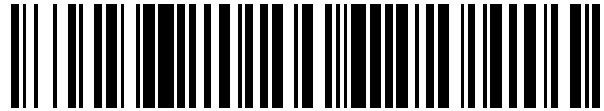


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 595**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/06** (2006.01)

**A61K 8/64** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2013 E 13718774 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2666780**

54 Título: **Derivado de hexapéptido-2 unido a biotina y usos del mismo**

30 Prioridad:

**28.03.2012 KR 20120031853**

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

**30.11.2015**

73 Titular/es:

**INCOSPHARM CORPORATION (100.0%)  
112 Bioventure Center, Korea Research Institute  
of Bioscience & Biotechnology, 52 Eoeun-dong,  
Yuseong-gu  
Daejeon 305-806, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, KEE-DON;  
LIM, CHAE-JIN;  
YOON, SEOK-JEONG y  
KWON, SEON-DEOK**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 552 595 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

Derivado de hexapéptido-2 unido a biotina y usos del mismo

### 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un derivado de hexapéptido-2 conjugado con biotina o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y a usos del mismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a un derivado de hexapéptido-2 conjugado con biotina o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un método de preparación del mismo, a una composición que incluye el mismo como un principio activo y a un método para la mejora de las arrugas y la inhibición del envejecimiento cutáneo utilizando el mismo.

### Antecedentes de la técnica

15 La piel es un órgano que realiza funciones tales como protección, barrera, control de temperatura, excreción y respiración y se compone de la epidermis, la dermis y la grasa subcutánea. La epidermis es la capa más delgada y es una estructura organizada de queratinocitos y melanocitos. La dermis es una capa que constituye aproximadamente el 95 % de la piel y que actúa para hidratar y proteger la piel. En la dermis, el colágeno y la elastina, que desempeñan un papel importante en la elasticidad de la piel (arrugas) se distribuyen para formar una estructura en forma de red, encontrándose vasos sanguíneos y nervios y los mastocitos implicados en la reacción alérgica y también se incluyen factores humectantes naturales tales como Na-PCA o ácido hialurónico. La grasa subcutánea actúa para proporcionar nutrientes a la epidermis y a la dermis, determinar la forma del cuerpo, mantener la temperatura corporal, absorber los impactos externos y proteger las células bajo la grasa subcutánea.

25 El envejecimiento cutáneo se produce con el tiempo debido a la reducción rápida de las funciones de la piel debido a factores endógenos o exógenos. Con el envejecimiento cutáneo, la epidermis, la dermis y la grasa subcutánea que son los componentes de la piel se vuelven delgados y el colágeno y la elastina también se vuelven delgados y flácidos y comienzan a perder su elasticidad, causando las arrugas. Además, el envejecimiento o la exposición de la piel a los rayos UV inhiben la adipogénesis en los adipocitos subcutáneos, lo que conduce a la pérdida de la función protectora de la piel y al rápido envejecimiento cutáneo. Por tanto, los tejidos de la cara, el pecho y la cadera se vuelven caídos y se produce el desarrollo de arrugas, con el tiempo dejar de tener el aspecto de belleza.

35 Se han realizado muchos estudios para mejorar la función reducida de la piel y el método más importante es encontrar un método de promoción de la biosíntesis de colágeno de las células cutáneas. Para lograr esto, se han seleccionado y utilizado vitamina C y derivados de la misma, péptido KTTKS, péptido de cobre y diversos extractos naturales. Sin embargo, la vitamina C y los derivados de la misma tienen las desventajas de una baja estabilidad y una baja actividad a largo plazo, y el péptido KTTKS y el péptido de cobre tienen la desventaja de tener un escaso efecto de promoción de la biosíntesis de colágeno. Los extractos naturales tienen las desventajas de una baja actividad y la diferencia en su actividad en el momento de preparación de la muestra. Por consiguiente, existe una necesidad urgente de desarrollar un material de nuevo concepto para la promoción de la biosíntesis de colágeno con el fin de resolver todas las desventajas.

