2" denota el presente péptido que comprende dos restos Gly como enlazante sintetizado en el Ejemplo 1. El término "TGFb-1" denota TGF- β 1.

La Fig. 6 es un análisis mediante transferencia Western de los resultados que verifican que el presente tridecapéptido restaura la fosforilación de ERK 1/2 inhibida por PD98059 en células de melanoma B16F10.

La Fig. 7 es una fotografía que muestra que el tamaño de los tumores de melanoma xenotrasplantados a ratones se redujo mediante el presente tridecapéptido.

La Fig. 8 demuestra que el presente tridecapéptido inhibe la metástasis del melanoma xenotrasplantado a ratones.

La Fig. 9 representa los resultados del análisis de citotoxicidad del presente tridecapéptido sintetizado en el Ejemplo.

La presente invención se describirá ahora más detalladamente en los ejemplos. Será evidente para los expertos en la materia que estos ejemplos están previstos para ilustrar más concretamente, y el ámbito de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas y no está limitado por los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de NH₂-Ile-Trp-Ser-Leu-Asp-Thr-Gln-Tyr-Gly(n)-Arg-Gly-Asp-OH

700 mg de resina de cloruro de clorotritilo (resina CTL, Nova Biochem n° de cat. 01-64-0021) se introdujeron en un reactor, al que se añadieron 10 ml de cloruro de metileno (MC), seguido por agitación durante 3 min. Tras eliminar la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF) a lo resultante y, a continuación, la agitación se llevó a cabo durante 3 min, después de lo cual se eliminó el disolvente. Se añadieron al reactor 10 ml de solución de diclorometano y a continuación se añadieron al reactor 200 mmoles de Fmoc-Asp(otbu)-OH y 400 mmoles de DIEA, después de lo cual, la mezcla se disolvió mediante agitación y la reacción se mantuvo después en agitación durante 1 h. Tras el lavado, la resina se hizo reaccionar con una mezcla de metanol y DIEA (2:1) en MC durante 10 min, y después se lavó con un exceso de MC/DMF (1:1). Tras eliminar la solución, se añadieron 10 ml de DMF a lo resultante y la agitación se llevó a cabo durante 3 min, seguido por la eliminación del disolvente. Se añadieron 10 ml de una solución de desprotección (piperidina al 20% en DMF) al reactor, y se realizó agitación durante 10 min a temperatura ambiente y la retirada de la solución. Tras añadir el mismo volumen de solución de desprotección, la reacción se mantuvo en agitación durante 10 min y se retiró la solución, seguido por lavado secuencial con DMF, MC

y DMF para obtener las resinas Asp-CTL. Se añadieron 10 ml de una solución de DMF a un reactor limpio, y después se añadieron 200 mmoles de Fmoc-Gly-OH (Novabiochem, EE.UU.), 200 mmoles de HoBt y 200 mmoles de Bop, seguido por agitación para solubilización. Se añadieron al reactor 400 mmoles de DIEA y se llevó a cabo la agitación para disolver todos los contenidos sólidos. La solución de aminoácido disuelta se introdujo en el reactor que contenía la resina desprotegida y se llevó a cabo la reacción con agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la extracción de la solución de reacción, el resultado se agitó tres veces con solución de DMF para eliminar los residuos no extraídos. Una pequeña cantidad de la resina ya reaccionada se extrajo para evaluar la medida de las reacciones mediante un ensayo de ninhidrina. Usando la solución de desprotección, se llevó a cabo la desprotección dos veces de la misma forma que se ha descrito anteriormente para obtener resinas Gly-Asp(tBu)-CTL. Tras el lavado con DMF y MC, se realizó el ensayo de ninhidrina y las uniones de los aminoácidos se realizaron como se ha descrito anteriormente. Basándose en la secuencia de aminoácidos diseñada por los presentes inventores, Fmoc-Arg(pbf), Fmoc-Gly(n veces), Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Gln(trt), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Asp(otbu), Fmoc-Leu, Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Trp(boc) y Fmoc-Ile se unieron secuencialmente a las resinas. Los restos Gly se introdujeron en el número de 2-6, produciendo de esta forma los cinco tipos de resinas de peptidilo. La resina de peptidilo preparada se desprotegió para la eliminación de Fmoc, se lavó tres veces con DMF, MC y metanol, respectivamente y se secó bajo atmósfera de nitrógeno, después de lo cual se secó a vacío con P₂O₅, dando finalmente las resinas de peptidilo de interés. La resina de peptidilo se hizo reaccionar con 30 ml de una solución de producto saliente que contenía un 81,5% de ácido trifluoroacético (TFA), 5% de agua destilada, 5% de tioanisol, 5% de fenol, 2,5% de EDTA y 1% de TIS] durante 2 h a temperatura ambiente tras agitación intermitente. La resina se filtró y se lavó con un pequeño volumen de solución de TFA, después de lo cual, el filtrado se combinó con el licor madre. Tras destilación 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 por lavado dos veces con éter frío. Tras eliminar el licor madre, el resultado se secó bajo atmósfera de nitrógeno y proporcionó 0,93 g de cinco péptidos sin purificar representado por NH₂-Ile-Trp-Ser-Leu-Asp-Thr-Gln-Tyr-Gly(n)-Arg-Gly-Asp-OH. Entre ellos, se obtuvo el NH₂-Ile-Trp-Ser-Leu-Asp-Thr-Gln-Tyr-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp-OH en una cantidad de aproximadamente 0,87 g, y su peso molecular se determinó como 1467,9 (PM teórico 1467,5) usando un analizador de masas (Perseptive Pioneer DE-STR ABI, EE.UU.). Los siguientes Ejemplos se realizaron usando el péptido que tiene dos restos Gly engarces. La Fig. 1 representa una cromatografía líquida de alto rendimiento del péptido finalmente sintetizado y purificado.

