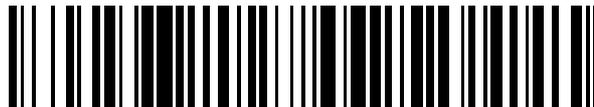


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 814**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61Q 7/00 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2012 PCT/KR2012/003641**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13018977**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2012 E 12820407 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2740740**

54 Título: **Péptido derivado del ligando de EDAR y sus usos**

30 Prioridad:

04.08.2011 KR 20110077569

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

03.05.2017

73 Titular/es:

**CAREGEN CO., LTD. (100.0%)
690-3 Geumjeong-dong Gunpo-si
Gyeonggi-do 435-050, KR**

72 Inventor/es:

**CHUNG, YONG JI y
KIM, EUN MI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 610 814 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 derivado del ligando de EDAR y sus usos

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

- 5 La presente invención se refiere a un péptido novedoso derivado de EDAR (receptor de EDA) y su uso.

Descripción de la técnica relacionada

10 El folículo piloso es un órgano de la piel peculiar de los mamíferos, el cual se desarrolla desde el fondo de la epidermis primitiva hacia el interior de una capa de la piel muy interna. El grupo de células conocidas como papila dérmica o folículo está en la base del folículo piloso (Stenn y Paus, *Physiol. Rev.*, 81: 449 (2002)) y la papila es esencial para la circulación normal del folículo piloso (Oliver, *Embryol. Exp. Morph.* 15: 331 (1966); Oliver, *Embryol. Exp. Morph.* 16: 231 (1967)) y el crecimiento del tallo del pelo. El tallo del pelo es un conjunto de células epiteliales con forma de hilo que están compuestas de filamentos queratinosos y proteínas para la agregación de los filamentos estrechamente unidas a ellos.

15 El cabello humano sigue un ciclo de crecimiento con tres fases diferentes: fases anágena, catágena y telógena. El ciclo de crecimiento del cabello está regulado por hormonas o muchos factores de crecimiento. La malnutrición o estrés grave pueden hacer avanzar las fases catágena y telógena, lo que conlleva una pérdida grave del cabello (alopecia) (Arck, *American Journal of Pathology*, 162 (3): 709-712 (2003)). En la calvicie masculina, los folículos pilosos en la parte frontal y superior del cuero cabelludo son sensibles al andrógeno, el cual provoca la miniaturización de los folículos, y de esta manera da como resultado la pérdida del cabello. Resumiendo, una secreción excesiva de andrógeno activa la 5- α reductasa que hace que la testosterona se convierta en dihidrotestosterona (DHT). Posteriormente, la DHT reduce el número de cabellos terminales oscuros gruesos acortando un periodo de crecimiento del cabello y miniaturizando los folículos pilosos, lo que conlleva la pérdida del cabello. Se ha supuesto que aproximadamente un 20% de las mujeres con pérdida de cabello padecen unos pocos trastornos denominados calvicie femenina en los que a menudo el cabello se vuelve más delgado en la parte superior del cuero cabelludo. Además, la pérdida del cabello se vuelve más amplia con el envejecimiento. Por ejemplo, la pérdida grave de cabello puede estar provocada por diferentes trastornos tales como la alopecia cicatricial o estados cicatriciales que incluyen las quemaduras o la lesión por compresión. Sea cual sea la causa, aunque la presencia de mujeres en la mano de obra ha aumentado y los hombres se han preocupado por su aspecto, la pérdida de cabello puede tener impactos psicológicos, sociales y sexuales notables, así como también una pérdida de amor propio y orgullo. Aunque se han utilizado diversos medicamentos para tratar la pérdida de cabello, estos son demasiado caros o provocan efectos adversos muy diferentes entre los individuos. Además, es necesario tomar estos fármacos de manera constante. En este sentido, uno de los inconvenientes importantes es que la pérdida de cabello puede estar causada por el cese de su uso. A la vez, otra desventaja es que sus eficacias y efectos secundarios pueden ser bastante diferentes entre los individuos.

- 35 Por lo tanto, en este campo industrial se necesita desarrollar un principio activo novedoso más barato y más eficaz.