### Divulgación

#### 45 Problema técnico

Por tanto, los inventores de la presente invención han examinado las técnicas anteriores con el fin de resolver los problemas. Se ha descubierto que el hexapéptido-2 (His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) elimina los depósitos patológicos de material fibrótico en la piel (documento EP 1994939). Además, los inventores descubrieron que el hexapéptido-2 es capaz de promover el crecimiento de los fibroblastos (Publicación de Patente Coreana N° 10-2008-0075530) y realizaron un experimento para dotarlo de una nueva actividad a través de diversas modificaciones y conjugaciones del mismo. Finalmente, los inventores de la presente invención demostraron que un derivado peptídico del hexapéptido-2 conjugado con biotina tiene una excelente capacidad para promover la producción de colágeno en los fibroblastos y el derivado peptídico puede utilizarse para mejorar las arrugas de la piel y el envejecimiento cutáneo.

#### Solución técnica

60 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo derivado peptídico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que tenga un excelente efecto de promoción de la biosíntesis de colágeno en los fibroblastos.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para preparar el derivado peptídico o la sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

65 Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar una composición cosmética para la mejora de las arrugas y la inhibición del envejecimiento cutáneo, incluyendo el derivado peptídico o la sal farmacéuticamente

aceptable del mismo.

Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para la mejora de las arrugas y la inhibición de envejecimiento cutáneo, incluyendo el derivado de péptido o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

### Efectos ventajosos

El derivado peptídico del hexapéptido-2 conjugado con biotina de la presente invención tiene excelentes efectos en la mejora de las arrugas y la prevención del envejecimiento cutáneo y exhibe eficazmente sus efectos intrínsecos sin efectos secundarios tales como irritación de la piel cuando se aplica al cuerpo humano y por tanto es un material muy útil en los campos industriales tales como producciones de medicamentos de uso externo y cosméticos. Además, las composiciones cosméticas y farmacéuticas que incluyen el derivado peptídico del hexapéptido-2 conjugado con biotina de la presente invención son dignos de mención como alternativa a los métodos y tratamientos conocidos para la inhibición del envejecimiento cutáneo mediante la mejora de la biosíntesis de colágeno en la piel.

### Descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra el resultado del ensayo de la citotoxicidad del derivado peptídico del hexapéptido-2 conjugado con biotina de acuerdo con la presente invención; y

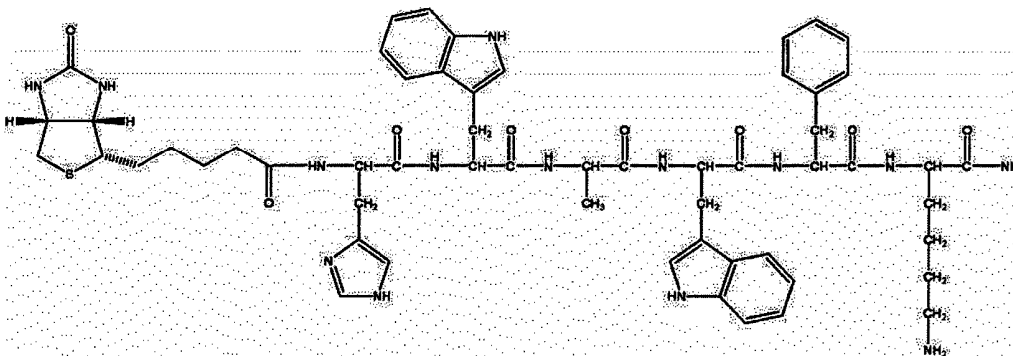
La FIG. 2 muestra el resultado del ensayo de la biosíntesis de colágeno del derivado peptídico del hexapéptido-2 conjugado con biotina de acuerdo con la presente invención.

### Mejor modo

En un aspecto para conseguir los objetivos anteriores, la presente invención se refiere a un nuevo derivado peptídico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que maximiza capacidad de síntesis de colágeno de los fibroblastos.

Específicamente, la presente invención se refiere a un derivado peptídico que tiene una estructura de la siguiente Fórmula Química 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

[Fórmula Química 1]



El derivado peptídico de Fórmula Química 1 es un nuevo derivado peptídico que se prepara mediante conjugación con biotina del péptido hexapéptido-2 (His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" incluye sales que se derivan de un ácido inorgánico, ácido orgánico o base farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de ácido adecuado pueden incluir ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido fosfórico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido succínico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido tartárico, ácido acético, ácido cítrico, ácido metanosulfónico, ácido fórmico, ácido benzoico, ácido malónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido trifluoroacético, etc. Los ejemplos de sales derivadas de bases adecuadas pueden incluir metales alcalinos tales como sodio, etc., metales alcalinotérreos tales como magnesio, etc. y amonio, etc.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar el nuevo derivado peptídico.