Ejemplo 2: Análisis de estabilidad del tridecapéptido

Para evaluar la estabilidad del tridecapéptido purificado, NH₂-Ile-Trp-Ser-Leu-Asp-Thr-Gln-Tyr-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp-OH, se disolvió en Tris-HCl en 50 mM (pH 8,0) hasta una concentración de 10 µg/ml. Como control, se preparó un TGF-β1 recombinante (Sigma) producido a partir de *E. coli*, 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. Posteriormente, se extrajeron soluciones los días 0, 1, 10, 25, 50, 75 y 100 y se sometieron al ensayo MTT (Scudiero, D. A., et al. Cancer Res. 48:4827-4833(1988)) usando células NIH-3T3 (Korean Cell Line Bank) para determinar su actividad remanente (Fig. 2). Los resultados se proporcionaron como valores relativos respecto a la actividad (100%) de la muestra tomada el día 0.

Como se representa en la Fig. 2, la actividad del TGF-β 1 recombinante disminuyó de forma marcada con el transcurso del tiempo. Por el contrario, se demostró que la actividad del presente tridecapéptido no disminuía con el tiempo.

Ejemplo 3: Preparación de nanopéptidos

50 mg del tridecapéptido sintetizado se disolvió en 500 ml de agua destilada. La solución de péptido se mezcló con 5 g de lecitina, 0,3 ml de oleato de sodio, 50 ml de etanol y una pequeña cantidad de aceites, y su volumen se ajustó con agua destilada a 1 l. La solución resultante se sometió a un microfluidizador bajo presión elevada para emulsión, proporcionando de esta forma nanosomas que tienen un tamaño de 100 nm. Los nanosomas se prepararon para tener una concentración final de aproximadamente 50 ppm y se usaron como ingredientes para cosmética.

Ejemplo de Formulación 1: Suavizante de la piel

Se formuló un suavizante para la piel que contenía nanosomas del tridecapéptido preparado en el Ejemplo 3 de acuerdo con la siguiente composición.

TABLA 1

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Tridecapéptido	0,001
1,3-butilenglicol	6,0
Glicerina	4,0
PEG 1500	1,0

(continuación)

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Hialuronato de sodio	1,0
Polisorbato 20	0,5
Etanol	8,0
Conservante, pigmento	Cantidad adecuada
Benzofenona-9	0,05
Perfume	Cantidades mínimas
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de Formulación 2: Crema nutritiva

Se formuló una crema nutritiva para la piel que contenía nanosomas del tridecapéptido preparado en el Ejemplo 3 de acuerdo con la siguiente composición.

TABLA 2

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Tridecapéptido	0,001
Aceite de hierba de la pradera	3,0
Alcohol cetearílico	1,5
Ácido esteárico	1,5
Estearato de glicerilo	1,5
Parafina líquida	10,0
Cera	2,0
Polisorbato 60	0,6
Sesquioleato de sorbitán	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

Se formuló un líquido nutritivo para la piel que contenía nanosomas del tridecapéptido preparado en el Ejemplo 3 de acuerdo con la siguiente composición.

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
Aceite de nuez de macadamia	2,0
Polisorbato 60	1,5
Sesquioleato 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

Se formuló una esencia que contenía nanosomas del tridecapéptido preparado en el Ejemplo 3 de acuerdo con la siguiente composición.

5

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 de sodio	8,0
Polímero de carboxivinilo	0,2
Trietanolamina	0,18
Octildodeceth-16	0,4
Etanol	6,0
Perfume, conservante, pigmentos	Cantidad adecuada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo 4: Disminución del pigmento melanina debido al tridecapéptido

El tridecapéptido sintetizado en el Ejemplo 1 se analizó para determinar niveles disminuidos del pigmento melanina. Melanocitos de ratón cultivados se incubaron con α -MSH (hormona estimuladora de melanocitos/Sigma) y después con el tridecapéptido en determinadas concentraciones para medir los efectos inhibidores sobre la generación de melanina. Los melanocitos de ratón procedían de ratones C57BL/6 y se cultivaron en DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) que contenía suero de feto de ternera al 10% a 37°C en condiciones de 37°C bajo un 5% de CO₂. Las células se cultivaron en una densidad de 1×10^5 células/pocillo y se observó su adhesión a placas de cultivo. Después, las células se incubaron con los materiales a ensayar durante 3 días. Los materiales ensayados se prepararon de tal manera que los componentes indicados en la Tabla 5 se disolvieron en medio y se diluyeron con un solvente mixto de propilenglicol:etanol:agua destilada (5:3:2). Tras la eliminación del medio, las células se lavaron con PBS y se trataron con hidróxido de sodio 1 N. El resultado se analizó para medir sus valores de absorbancia a 400 nm. La inhibición de la generación de melanina medida se muestra en la Fig. 3 (procedimiento de Dooley).