Las materias primas utilizadas en los productos cosméticos tienen la ventaja de ser baratas, si bien no proporcionan buenos resultados ya que están compuestas por componentes derivados de extractos vegetales. Hasta la fecha se sabe que dos fármacos comerciales (minoxidil y finasterida) pueden retrasar únicamente una pérdida del cabello adicional. Sin embargo, no se dispone de medicamentos concretos que pueden ser útiles para inducir la regeneración de nuevos folículos pilosos en la práctica. Muchos productos cosméticos para el cuero cabelludo para prevenir la pérdida de cabello han estado comercializados en el mercado e incluyen, por ejemplo: el desarrollo de (a) un producto que incluye un extracto vegetal derivado de *Sophora*, pimiento picante, hierba de *Swertia*, *Morus alba*, hoja de morera, ginseng, regaliz, peonía, *Digitalis*, hinojo, *Cornus officinalis*, ajo y así sucesivamente; (b) una composición que contiene xantinas y hormonas de crecimiento no tan sólo para mejorar el metabolismo celular suprimido por un exceso de dihidrotestosterona (DHT) sino también para facilitar el crecimiento del cabello mediante la inhibición de la pérdida del cabello y la regeneración del cabello inducidas por las hormonas del crecimiento; (c) un producto que contiene minerales, vitaminas y extractos de té verde, romero, plantas del género *Artemisia* (*mugwort*) o regaliz, que suministra nutrientes al cuero cabelludo y el cabello para prevenir la pérdida de cabello y estimular el crecimiento del cabello; y (d) se ha desarrollado un producto para la calvicie masculina que mezcla sustancias tales como la vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E, ácido nicotínico, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico, etc. con extractos vegetales, el cual inhibe las 5- α reductasas para suprimir la producción de DHT durante el metabolismo androgénico y ayudar al metabolismo del cabello. Sin embargo, apenas tienen influencia sobre la producción de cabello nuevo. Como otro ejemplo, un grupo de investigación de la Facultad de Medicina de la universidad Jikei de Tokio, Japón, ha desarrollado el producto utilizando ácido corosólico del que se sabe que es eficaz en la diabetes, el cual inhibe las 5- α reductasas y muestra un efecto excelente sobre el crecimiento del cabello.

Muchos factores están asociados entre sí en el crecimiento y la degeneración del cabello. Para la producción del cabello, los presentes investigadores han estudiado utilizar la eficacia para: (a) estimular la proliferación de fibroblastos que son de suma importancia para la producción de la raíz del cabello; y (b) estimular la expresión de factores que son importantes para inducir la formación del folículo piloso y la diferenciación del cabello.

- 5 Existe constancia de que EDA (ectodisplasina), que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), participa en el desarrollo de varios órganos ectodérmicos tales como el cabello, los dientes y las glándulas sudoríparas. Un defecto de EDA es una causa de displasia ectodérmica hipohidrótica ligada al cromosoma X. Entre las isoformas de EDA, EDA1 es la más importante para el desarrollo ectodérmico y ejerce su función uniéndose al receptor específico de EDAR. Después de la unión de EDA1 a EDAR, EDARADD (domino de la muerte asociado con EDAR) y NEMO (NF-κB, modulador esencial) se activan y NF-κB se transloca al interior del núcleo con la degradación de IκB, el inhibidor de NF-κB. El NF-κB translocado potencia en el núcleo la expresión de genes capaces de estimular la formación de folículos pilosos tales como CTGF/CCN2 y Shh (homólogo de Sonic Hedgehog).

Descripción detallada de esta invención

- 15 Para desarrollar péptidos que tienen acciones idénticas al EDA1 de origen natural y que también tienen una actividad, estabilidad y penetración en la piel mejoradas en comparación con la proteína EDA1 de origen natural, los presentes inventores han realizado estudios intensivos. Como resultado, los presentes inventores han preparado dos tipos de péptidos relacionados con EDA1 que tienen excelentes características descritas anteriormente basándose en la secuencia de aminoácidos de la proteína EDA1 de origen natural, y finalmente han logrado la presente invención.

En consecuencia, es un objeto de esta invención proporcionar un péptido constituido esencialmente por una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO: 2.

- 25 Es otro objeto de esta divulgación proporcionar una composición para estimular el crecimiento del cabello o mejorar la producción del cabello que contiene el péptido de esta invención mencionado anteriormente como principio activo.

Es otro objeto más de esta divulgación proporcionar una composición para mejorar las condiciones de la piel que contiene el péptido de esta invención mencionado anteriormente como principio activo.

- 30 Es otro objeto adicional más de esta divulgación proporcionar una composición para mejorar o tratar un trastorno relacionado con la ruta de la transducción de señales de EDA1 (ectodisplasina A1) que contiene el péptido de esta invención mencionado anteriormente como principio activo.

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

- 35 En un aspecto de esta invención, se proporciona un péptido constituido esencialmente por una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO: 2.

- 40 Para desarrollar péptidos que tienen acciones idénticas a la EDA1 de origen natural y que también tienen una actividad, estabilidad y penetración en la piel mejoradas en comparación con la proteína EDA1 de origen natural, los presentes inventores han realizado estudios intensivos. Como resultado, los presentes inventores han preparado dos tipos de péptidos relacionados con EDA1 que tienen excelentes características descritas anteriormente basándose en la secuencia de aminoácidos de la proteína EDA1 de origen natural y la secuencia de aminoácidos del ligando que se une al receptor de la proteína EDA1, y finalmente han logrado la presente invención.

- 45 El péptido de la presente invención está constituido esencialmente por la secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO: 2. El término "péptido" utilizado en la presente se refiere a una molécula lineal formada por la unión entre residuos de aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

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

- 50 El péptido EDA 3 de la presente divulgación se puede preparar principalmente prediciendo una porción capaz de unirse a una proteína receptora mediante la síntesis parcial aleatoria de varias porciones de la proteína EDA1 y a continuación, optimizando una secuencia de aminoácidos de la porción predicha. Posteriormente, los péptidos candidato que tienen la actividad más sobresaliente se criban para aislar el péptido de la SEQ ID NO:1 de esta invención.