El derivado peptídico de la presente invención o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden prepararse mediante el uso de una técnica conocida en la técnica. El método de síntesis se representa mediante la siguiente

descripción, pero la presente invención no se limita a la misma, y el método puede modificarse apropiadamente por aquellos expertos en la materia dentro del alcance de la tecnología conocida en la técnica.

5 En una realización específica de la presente invención, los derivados peptídicos que tienen un efecto hidratante se prepararon mediante síntesis peptídica en fase sólida estándar (SPPS) con química de Fmoc y química de solución.

10 El método de síntesis de péptidos en fase sólida se realizó de acuerdo con el total de 6 etapas de 1) cargar aminoácidos protegidos en una resina; 2) retirar los grupos protectores de los aminoácidos; 3) inducir reacciones de acoplamiento de los aminoácidos; 4) control de las reacciones (por ejemplo, el ensayo de Kaiser); 5) retirar la resina y los grupos protectores; y 6) solidificar los péptidos.

En lo sucesivo, cada etapa del método de síntesis se describirá en más detalle.

15 La Etapa 1) es una etapa de carga de aminoácidos y biotina sobre una resina. La resina puede incluir resinas de Wang, resinas de clorotritilo, resinas de poliestireno o similares. Para la optimización de la síntesis, se utiliza una resina cuyos residuos reactivos se unen con grupos amina y se añade un disolvente adecuado a esta resina de amina para hinchar la resina. El disolvente puede ser, por ejemplo, MC (cloruro de metileno), pero no se limita al mismo. A continuación, el disolvente se retira a presión reducida y los aminoácidos protegidos se disuelven en un disolvente adecuado y se añade una mezcla de DIC (diisopropilcarbodiimida) y DMAP (4-dimetilaminopiridina) a un recipiente y se hace reaccionar. El disolvente puede ser, por ejemplo, DMF (dimetilformamida) y el grupo protector de aminoácido puede ser Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), pero no se limitan a los mismos.

20 La Etapa 2 es una etapa de eliminación de los grupos protectores de aminoácidos. La eliminación de los grupos protectores de aminoácidos puede realizarse de acuerdo con un método generalmente conocido en la técnica. En la realización específica de la presente invención, la solución de aminoácidos cargados en la resina se retiró a presión reducida y la resina se lavó y después se hizo reaccionar con piperidina en solución de DMF para retirar los grupos protectores.

30 La Etapa 3 es una etapa de inducción de reacciones de acoplamiento de aminoácidos. La reacción de acoplamiento de aminoácidos puede realizarse de acuerdo con un método generalmente conocido en la técnica, por ejemplo, el método de HOBt-DCC (N-hidroxibenzotriazol-diciclohexilcarbodiimida) o el método de HOBt-DIC (N-hidroxibenzotriazol-diisopropilcarbodiimida) (Wang C. Chan, Peter D. White, "Fmoc solid phase peptide synthesis", Oxford). Además, los reactivos de acoplamiento tales como N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris(dimetilamino)fosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris(dimetilamino)fosfonio (BOP), [hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio] (HATU), 1H-hidroxi-benzotriazol (HOBt), 1H-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) o similares pueden utilizarse para realizar la síntesis y una base orgánica tal como ácido trifluoroacético (TFA), diisopropiletilamina (DIPEA), N-metilmorfolina (NMM) o similar puede añadirse en función del reactivo de acoplamiento para realizar la reacción, pero no se limitan a los mismos.