TABLA 5

Nº	Composiciones
A	Control negativo
B	α -MSH 200 ng/ml
C	α -MSH 200 ng/ml + TGF β -1 10 ng/ml
D	α -MSH 200 ng/ml + péptido 10 ng/ml
E	α -MSH 200 ng/ml + péptido 100 ng/ml
F	α -MSH 200 ng/ml + péptido 10 μ g/ml
G	α -MSH 200 ng/ml + péptido 30 μ g/ml

Como se representa en la Fig. 3, el grupo incubado solamente con α -MSH solamente muestra un nivel elevado de producción de melanina. Por el contrario, el grupo incubado con el tridecapéptido representa un contenido en melanina disminuido de una forma dependiente de la concentración. El tratamiento con el tridecapéptido da lugar a una disminución en el nivel de melanina similar al de sin tratamiento con α -MSH. Este resultado urge a los inventores a razonar que el tridecapéptido puede inhibir las actividades que causan la generación de melanina y por tanto tonos brillantes de la piel.

EJEMPLO 5: Inhibición de la actividad tirosinasa mediante el tridecapéptido

El tridecapéptido sintetizado en el Ejemplo 1 se analizó para determinar niveles disminuidos del pigmento melanina. Células B16F10 (Korean Cell Line Bank) se sembraron en placas a una densidad de 1×10^5 células/pocillo y se cultivaron en DMEM (Sigma) durante 3 días en condiciones de 37°C bajo un 5% de CO₂. Tras observarse la adhesión celular, el medio cambió a un medio fresco que contenía un 2% de suero. Las células se incubaron con los materiales ensayados en determinadas concentraciones durante 4 días en condiciones de 37°C bajo un 5% de CO₂. Los materiales ensayados se prepararon de tal manera que los componentes indicados en la Tabla 6 se disolvieron en medio y se diluyeron con un solvente mixto de propilenglicol:etanol:agua destilada (5:3:2).

TABLA 6

Nº	Composiciones
A	Control negativo
B	α -MSH 200 ng/ml
C	α -MSH 200 ng/ml + TGF β -1 10 ng/ml
D	α -MSH 200 ng/ml + péptido 10 ng/ml
E	α -MSH 200 ng/ml + péptido 100 ng/ml
F	α -MSH 200 ng/ml + péptido 10 μ g/ml
G	α -MSH 200 ng/ml + péptido 30 μ g/ml

Posteriormente, las células se recogieron y se trataron con un tampón de lisis que contenía docecilsulfato de sodio (Sigma) y Triton X-100 (Sigma) para extraer las proteínas intracelulares. Las proteínas extraídas se cuantificaron mediante el procedimiento BCA. Para cada grupo experimental, se añadieron 90 μ l de solución de proteína y 10 μ l

de L-DOPA (Sigma) y se hicieron reaccionar durante 30 min. Los resultantes se analizaron para medir sus valores de absorbancia a 405 nm con el fin de evaluar la actividad de la tirosinasa.

Como se representa en la Fig. 4, el grupo tratado solamente con α -MSH solamente muestra un nivel elevado de producción de melanina. Por el contrario, el grupo tratar a cabo bien con TGF- β 1 o el tridecapéptido representa una actividad tirosinasa relativamente reducida de una forma dependiente de la dosis. El tratamiento con el tridecapéptido da lugar a una disminución en el nivel de tirosinasa similar al de sin tratamiento con α -MSH. Este resultado urge a los inventores a razonar que el tridecapéptido puede negar los efectos que ocasionan la activación de la tirosinasa y por tanto tonos brillantes de la piel. Además, se entenderá que el tridecapéptido de la presente invención tiene un mecanismo de acción idéntico al de TGF- β 1.

Ejemplo 6: Fosforilación de ERK mediante el tridecapéptido

Para revelar los efectos blanqueantes de la piel del tridecapéptido sintetizado en el Ejemplo 1 y el factor de crecimiento transformante, la activación de ERK se inhibió mediante PD98059 (Sigma) y después su influencia inhibidora se evaluó después del tratamiento con el péptido. Células B16F10 se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo y se cultivaron en DMEM durante 3 días en condiciones de 37°C bajo un 5% de CO₂. Tras observarse la adhesión celular, el medio cambió a un medio fresco que contenía un 2% de suero. El control negativo no se sometió a ningún tratamiento. Las células sembradas en otras dos placas de cultivo se incubaron bien con 1 ng/ml del factor de crecimiento transformante o 30 μ g/ml del tridecapéptido. Además, las células cultivadas en otras tres placas como control positivo se incubaron con 10 μ M de PD98059 para inhibir la fosforilación de ERK. Entre ellos, las células contenidas en las dos placas se incubaron durante 4 días, bien con 1 ng/ml de factor de crecimiento transformante o 30 μ g/ml del tridecapéptido tras un tratamiento de 1 h con PD98059 y su morfología se observó al microscopio.

Como se muestra en la Fig. 5, se demostró que las células incubadas con PD98059 tenían una gran cantidad de pigmentos oscuros debidos a los melanosomas inducidos. Por el contrario, se observó las células incubadas bien con el factor de crecimiento transformante o con el tridecapéptido junto con PD98059 redujo significativamente el número de melanosomas, demostrando que el tridecapéptido de la presente invención puede inducir la fosforilación de ERK (Phospho-ERK) como TGF- β 1 para evitar la formación de melanosomas.