- 5 El otro péptido de EDphD1 de la presente divulgación se puede preparar principalmente estudiando las secuencias de aminoácidos capaces de unirse de manera específica al receptor de la proteína EDA1 (EDAR) mediante técnicas de presentación en fagos y a continuación, seleccionando una secuencia de aminoácidos óptima como el péptido candidato. Posteriormente, los péptidos candidato que tienen la actividad más sobresaliente se criban para aislar el péptido de la SEQ ID NO:2 de esta invención.
- Los péptidos de la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 no únicamente tienen acciones similares a la proteína EDA1 de origen natural, sino que también muestran actividades de factor de crecimiento mediante la unión a un receptor.
- Los péptidos de esta invención tienen *per se* una mayor estabilidad que la proteína EDA1 de origen natural y su modificación posibilita tener una estabilidad mucho mayor.
- 10 Preferentemente, los péptidos de esta invención tienen en su extremo N un grupo protector seleccionado a partir del grupo constituido por el grupo acetilo, el grupo fluorenilmetoxicarbonilo, el grupo formilo, el grupo palmitoilo, el grupo miristilo, el grupo estearilo y polietilenglicol (PEG).
- 15 Las modificaciones de los péptidos que se han descrito anteriormente aumentan en gran medida la estabilidad de los péptidos de esta invención. El término "estabilidad" utilizado en la presente se refiere a la estabilidad *in vivo* y también a la estabilidad en el almacenamiento (p. ej., estabilidad en el almacenamiento a temperatura ambiente). El grupo protector descrito anteriormente protege los péptidos del ataque de una proteasa *in vivo*.
- En otro aspecto de esta divulgación, se proporciona una composición para estimular el crecimiento del cabello o mejorar la producción del cabello, que contiene el péptido de esta invención mencionado anteriormente como principio activo.
- 20 En otro aspecto más de esta divulgación, se proporciona un método para estimular el crecimiento del cabello o mejorar la producción del cabello que comprende administrar a un sujeto el péptido de esta invención.
- En otro aspecto adicional más de esta invención, se proporciona un uso del péptido de esta invención para la elaboración de un medicamento para estimular el crecimiento del cabello y mejorar la producción del cabello.
- 25 Ya que la presente composición comprende péptidos de esta invención relacionados con EDA1 como principios activos descritos anteriormente, las descripciones comunes entre ellos se omiten con el fin de evitar una repetición innecesaria que lleve a la complejidad de esta memoria descriptiva.
- 30 Como se demuestra en los Ejemplos más adelante, los péptidos relacionados con EDA1 de la presente derivados de la proteína EDA humana tienen una actividad estimuladora de la proliferación celular en los fibroblastos. Además, al facilitar la señalización EDA1-EDAR como una ruta de señales representativa, se ha observado la degradación de IκB, que es un inhibidor de NF-κB, mediante la fosforilación y translocación de NF-κB al interior del núcleo después de la activación de EDARADD y NEMO. Además, el NF-κB translocado potencia la expresión de moléculas y proteínas posteriores que tienen una actividad estimuladora de la formación de folículos pilosos tales como la proteína Shh (homólogos de Sonic hedgehog). De acuerdo con experimentos en animales basados en los resultados mencionados anteriormente, se pudo apreciar que el péptido de la presente invención promueve significativamente el crecimiento del cabello. Por lo tanto, la composición de la presente invención tiene efectos excelentes en el crecimiento del cabello y en mejoras en las condiciones de la piel.
- 35 En otro aspecto más de esta divulgación, se proporciona una composición para mejorar las condiciones de la piel que contiene el péptido de esta invención como principio activo.
- 40 En otro aspecto adicional más de esta divulgación, se proporciona un método para mejorar las condiciones de la piel que comprende administrar a un sujeto el péptido de esta invención.
- En otro aspecto adicional más de esta invención, se proporciona un uso del péptido de esta invención para la elaboración de un medicamento para mejorar las condiciones de la piel.
- 45 De acuerdo con una realización preferible, la mejora en las condiciones de la piel por parte del presente péptido es una mejora en la elasticidad de la piel o las arrugas, prevención del envejecimiento la piel, mejora de la hidratación de la piel, eliminación de heridas o regeneración de la piel.
- En otro aspecto más de esta divulgación, se proporciona una composición para prevenir o tratar un trastorno relacionado con la ruta de transducción de señales de EDA1 (ectodisplasina A1) que contiene el péptido de esta invención como principio activo.
- 50 En otro aspecto adicional más de esta divulgación, se proporciona un método para prevenir o tratar un trastorno relacionado con la ruta de transducción de señales de EDA1 (ectodisplasina A1) que comprende administrar a un sujeto el péptido de esta invención.

En otro aspecto adicional más de esta invención, se proporciona un uso del péptido de esta invención para la elaboración de un medicamento para prevenir o tratar un trastorno relacionado con la ruta de transducción de señales de EDA1 (ectodisplasina A1).