45 La Etapa 4 es una etapa de control de la reacción. En la realización específica de la presente invención, por ejemplo, se utilizó el ensayo de Kaiser (E. Kaiser et al., *Anal. Biochem.* (1970) 34, 595) con el fin de controlar la reacción de acoplamiento de los aminoácidos. El ensayo de Kaiser es un método cualitativo de detección de la presencia de grupos funcionales amina primaria por los cambios de color utilizando ninhidrina. En detalle, después de las reacciones de acoplamiento de aminoácidos, se añaden 2-3 gotas de una solución de ensayo de Kaiser a una pequeña cantidad de la resina lavada y después se observan los cambios de color de la resina durante un tiempo predeterminado. Ningún cambio de color de la resina indica que la reacción de acoplamiento se realiza correctamente y por tanto se pasa a la siguiente reacción. Un color azul de la resina indica la presencia de aminoácidos sin reaccionar y por tanto las reacciones de acoplamiento de aminoácidos deben repetirse.

55 La Etapa 5) es una etapa de eliminación de la resina y los grupos protectores. Los péptidos sintetizados mediante la repetición de las Etapas 3 a 5 se retiran de la resina y los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos se desprotegen. La eliminación de la resina y del grupo protector del aminoácido puede realizarse de acuerdo con un método generalmente conocido en la técnica. En la realización específica de la presente invención, se añadió una solución de cóctel de escisión que consiste en TFA (ácido trifluoroacético), TIS (triisopropilsilano), tioanisol, H<sub>2</sub>O y EDT (etanoditiol) para obtener una solución peptídica. La composición de la solución puede modificarse apropiadamente por los expertos en la materia, dependiendo de las condiciones experimentales.

60 La Etapa 6 es una etapa de solidificación de los péptidos. Por ejemplo, puede añadirse una cantidad excesiva de disolvente éter dietílico para producir la precipitación de sólidos, pero no se limita a ello.

65 El derivado peptídico de acuerdo con la presente invención y la sal farmacéuticamente aceptable del mismo no mostraron ningún efecto secundario tal como citotoxicidad sobre los fibroblastos de la piel (FIG. 1) y mostraron una fuerte capacidad para promover la biosíntesis de colágeno en los fibroblastos de la piel. En particular, el tratamiento de hexapéptido-2 y biotina solos o en combinación no mostró ningún aumento de la biosíntesis de colágeno de tipo

1, pero el hexapéptido-2 conjugado con biotina mostró un aumento significativo en la biosíntesis de colágeno de tipo 1 (Fig. 2).

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una composición para la mejora de las arrugas y la prevención del envejecimiento cutáneo, incluyendo el derivado peptídico de la presente invención o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La composición para la mejora de las arrugas y la prevención del envejecimiento cutáneo que incluye el derivado peptídico de la presente invención o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo como un principio activo abarca tanto las composiciones cosméticas como farmacéuticas de acuerdo con el uso y los efectos deseados.

En la realización preferida, la presente invención se refiere a composiciones cosméticas y farmacéuticas para la mejora de las arrugas y la inhibición del envejecimiento cutáneo, incluyendo el derivado peptídico de la presente invención o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Cuando se utiliza en forma de las composiciones cosméticas y farmacéuticas para la mejora de las arrugas y la inhibición de envejecimiento cutáneo, la composición puede aplicarse a la piel, el cuero cabelludo o el cabello y puede utilizarse con el fin de prevenir el envejecimiento cutáneo y mejorar las arrugas y la piel áspera.

El contenido del derivado peptídico en la composición para la mejora de las arrugas y la inhibición del envejecimiento cutáneo de la presente invención puede controlarse adecuadamente de acuerdo con el uso de la composición, el tipo de aplicación, la finalidad de uso y los efectos deseados y es preferentemente del 0,0001 al 99 % en peso, preferentemente del 0,001 al 50 % en peso, más preferentemente del 0,001 al 1 % en peso y lo más preferentemente del 0,005 al 0,1 % en peso, basado en el peso total de la composición, en vista del coste frente al efecto.

La composición para la mejora de las arrugas y la prevención del envejecimiento cutáneo de la presente invención pueden administrarse a través de las vías oral o parenteral, por ejemplo, por vía oral, percutánea, subcutánea o intravenosa, preferentemente a través de una vía percutánea para la administración parenteral y más preferentemente a través de la aplicación tópica.