Además, para verificar claramente la influencia de TGF- β 1 y el tridecapéptido sobre los eventos de señalización, las células de melanoma se cultivaron como se ha descrito anteriormente, y a continuación se incubaron simultáneamente con 10 μ M de PD98059 y 30 μ g/ml del tridecapéptido. Las proteínas de los extractos celulares se prepararon y se desarrollaron sobre SDS-PAGE, seguido por electrotransferencia a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno) (GE Health Care). Posteriormente, la membrana de PVDF se incubó con anticuerpos Phospho ERK 1/2 (dilución 1/3000, Cell Signaling, EE.UU.) durante 4 horas a temperatura ambiente. La membrana de PVDF se lavó con un tampón de lavado y se incubó con anticuerpos dirigidos contra IgG de ratón conjugados con HRP (dilución 1/5000, Santa Cruz, EE.UU.). Después, se lavó dos veces con un tampón de lavado y se incubó con una solución de ECL (quimioluminiscencia mejorada) (GE Health Care) (Fig. 6). En la Fig. 6, entre los grupos de tratamiento con PD98059, el símbolo "Con" es un grupo incubado con solamente 10 μ M de PD98059 y "TGF β 1" es un grupo incubado con 10 μ M de PD98059 y 10 ng/ml TGF- β 1 a la vez.

Como se representa en la Fig. 6, el tratamiento con PD98059 se analizó para determinar niveles muy disminuidos de Phospho ERK 1 y ERK 2. Por el contrario, el tratamiento con cualquiera de TGF- β 1 o el tridecapéptido dio lugar a niveles elevados de Phospho ERK 1 y ERK 2. Mientras tanto, los niveles de TRP-1 (proteína 1 relacionada con tirosinasa) y TRP-2 aumentaron debido a PD98059 y disminuyeron debido a cualquiera de TGF- β 1 o el tridecapéptido. Estos resultados llevan a los inventores a concluir que el tridecapéptido de la presente invención puede afectar a los eventos implicados en la señalización de ERK de la misma manera que TGF- β 1.

Ejemplo 7: Inhibición del crecimiento de las células de melanoma trasplantadas mediante el tridecapéptido

Se afeitó el pelo del dorso de ratones macho Balb/C normales de 5 semanas de edad (Central Lab Animal Inc, Corea) y se xenotrasplantaron 2×10^6 de células de melanoma B16F10 (Korean Cell Line Bank) en cada una de dos porciones trasplantada. Después de mantener a los ratones 3 días con alimentación normal, se observó la hinchazón de las porciones trasplantadas con las células de melanoma. Una de las partes trasplantadas como control recibió PBS y la otra parte recibió dos veces al día aproximadamente 100 μ g del tridecapéptido.

La Fig. 7 es una fotografía de los sitios de tumores de ratón 1 semana después de la administración del tridecapéptido. Se observó claramente la regresión del tumor en el sitio que recibió el tridecapéptido. Además, los ratones se sacrificaron y se analizaron los sitios tumorales. Como resultado, se observó que tanto la metástasis tumoral como la angiogénesis quedaron inhibidas. Los sitios del tumor se parafinizaron para obtener láminas delgadas que se tiñeron a continuación con hematoxilina y eosina, tal como se representa en la Fig. 8. Se observó que la producción de células de melanoma en tejidos disminuyó significativamente.

Ejemplo 8: Ensayo de citotoxicidad del tridecapéptido

Para verificar la citotoxicidad de los péptidos de la presente invención sobre los queratinocitos, los fibroblastos y las células de melanoma, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico con SRB (Sulforrodamina B) usando células HaCaT, NIH3T3 y B16F10 de acuerdo con el procedimiento de Rizzino et al (Rizzino, et al. Cancer Res., 48:4266(1988)). Las células HaCaT, NIH3T3 o B16F10 (Banco coreano de líneas celulares) se cultivaron en frascos de 250 ml que contenían medio esencial EMEM (medio mínimo esencial de Eagle, Gibco, EE.UU.) suplementado con FBS al 100% (suero de feto de ternera). Las células cultivadas se trataron con una solución de tripsina al 0,25% para desprender las células del fondo de los frascos de cultivo y se centrifugaron para recoger los aglomerados celulares. Las células se resuspendieron en EMEM que no contenía FBS, sus células alícuota (1×10^5) se añadieron a cada pocillo de placas de 96 pocillos cultivados con un 7% CO₂ durante 24 h a 37°C. Tras 24 h de cultivo, el medio se cambió por un medio reciente que no contenía suero, y las células se incubaron con el tridecapéptido (500 pg/ml, 10 ng/ml, 1 µg/ml, 100 µg/ml y 200 µg/ml) se disolvieron en DMSO al 10% durante 72 h en las mismas condiciones descritas anteriormente. Tras eliminar los sobrenadantes, las células se lavaron una vez con PBS y se incubaron con solución de SRB (Sigma). Las células se lavaron con PBS y se observaron al microscopio para encontrar la viabilidad celular. Además, se midió la absorbancia a 590 nm para analizar la proliferación celular. Como se representa en la Fig. 9, la disminución en el número de células no se demostró al microscopio en todas las concentraciones del tridecapéptido. Estos resultados resuelven que el péptido de la presente invención inducen pocos o ningún efecto adverso sobre las células cutáneas.

El péptido TGFP-CAP de la presente invención presenta una excelente actividad antiangiogénica. Además, el péptido TGFP-CAP de la presente invención previene eficazmente la generación de melanina en la piel para tener efectos blanqueantes. El presente péptido muestra una estabilidad y permeabilidad cutánea mucho más altas que el TGF-β1 natural. Dichas actividades plausibles y la seguridad del presente péptido permiten ventajosamente la aplicación a fármacos, cuasi-fármacos y cosméticos.

<110> Caregen Co. Ltd.