5 De acuerdo con una realización preferible, el trastorno relacionado con la ruta de transducción de señales de EDA1 (ectodisplasina A1) incluye un trastorno óseo, osteoporosis u obesidad.

De acuerdo con la divulgación, la composición es una composición farmacéutica que contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido de la presente invención que tiene la actividad de la proteína EDA; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

10 La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" utilizado en la presente se refiere a una cantidad suficiente para mostrar y conseguir eficacias y actividades del péptido de esta invención relacionado con EDA1.

15 El portador farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente divulgación, que se utiliza comúnmente en las formulaciones farmacéuticas incluye, sin carácter limitante, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica, 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 divulgación puede incluir además un lubricante, un humectante, un edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión y un conservante. Se pueden consultar detalles de los portadores y formulaciones farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (19.^a ed., 1995).

20 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación se puede administrar por vía oral o parenteral y, preferentemente se administra por vía parenteral, p. ej., mediante administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, local o transdérmica.

25 Una cantidad posológica adecuada de la composición farmacéutica de la presente divulgación puede variar dependiendo de los métodos de la formulación farmacéutica, los métodos de administración, la edad, peso corporal, sexo, estado patógeno y dieta del paciente, momento de administración, vía de administración, tasa de eliminación y sensibilidad para una composición farmacéutica utilizada. Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente divulgación se puede administrar con una dosificación diaria de 0.001-1000 mg/kg.

30 De acuerdo con las técnicas tradicionales conocidas por los expertos en la técnica, la composición farmacéutica de acuerdo en la presente divulgación se puede formular con portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable como se ha descrito anteriormente, y proporcionar finalmente varias formas una forma de dosis unitaria y una forma multidosis. Los ejemplos no limitantes de las formulaciones incluyen, sin carácter limitante, una solución, una suspensión o una emulsión en medio acuoso u oleoso, un extracto, un elixir, un polvo, un gránulo, un comprimido y una cápsula y pueden comprender además un agente de dispersión o un estabilizante.

35 De acuerdo con la divulgación, la composición es una composición cosmética que contiene: (a) una cantidad cosméticamente eficaz del péptido de la presente invención relacionado con EDA1; y (b) un portador cosméticamente aceptable.

La expresión "cantidad cosméticamente eficaz" utilizada en la presente se refiere a una cantidad suficiente para conseguir eficacias en las mejoras de las condiciones de la piel descritas anteriormente en la presente.

40 Las composiciones cosméticas de esta divulgación se pueden formular en una amplia variedad de formas, por ejemplo, que incluyen, una solución, una suspensión, una emulsión, una pasta, un ungüento, un gel, una crema, una loción, un polvo, un jabón, un producto de limpieza que contiene un surfactante, un aceite, una base de maquillaje en emulsión, una base de maquillaje en cera y un aerosol. Específicamente, las composiciones cosméticas de esta divulgación se pueden formular en forma de un suavizante para la piel, líquido nutriente, crema nutriente, crema para masaje, esencia, crema para los ojos, crema de limpieza, espuma de limpieza, agua de limpieza, paquete, aerosol o polvo.

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

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

La formulación de la solución y emulsión pueden incluir un 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 ácidos grasos y sorbitán.

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

- 5 La formulación de las composiciones de limpieza con un surfactante puede contener sulfato de alcohol alifático, éter sulfato de alcohol alifático, monoéster de sulfosuccinato, isotinato, derivados de imidazolío, taurato de metilo, sarcocinato, éter sulfato de amida de ácido graso, alquilamidobetaina, alcohol alifático, glicérido de ácido graso, dietanolamida de ácido graso, aceite vegetal, derivados de lanolina, éster de ácido graso y glicerol etoxilado o mezclas de estos ingredientes.
- 10 Además, las composiciones cosméticas de esta divulgación pueden contener auxiliares, así como también péptidos como principios activos y portadores. Los ejemplos no limitantes de auxiliares incluyen conservantes, antioxidantes, estabilizantes, solubilizantes, vitaminas, colorantes, agentes para mejorar el olor o mezclas de estas sustancias.

Las características y ventajas de la presente invención se resumirán de la siguiente manera:

- 15 (i) péptido EDA3 derivado de EDA y péptido EDphD1 derivado del ligando de EDAR de la presente invención poseen actividades idénticas o similares a EDA de origen natural;
- (ii) los péptidos de la presente invención tienen una estabilidad y una potencia de penetración en la piel mucho mayor que EDA de origen natural;
- 20 (iii) por lo tanto, la composición que contiene el presente péptido no solamente muestra excelentes efectos en la mejora de la pérdida del cabello (por ejemplo, estimulación del crecimiento del cabello o producción de cabello) sino que también tiene eficacias superiores en el tratamiento de un trastorno relacionado con la ruta de transducción de señales de EDA1 (ectodisplasina A1); y
- (iv) la sobresaliente actividad y estabilidad del presente péptido descritas anteriormente pueden ser sumamente ventajosas en la aplicación a composiciones farmacéuticas, cuasifármacos y cosméticos.