La composición puede aplicarse por la vía percutánea a la piel, el cuero cabelludo o el cabello y lo que significa que es una composición que puede utilizarse en la producción de todos los productos cosméticos tales como los cosméticos fundamentales, cremas para el busto y la cadera, productos de maquillaje, productos de cuidado corporal, productos para el afeitado, productos para el cuidado capilar, etc. La composición puede formularse en forma de una pomada, spray, suspensión, emulsión, crema, gel, espuma, etc., pero no existe ninguna limitación particular en su formulación.

Preferentemente, la composición cosmética puede tener una formulación seleccionada entre el grupo que consiste en un suavizante de la piel, loción astringente, loción nutritiva, crema nutritiva, crema de masaje, crema para los ojos, esencia para los ojos, esencia, crema limpiadora, loción limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, polvos compactos, polvos, loción corporal, crema corporal, esencia corporal, gel de baño, crema de protección solar, tinte capilar, champú, enjuague, pasta de dientes, refrescante bucal, acondicionador capilar, tónico capilar, loción, pomada, gel, crema, parche y aerosol.

Las composiciones cosméticas y farmacéuticas de la presente invención pueden incluir adicionalmente todo tipo de ingredientes que pueden utilizarse en la producción o la formulación típicas, por ejemplo, una fragancia, un agente colorante, un agente bactericida, un antioxidante, un conservante, un humectante, un agente espesante, un excipiente, un diluyente, un mineral, un polímero sintético, etc., además de los ingredientes eficaces anteriores y el tipo y el contenido pueden ajustarse adecuadamente de acuerdo con el uso del producto final y el propósito de uso.

La composición de la presente invención puede incluir además un disolvente que puede incluirse normalmente en la formulación, por ejemplo, uno o más seleccionados entre etanol, glicerina, butilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, 1,2,4-butanotriol, éster de sorbitol, 1,2,6-hexanotriol, alcohol bencílico, isopropanol, butanodiol, éter monoetilílico de dietilenglicol, isosorbida de dimetilo, N-metil-2-pirrolidona, carbonato de propileno, glicereth-26, metil gluceth-20, isocetilmiristato, isocetiloctanoato, miristato de octildodecilo, octildodecanol, isoestearato de isoestearilo, octanoato de cetilo y dicaprato de neopentilglicol. Cuando se prepara la composición de la presente invención utilizando estos disolventes, la solubilidad del compuesto en el disolvente varía ligeramente, dependiendo del compuesto particular y de la proporción de mezcla de los disolventes. Sin embargo, aquellos expertos en la materia pueden seleccionar el disolvente particular y su contenido de adecuadamente dependiendo de las características del producto.

Además, la composición de la presente invención puede incluir diversos materiales para potenciar la penetración percutánea tras la administración percutánea, por ejemplo, derivados de laurocaprama, ácido oleico, derivados de éster de derivado de monooleato, adapaleno, tretinoína, retinaldehído, tazaroteno, ácido salicílico, ácido azelaico, ácido glicólico, etoxidiglicol, Tween 80, organogel de lecitina, etc. Con el fin de proporcionar funciones adicionales, la composición de la presente invención puede incluir además otros ingredientes tales como un cotensioactivo, un tensioactivo, un agente anticasca, un ablandador de callos, un estimulante del flujo sanguíneo, un activador celular,

un agente refrescante, un agente humectante, un antioxidante, un ajustador de pH, agua purificada, etc., dentro del alcance de no afectar el efecto hidratante de la composición. La composición también puede incluir un aditivo adecuado tal como una fragancia, un color, un conservante, un excipiente, etc., dependiendo de la forma aplicada.

## 5 Modo para la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los Ejemplos.

### Ejemplo 1. Preparación del derivado peptídico

10 En la presente invención, los derivados peptídicos se prepararon mediante la síntesis de péptidos en fase sólida estándar utilizando Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) como un grupo protector de aminoácido N $\alpha$  y el ejemplo específico de los mismos es como se indica a continuación.