<120> Péptido TGFP-CAP y sus usos

<150> KR10-2007-0038531

<151> 19-04-2007

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de TGF beta 1

<400> 1

Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr
1 5

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido TGFP-CAP

<400> 2

Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Gly Gly Arg Gly Asp
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido TGFP-CAP que tiene una secuencia de aminoácidos derivada del TGF-β1 (factor -β1 de crecimiento transformante) y una secuencia de adhesión celular, en donde el péptido TGFP-CAP se representa mediante la siguiente fórmula II:

5 Ile-Trp-Ser-Leu-Asp-Thr-Gln-Tyr-Engarce-secuencia de adhesión a la célula (II),

en la que la secuencia de adhesión a la célula es RGD (Arg-Gly-Asp) y
en la que el engarce comprende 2-10 restos Gly.

2. El péptido TGFP-CAP de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido TGFP-CAP se representa mediante la siguiente fórmula III:

10 Ile-Trp-Ser-Leu-Asp-Thr-Gln-Tyr-Gly(n)-Arg-Gly-Asp (III)

en la que n es un entero de 2-8.

3. El péptido TGFP-CAP de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el extremo N del péptido está protegido con un grupo protector seleccionado entre el grupo que consiste en grupo acetilo, grupo fluorenilo metoxycarbonilo, grupo formilo, grupo palmitoílo, grupo miristilo, grupo estearilo y polietilenglicol (PEG).

15 4. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en un procedimiento para prevenir o tratar enfermedades asociadas a la angiogénesis, en el que la enfermedad asociada con la angiogénesis es cáncer, por ejemplo, cáncer de piel.

5. Un procedimiento cosmético para el blanqueamiento de la piel, comprendiendo dicho procedimiento el uso del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