Descripción breve de los dibujos

- 25 La Fig. 1 representa los resultados de un análisis por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) de los péptidos de la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 preparados en el Ejemplo de preparación.
- La Fig. 2a es un gráfico que representa un efecto estimulador en el crecimiento de los fibroblastos tratados con el péptido de la SEQ ID NO:1 preparado en el Ejemplo de preparación.
- 30 La Fig. 2b es un gráfico que representa un efecto estimulador en el crecimiento de fibroblastos tratados con el péptido de la SEQ ID NO:2 preparado en el Ejemplo de preparación.
- La Fig. 3a es un resultado de un análisis por inmunoelectrotransferencia que muestra la cantidad celular de proteína IκB que se ha reducido mediante la ubiquitinación que sigue a la fosforilación cuando se realiza un tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO:1 preparado en el Ejemplo de preparación.
- 35 La Fig. 3b es un resultado de un análisis por inmunoelectrotransferencia que muestra la cantidad celular de proteína IκB que se ha reducido mediante la ubiquitinación que sigue a la fosforilación cuando se realiza un tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO:2 preparado en el Ejemplo de preparación.
- La Fig. 4a es un resultado de un análisis por inmunoelectrotransferencia que muestra la translocación de NF-κB al interior del núcleo tras la activación cuando se realiza un tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO:1 preparado en el Ejemplo de preparación.
- 40 La Fig. 4b es un resultado de un análisis por inmunoelectrotransferencia que muestra la translocación de NF-κB al interior del núcleo tras la activación cuando se realiza un tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO:2 preparado en el Ejemplo de preparación.
- La Fig. 5a es un resultado de un análisis por RT-PCR que muestra que la expresión de las proteínas posteriores COX-2, IL-6, IL-1b se potencia de manera notable tras la activación de NF-κB cuando se realiza un tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO:1 preparado en el Ejemplo de preparación.
- 45 La Fig. 5b es un resultado de un análisis por RT-PCR que muestra que la expresión de las proteínas posteriores COX-2, IL-6, IL-1b se potencia de manera notable tras la activación de NF-κB cuando se realiza un tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO:2 preparado en el Ejemplo de preparación.

La Fig. 6a es un resultado de un análisis por inmunoelectrotransferencia que representa que la expresión de la proteína Shh, que participa en la formación del folículo piloso, se potencia de manera notable mediante el tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO:1 preparado en el Ejemplo de preparación.

5 La Fig. 6b es un resultado de un análisis por inmunoelectrotransferencia que representa que la expresión de la proteína Shh, que participa en la formación de folículos pilosos, se potencia de manera notable mediante el tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO:2 preparado en el Ejemplo de preparación.

La Fig. 7 es un gráfico que representa el efecto de estimulación del crecimiento celular en el folículo piloso del ratón mediante el tratamiento con los péptidos preparados en el Ejemplo de preparación.

La presente invención se describirá a continuación más detalladamente mediante los ejemplos.

10 Ejemplos

Ejemplo de preparación 1: Síntesis de Asn-Met-Ser-Lys-His-Thr-Thr-Phe-Phe-Gly-Ala (SEQ ID NO:1)