15 En primer lugar, la cantidad de resina de amina (1,1 $^{\circ}$ mmol/g, Novabiochem Corporation) que corresponde a 1 $^{\circ}$ mmol se pesó y se puso en un recipiente de reacción y después se añadieron 30 ml de MC para hinchar la resina durante 10 minutos. El disolvente se eliminó a presión reducida y se añadieron Fmoc-lisina (4 eq.) en disolvente DMF y una mezcla de DIC (2 eq.; diisopropilcarbodiimida) y DMAP (0,1 eq.; 4-dimetilaminopiridina) al recipiente y se hizo reaccionar durante 4 horas. Después, la solución de aminoácido cargada en la resina de amina se eliminó a presión  
20 reducida y la resina se lavó con cada uno: 30 ml de DMF y MC 5 veces. La resina cargada con Fmoc-lisina se hizo reaccionar con piperidina al 20 % (v/v %) en solución de DMF durante 10 minutos para la desprotección y después se lavó con cada uno: 30 ml de DMF y MC 5 veces. Después, los péptidos Fmoc y la biotina disueltos en el disolvente DMF (úsense Fmoc-D-fenilalanina, Fmoc-triptófano, Fmoc-alanina, Fmoc-D-triptófano, Fmoc-histidina y biotina en este orden) (cada uno 4 eq.), DIC (4 eq; diisopropilcarbodiimida) y HOBt (4 eq; N-hidroxibenzotriazol) como un reactivo de acoplamiento se añadieron a la resina Fmoc-desprotegida y se hicieron reaccionar a  
25 temperatura ambiente durante 4 horas para inducir reacciones de acoplamiento de aminoácidos. Después de las reacciones de acoplamiento de aminoácidos, se añadieron 2-3 gotas de solución de ensayo de Kaiser A, B, C [solución A: ninhidrina (5 g) en etanol (100 ml), solución B: fenol (80 g) en etanol (20 ml), solución C: KCN 0,1 M (2 ml) en piridina (98 ml)] a una pequeña cantidad de la resina lavada y se mantuvieron a 100  $^{\circ}$ C para observar los cambios de color de la resina durante 10 minutos. Ningún cambio de color en la resina indica que la reacción de acoplamiento se realiza correctamente y por tanto se continuó a la siguiente reacción. Un color azul de la resina indica la presencia de aminoácidos que no han reaccionado y por tanto las reacciones de acoplamiento de aminoácidos deben repetirse.

35 Los péptidos sintetizados mediante los procedimientos anteriores se retiraron de la resina. Con el fin de desproteger los grupos protectores de las cadenas laterales de aminoácidos se añadió una mezcla que consiste en TFA (ácido trifluoroacético), TIS (triisopropilsilano), tioanisol, H $_2$ O y EDT (etanoditiol) en una proporción de 90:2,5:2,5:2,5:2,5 para producir la precipitación de sólidos. Los precipitados resultantes se centrifugaron para eliminar el TFA, el TIS, el tioanisol, el H $_2$ O y el EDT restantes y este procedimiento se repitió tres o más veces a fin de obtener péptidos de hexapéptido-2 conjugado con biotina sólidos.  
40

Para el análisis del péptido hexapéptido-2 conjugado con biotina, se realizaron RP-HPLC y CL-EM.

45 En la RP-HPLC, el tampón A era agua que contenía TFA al 0,1 % y el tampón B era acetonitrilo que contenía TFA al 0,1 % y el análisis se realizó con un gradiente de concentraciones del 5 % al 65 % de tampón B durante 30 minutos. Como resultado, el Tr fue de aproximadamente 25,808 minutos.

En la CL-EM, el valor predicho era 1099,3 Da y el valor experimental fue de 1099.1 Da.

### 50 Ejemplo 2. Ensayo de citotoxicidad del derivado peptídico hexapéptido-2 conjugado con biotina

Con el fin de examinar la citotoxicidad del péptido hexapéptido-2 péptido conjugado con biotina sintetizado en el Ejemplo 1, se realizó el siguiente experimento. La citotoxicidad se examinó mediante el ensayo de MTT, y un grupo de control sin muestra añadida se consideró como el 100 % para calcular la citotoxicidad relativa. El método experimental detallado es como se indica a continuación.  
55