20

Fig. 1

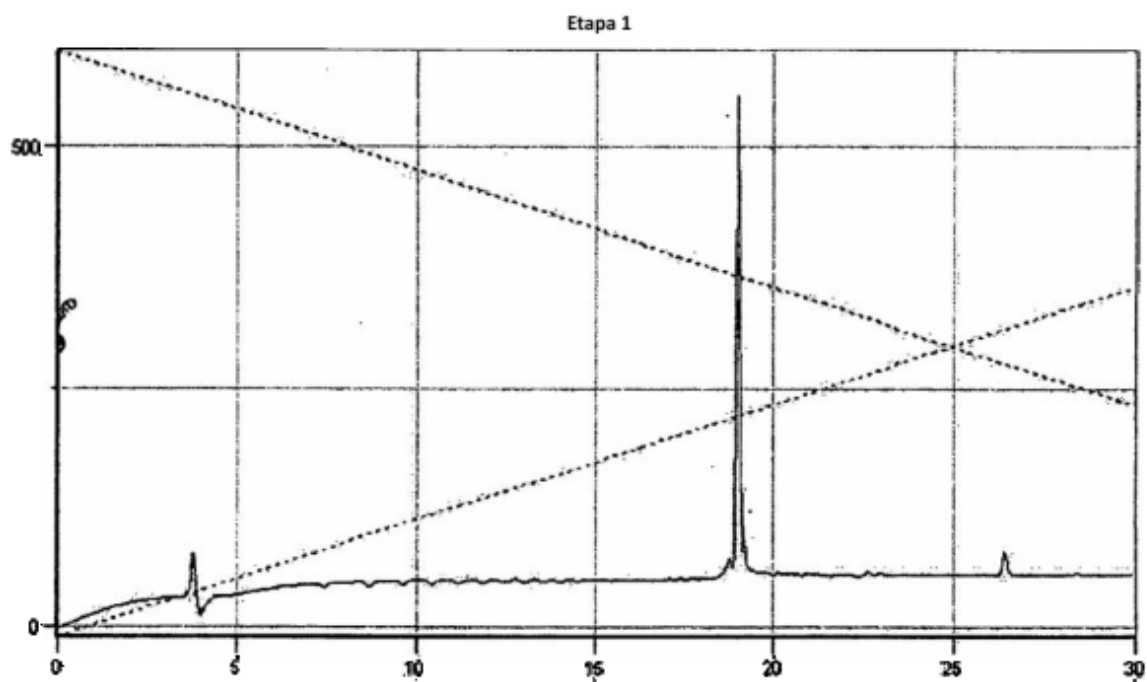


Fig. 2

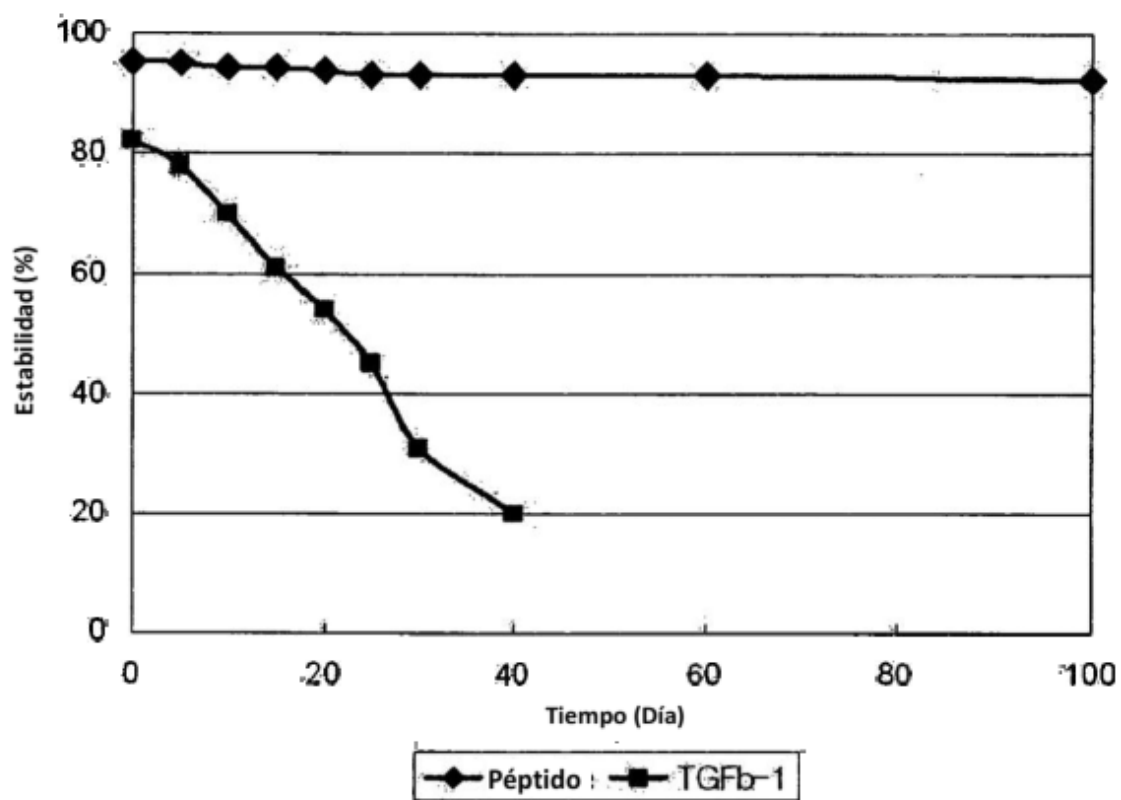


Fig. 3

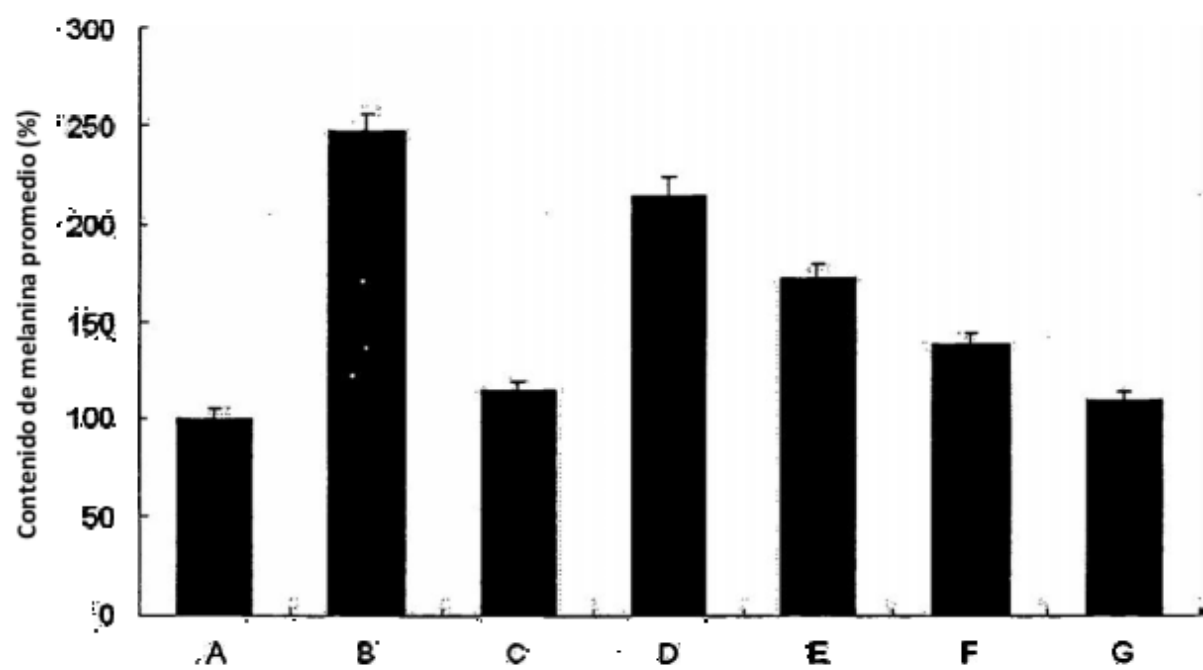