Se introdujeron 700 mg de una resina de cloruro de clorotritilo (resina CTL, Nova Biochem N.º de cat. 01-64-0021) en un reactor, a los cuales se añadieron 10 mL de cloruro de metileno (CM) y después se agitó durante 3 min. Después de retirar la solución, se añadieron 10 mL de dimetilformamida (DMF) al resultante y a continuación, se agitó durante 3 min, tras lo cual se retiró el disolvente. Se añadieron 10 mL de una solución de diclorometano al reactor y a continuación, se añadieron 200 mmoles de Fmoc-Ala(pbf)-OH (Bachem, Suiza) y 400 mmoles de DIEA (*N,N'*-diisopropiletilamina) al reactor, tras lo cual la mezcla se disolvió mediante agitación y la reacción se llevó a cabo con agitación durante 1 h. Después de lavar, se hicieron reaccionar metanol y DIEA (2:1) en DCM (diclorometano) con la resina durante 10 min y a continuación, el resultante se lavó utilizando un exceso de DCM/DMF (1:1). Después de retirar la solución, se añadieron 10 mL de DMF al resultante, se agitó durante 3 min y después se retiró el disolvente. Se añadieron 10 mL de una solución de desprotección (piperidina/DMF al 20%) al reactor y se agitó durante 10 min a temperatura ambiente y después se retiró la solución. Después de añadir el mismo volumen de la solución de desprotección, la reacción se llevó a cabo durante 10 min, se retiró la solución y después se lavó secuencialmente con DMF (3 veces), CM (1 vez) y DMF (1 vez) para obtener las resinas Ala(pbf)-CTL. Se añadieron 10 mL de DMF a un nuevo reactor, a continuación se añadieron 200 mmoles de Fmoc-Gly-OH (Bachem, Suiza), 200 mmoles de HOBt y 200 mmoles de Bop y después se agitó para su solubilización. Se añadieron 400 mmoles de DIEA al reactor dos veces como una fracción y se agitó durante al menos 5 min para disolver todos los contenidos sólidos. La solución con los aminoácidos disueltos 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 retirada de la solución de reacción, el resultante se agitó tres veces (cada vez durante 5 min) con una solución de DMF para retirar los componentes residuales que no habían reaccionado. Se extrajo una pequeña cantidad de la resina que había reaccionado para evaluar el grado de las reacciones mediante la prueba de la ninhidrina. Utilizando la solución de desprotección, se realizó la desprotección dos veces de la misma manera que se ha descrito anteriormente para obtener la resina Gly-Ala(pbf)-CTL. Tras el lavado con DMF y CM, se llevó a cabo otra prueba de la ninhidrina y se realizaron las uniones secuenciales de los siguientes aminoácidos tal como se ha descrito anteriormente. Basándose en la secuencia de aminoácidos diseñada por los presentes inventores, se unieron secuencialmente Fmoc-Phe, Fmoc-Phe, Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-His(trt), Fmoc-Lys, Fmoc-Ser(tBu) y Fmoc-Asn a las resinas. El grupo protector Fmoc- se retiró mediante la incubación exhaustiva con la solución de desprotección dos veces durante 10 min. Para la acetilación, se incubaron anhídrido acético, DIEA y HOBt con las resinas peptídicas durante 1 h. Las resinas peptídicas preparadas se lavaron tres veces con DMF, CM y metanol, respectivamente, y se secaron gradualmente en una atmósfera de nitrógeno, tras lo cual se secó completamente al vacío con P₂O₅. Las resinas secas se hicieron reaccionar con 30 mL de una solución de salida [que contenía un 95% de ácido trifluoroacético (TFA), un 2.5% de agua destilada y un 2.5% de tioanisol] durante 2 h a temperatura ambiente con una agitación intermitente. La resina se filtró y se lavó con un volumen pequeño de una solución de TFA, tras lo cual el filtrado se combinó con las aguas madre. Tras la destilación a presión reducida para reducir el volumen total en dos, se indujo la precipitación utilizando 50 mL de éter frío y los precipitados formados se recogieron por centrifugación y después se lavaron dos veces con éter frío. Después de retirar las aguas madre, el resultante se secó completamente en una atmósfera de nitrógeno para obtener 0.85 g del péptido 1 impurificado, Asn-Met-Ser-Lys-His-Thr-Thr-Phe-Phe-Gly-Ala (tasa de rendimiento; 89.9%). Se determinó que el peso molecular del producto final era de 1240.4 (PM teórico: 1239.5) utilizando un analizador de masas. También se sintetizó el péptido 2 (Leu-Leu-Ala-Asp-Thr-Thr-His-His-Arg-Pro-Trp-Thr) mediante el proceso descrito anteriormente (tasa de rendimiento; 92.1%). Se determinó que el peso molecular del producto final era de 1446.5 (PM teórico: 1447.5) utilizando un analizador de masas.

Tabla 1

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos	Valores analizados (analizador de masas)	
		Valores analizados	Valores teóricos

1	NMSKHTTFFGA	1240.4	1239.5
2	LLADTTH H RPWT	1447.6	1446.5

Ejemplo experimental 1: Influencia de los péptidos en el crecimiento celular

Con el fin de evaluar si los tres péptidos preparados en el Ejemplo de preparación 1 tienen actividades similares al factor de crecimiento, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico con SRB (sulforodamina B; Sigma-Aldrich) utilizando queratinocitos HaCaT (Banco de Líneas Celulares de Corea) y fibroblastos NIH3T3 (Banco de Líneas Celulares de Corea) de acuerdo con el método de Rizzino *et al.* (Rizzino *et al.*, *Cancer Res.*, 48: 4266 (1988)).

Se cultivaron los queratinocitos HaCaT y los fibroblastos NIH3T3 en matraces de 250 mL que contenían EMEM (medio esencial mínimo de Eagle; Gibco, EE. UU.) complementado con un 10% de FBS (suero bovino fetal; Sigma). Las células cultivadas se trataron con una solución de tripsina al 1% para separar las células del fondo de los matraces de cultivo y se centrifugaron para recoger los sedimentos celulares. Después de resuspender las células en EMEM que no contenía FBS, se añadió su alícuota (3×10^3 células) a cada pocillo de las placas de 96 pocillos y se cultivaron con CO₂ al 5% durante 24 h a 37 °C. Después de un cultivo de 24 h, se cambió el medio por medio fresco sin suero y las células se incubaron con una muestra vacía (para su normalización) y péptidos sintetizados asépticamente disueltos en un 10% de agua destilada con las concentraciones respectivas de 1 µg/mL, 10 µg/mL y 50 µg/mL durante 72 h en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Después de retirar los sobrenadantes, las células se fijaron con etanol y a continuación se lavaron tres veces utilizando PBS (solución salina tamponada con fosfato), y después se incubaron con una solución de SRB. Las células se lavaron suficientemente con ácido acético al 1% y se observaron en el microscopio para determinar la condición de la célula viva. Además, se midió la absorbancia a 590 nm para analizar la viabilidad celular.