Los fibroblastos humanos normales (fibroblastos dérmicos humanos neonatales) se sembraron en una placa para cultivo celular de 96 pocillos a una densidad de 3.000 células por pocillo y se cultivaron en DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco, Gibco BRL) que contenía FBS al 10 % (suero fetal bovino) en una incubadora a 37  $^{\circ}$ C, CO $_2$  al 5 % durante 24 horas. Cada material de ensayo se disolvió en agua a una concentración de 10 $^{\circ}$ mM para preparar los concentrados y los concentrados se diluyeron con DMEM que contenía FBS al 0,5 % a una concentración de 200  $\mu$ M, 20  $\mu$ M y 2  $\mu$ M. Después, se añadieron 100  $\mu$ l de cada una de las soluciones diluidas a cada pocillo que contenía previamente 100  $\mu$ l del medio, seguido de incubación durante 48 horas. Después de completar el cultivo, se utilizaron los sobrenadantes para determinar la cantidad de colágeno de tipo 1 producida  
65 (Ejemplo 3) y las células se utilizaron para determinar la citotoxicidad.

5 En el ensayo de MTT para determinar la citotoxicidad, se añadieron 90 ul de DMEM que contenía FBS al 10 % a cada uno de los pocillos de los que se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 10 ul de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) disueltos en PBS a una concentración de 5 mg/ml, seguido de incubación en las condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante 3 horas. Después de eso, el sobrenadante se retiró cuidadosamente y los precipitados de formazán de MTT de las células se disolvieron en 100 ul de DMSO para determinar la absorbancia a OD570 utilizando un lector de ELISA.

10 Los resultados se muestran en la FIG. 1. Como se muestra en la FIG. 1, el hexapéptido-2 conjugado con biotina de la presente invención no mostró citotoxicidad, como en el tratamiento con hexapéptido-2 y biotina solos o en combinación

**Ejemplo 3. Medición de la capacidad de promoción de biosíntesis de colágeno de tipo 1 del derivado peptídico hexapéptido-2 conjugado con biotina**

15 Con el fin de examinar la capacidad de promoción de biosíntesis de colágeno de tipo 1 del péptido hexapéptido-2 conjugado con biotina sintetizado en el Ejemplo 1, se realizó el siguiente experimento. El colágeno de tipo 1 producido se midió mediante el ensayo ELISA para examinar el efecto de promover la biosíntesis de colágeno y un grupo de control sin muestra añadida se consideró como el 100 % para calcular la capacidad de producción de colágeno de tipo 1 relativa. El método experimental detallado es como se indica a continuación.

20 En primer lugar, una placa de 96 pocillos se recubrió con anticuerpos contra el colágeno de tipo 1 y se bloqueó completamente utilizando un tampón de bloqueo. Después de eso, los sobrenadantes del cultivo de fibroblastos descritos en el Ejemplo 2 se trasladaron a la placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpos de colágeno de tipo 1 y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de completar la reacción, se eliminaron los sobrenadantes y la placa se lavó con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (PBST), y se trasladaron los anticuerpos secundarios conjugados con biotina a la placa de 96 pocillos, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de completar la reacción, los sobrenadantes restantes se retiraron de la misma manera que anteriormente. Después de lavar con PBST, se ligó SA-HRP (peroxidasa de rábano-estreptavidina, Sigma) para medir el colágeno ligado. Después de tratar con TMB (3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma) como sustrato para el desarrollo del color, la reacción se realizó a temperatura ambiente durante 15 minutos, mientras se bloqueaba la luz. La reacción se detuvo utilizando ácido clorhídrico 2 N y la absorbancia se midió a 450 nm. Para la comparación de los efectos, la biosíntesis de colágeno de tipo 1 se midió en un tratamiento con hexapéptido-2 solo, en un tratamiento con biotina sola y en un tratamiento de combinación con una mezcla de hexapéptido-2 y biotina.