Fig. 4

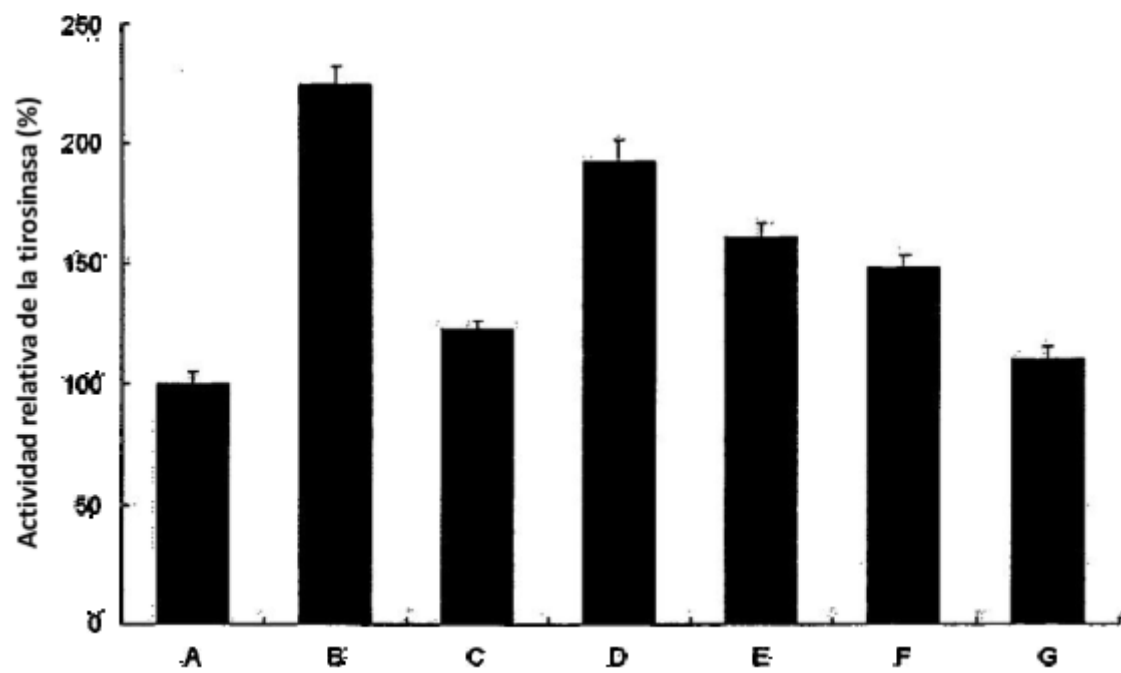


Fig. 5

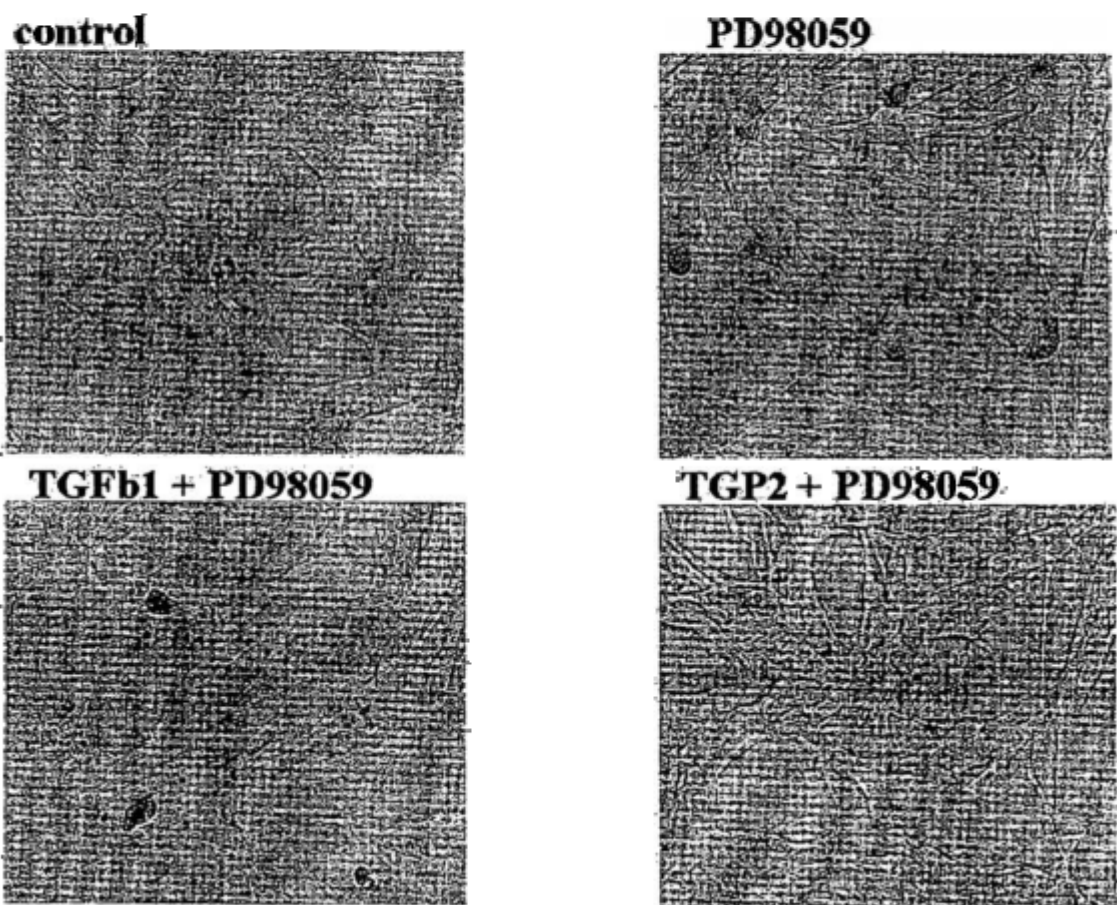


Fig. 6

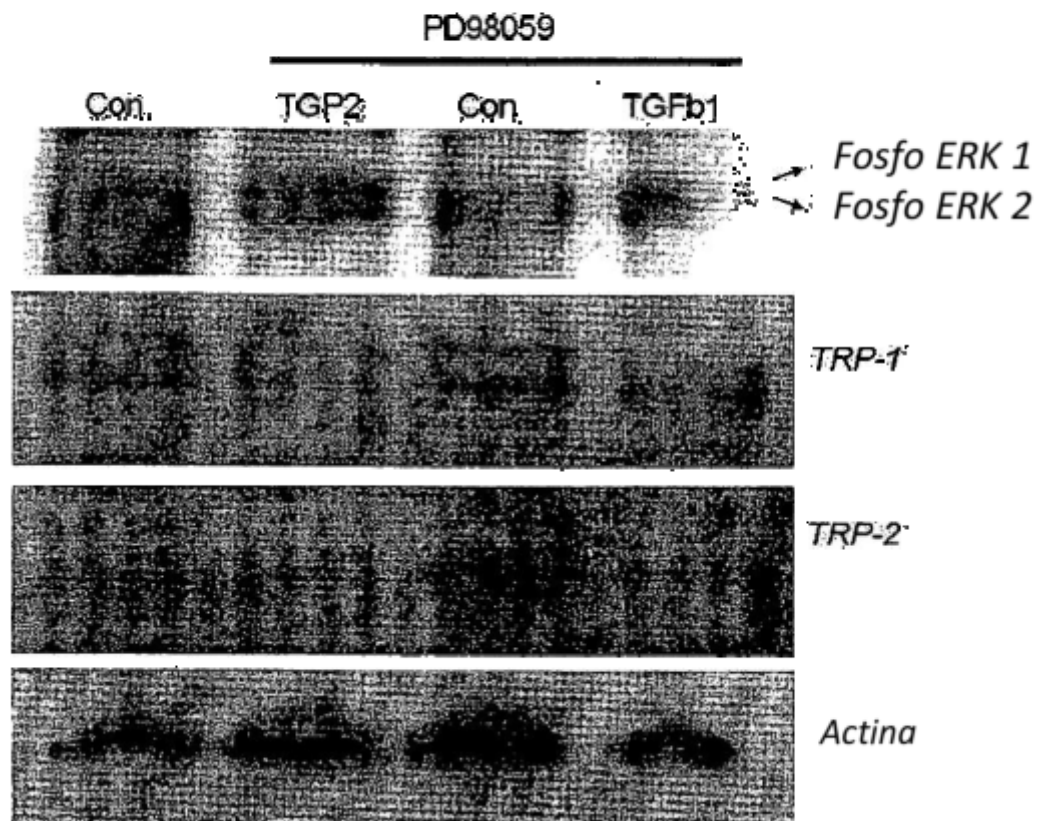