Las Figs. 2a y 2b demuestran, respectivamente, que los péptidos 1 y 2 de la presente invención incrementan de manera notable el crecimiento de los fibroblastos.

Ejemplo experimental 2: Influencia de los péptidos en la estimulación de la señal EDA1-EDAR

Los queratinocitos HaCaT se incubaron con los péptidos sintetizados en el Ejemplo de preparación 1 durante 20 min. La translocación de NF-κB al interior del núcleo mediante la fosforilación de IκB se examinó como señalización representativa de la proteína EDA. El efecto respectivo se midió mediante un análisis de inmunoelectrotransferencia utilizando un anticuerpo IκB y NF-κB (Santa Cruz, EE. UU.). Se confirmó el efecto de la degradación de IκB mediante la fosforilación y la ubiquitinación de una manera dependiente de la concentración de los péptidos tratados de esta invención (Figs. 3a y 3b). Además, también se observó la activación y translocación nuclear de NF-κB después de la degradación de IκB (Figs. 4a y 4b). Más aún, con el fin de probar el efecto causado por la translocación de NF-κB al interior del núcleo mediante el tratamiento con los péptidos, se midieron los niveles de expresión de IL-1b, IL-6 y COX-2, cuya expresión se sabe que está inducida por NF-κB, mediante RT-PCR utilizando los respectivos cebadores específicos. Los niveles de expresión de las proteínas mencionadas anteriormente de IL-1b, IL-6 y COX-2 aumentaron con la translocación de NF-κB al interior del núcleo, la cual está inducida por los tratamientos con los péptidos.

Las Figs. 3a y 3b muestran el efecto de la degradación de IκB mediante la fosforilación seguida por la ubiquitinación cuando se realiza un tratamiento con los péptidos de esta invención. Las Figs. 4a y 4b representan el efecto de estimulación de la translocación de NF-κB al interior del núcleo cuando se realiza un tratamiento con los péptidos de esta invención. Además, las Figs. 5a y 5b muestran que la expresión de las proteínas posteriores COX-2, IL-6, IL-1b se potencia de manera notable tras la activación de NF-κB cuando se realiza un tratamiento con los péptidos de esta invención.

Considerando conjuntamente los resultados de los Ejemplos experimentales 1 y 2 se podría apreciar que los péptidos de la presente invención ejercen efectos excelentes en la estimulación del crecimiento del cabello mediante la activación de la señal EDA1-EDAR.

Ejemplo experimental 3: Influencia de los péptidos en la expresión elevada de la proteína Shh estimuladora del folículo piloso

Para verificar si los péptidos sintetizados en el Ejemplo de preparación 1 potencian la expresión de la proteína Shh que es conocida como la molécula diana de EDA1 y para estimular el folículo piloso, se añadieron queratinocitos (3×10^5 células) a cada pocillo de las placas de 96 pocillos y se cultivaron con CO₂ al 5% durante 24 h a 37 °C. Después de un cultivo de 24 h, se cambió el medio por medio fresco sin suero y las células se trataron con una muestra vacía (para su normalización) y péptidos sintetizados asépticamente disueltos en agua destilada con la concentración de 10 µg/mL y se cultivaron durante 24 h en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Después de

eso, se recogió el cultivo celular y se midió el nivel de expresión de Shh mediante una inmunoelectrotransferencia utilizando el anticuerpo específico para la proteína Shh.

5 Tal como se demuestra en la Fig. 6a, el nivel de expresión de la proteína estimuladora del folículo piloso Shh se potencia de manera notable mediante el tratamiento con los péptidos de una manera dependiente de la concentración. Además, la Fig. 6b muestra que el nivel de expresión de la proteína Shh se potencia de manera notable mediante el tratamiento con los péptidos en los queratinocitos de una manera dependiente de la concentración.

10 Considerados conjuntamente, estos resultados demuestran que los péptidos de la presente invención ejercen un efecto estimulador de la producción del cabello induciendo la formación del folículo piloso, así como también estimulando el crecimiento del cabello mediante la transducción de señales EDA1-EDAR.

Ejemplo experimental 4: Análisis de los efectos de los péptidos en el crecimiento del cabello en ratones

15 Se observó el efecto de la proliferación celular tratando células del folículo piloso de ratones derivadas de ratones C57BL/6 con el péptido sintetizado en el Ejemplo de preparación 1. Se añadieron células recolectadas del folículo piloso a cada pocillo de las placas de 96 pocillos con una concentración de 3×10^5 células y se cultivaron con CO₂ al 5% durante 24 h a 37 °C. Después de un cultivo de 24 h, se cambió el medio por medio fresco sin suero y las células se incubaron con una muestra vacía (para su normalización) y péptidos sintetizados asépticamente disueltos en un 10% de agua destilada con las concentraciones respectivas de 10 µg/mL y 50 µg/mL durante 72 h en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Después de retirar los sobrenadantes, las células se fijaron con etanol y a continuación se lavaron tres veces utilizando PBS (solución salina tamponada con fosfato), y después se incubaron con una solución de SRB. Las células se lavaron suficientemente con ácido acético al 1% y se observaron en el microscopio para determinar la condición de la célula viva. Además, se midió la absorbancia a 590 nm para analizar la viabilidad celular (Fig. 7).