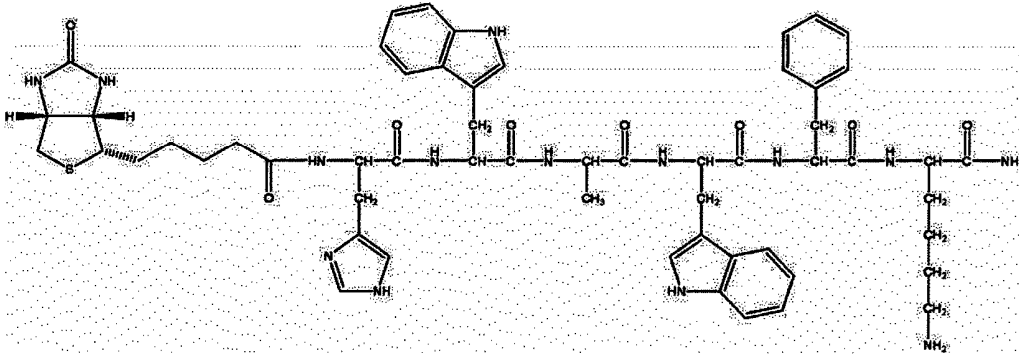
35 Los resultados se muestran en la FIG. 2. Como se muestra en la FIG. 2, el tratamiento con hexapéptido-2 y biotina solos o en combinación no mostró ningún aumento de la biosíntesis de colágeno de tipo 1, pero el hexapéptido-2 conjugado con biotina mostró un aumento significativo de la biosíntesis de colágeno de tipo 1.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado peptídico que tiene una estructura de la siguiente Fórmula Química 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

5

[Fórmula Química 1]



2. Una composición cosmética para la mejora de las arrugas y la prevención del envejecimiento cutáneo, que comprende el derivado peptídico o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 1.

10

3. La composición cosmética de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la composición cosmética tiene una función de promoción de la biosíntesis de colágeno.

4. La composición cosmética de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la composición cosmética tiene una formulación seleccionada entre el grupo que consiste en suavizante de la piel, loción astringente, loción nutritiva, crema nutritiva, crema de masaje, crema para los ojos, esencia para los ojos, esencia, crema limpiadora, loción limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, polvos compactos, polvos, loción corporal, crema corporal, esencia corporal, gel de baño, crema de protección solar, tinte capilar, champú, enjuague, pasta de dientes, refrescante bucal, acondicionador capilar, tónico capilar, loción, pomada, gel, crema, parche y aerosol.

20

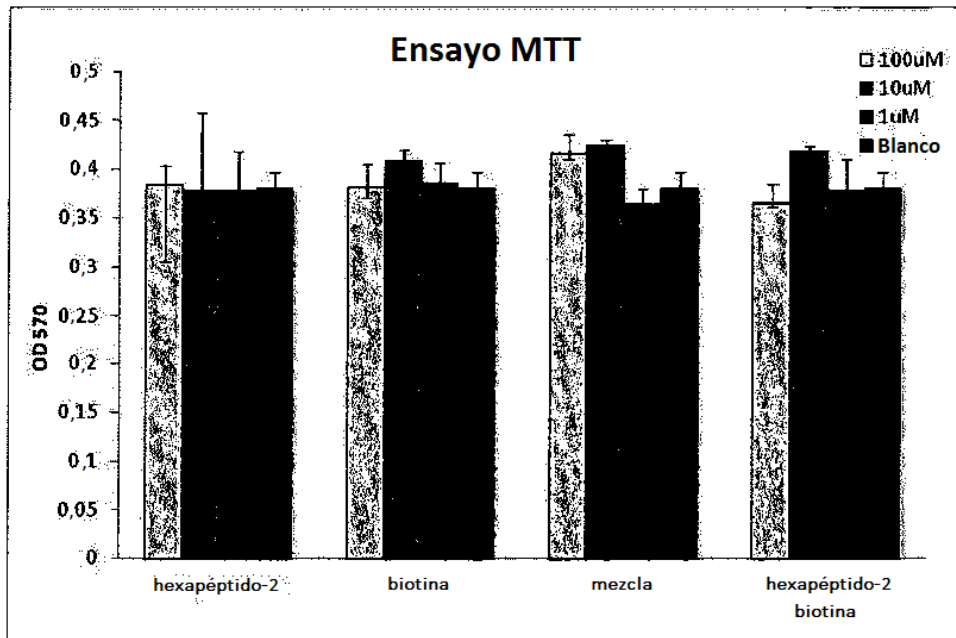
5. Una composición farmacéutica para la mejora de las arrugas y la prevención del envejecimiento cutáneo, que comprende el derivado peptídico o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 1.

6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la composición farmacéutica tiene una función de promoción de la biosíntesis de colágeno.

25



[FIG. 1]



[FIG. 2]