Fig. 7

Control: inyección de PBS



Control: inyección de TGP2



Fig. 8

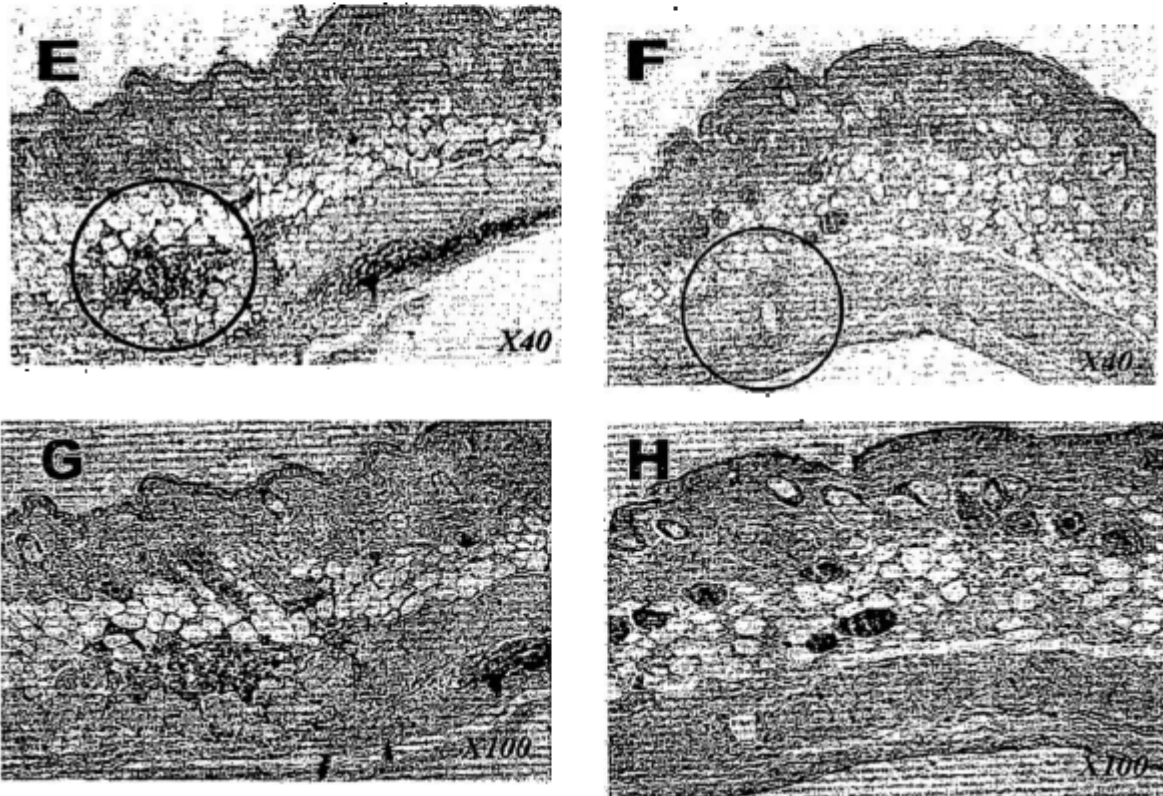


Fig. 9