25 La Fig. 7 muestra un gráfico que representa el efecto de estimulación del crecimiento celular en folículos pilosos de ratones mediante el tratamiento con los péptidos. Cuando se realizó un tratamiento con 50 µg/mL del péptido, se observó un incremento significativo relativo del crecimiento celular en los folículos pilosos de los ratones en comparación con el control.

Ejemplo 1: Preparación de nanopéptidos

30 Se disolvieron respectivamente 50 mg de dos péptidos sintetizados en el Ejemplo de preparación en 500 mL de agua destilada mediante una agitación suficiente. La solución peptídica 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 a presión elevada para su emulsificación, para proporcionar de esta manera nanosomas que tenían un tamaño de aproximadamente 100 nm. Se prepararon los nanosomas para que tuvieran una concentración final de aproximadamente 50 ppm y se utilizaron como ingredientes para cosméticos.

35 Ejemplo de formulación 1: Suavizante para la piel

Se formuló un suavizante para la piel que comprendía los nanosomas que contenían el péptido preparados en el Ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

Tabla 2

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	2.5
1,3-butilenglicol	6.0
Glicerina	4.0
PEG 1500	1.0
Hialuronato de sodio	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 nutriente

Se formuló una crema nutriente que comprendía los nanosomas que contenían el péptido preparados en el Ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

5

Tabla 3

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	2.5
<i>Aceite de Limnanthes alba</i>	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
Sesquiolato de sorbitán	2.5
Escualeno	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 nutriente

Se formuló un líquido nutriente que comprendía los nanosomas que contenían el péptido preparados en el Ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

10

Tabla 4

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	2.5

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
Escualeno	3.0
Aceite de nuez de macadamia	2.0
Polisorbato 60	1.5
Sesquiolato de sorbitán	0.5
Polímero carboxivinílico	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 comprendía los nanosomas que contenían el péptido preparados en el Ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

5

Tabla 5

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	2.5
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 carboxivinílico	0.2
Trietanolamina	0.18
Octildodeceth-16	0.4
Etanol	6.0

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

Ejemplo de formulación 5: Suero para el cabello

Se formuló un suero para el cabello que comprendía los nanosomas que contenían el péptido preparados en el Ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

5

Tabla 6

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	1
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 carboxivinílico	0.2
Trietanolamina	0.18
Octildodeceth-16	0.4
Etanol	6.0
Perfume, conservante, pigmentos	Cantidad adecuada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de formulación 6: Tónico para el cabello

Se formuló un tónico para el cabello que comprendía los nanosomas que contenían el péptido preparados en el Ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

10

Tabla 7

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	1
Glicerina	2.0
1,3-butilenglicol	2.0
PEG 1500	2.0

ES 2 610 814 T3

Alantoína	0.1
DL-pantenol	0.3
EDTA-2Na	0.02
Hialuronato de sodio	8.0
Polímero carboxivinílico	0.2
Trietanolamina	0.18
Octildodeceth-16	0.4
Etanol	10.0
Perfume, conservante, pigmentos	Cantidad adecuada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

<110> CAREGEN CO., LID.

<120> Péptidos derivados del ligando de EDAR y sus usos

<130> PP120051

5 <150> KR 10-2011-0077569
< 151> 04-08-2011

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

10 <210> 1
< 211> 11
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Péptido 1 derivado de EDA

15 <400> 1

Asn Met Ser Lys His Thr Thr Phe Phe Gly Ala
1 5 10

<210> 2

20 < 211> 12
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Péptido 1 derivado del ligando de EDAR

<400> 2

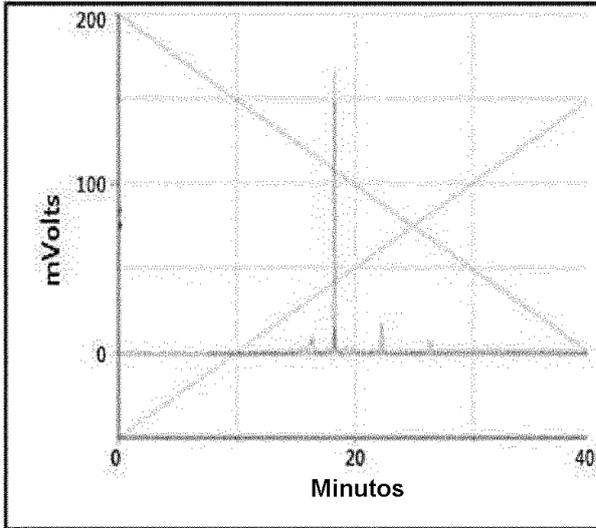
25

Leu Leu Ala Asp Thr Thr His His Arg Pro Trp Thr
1 5 10

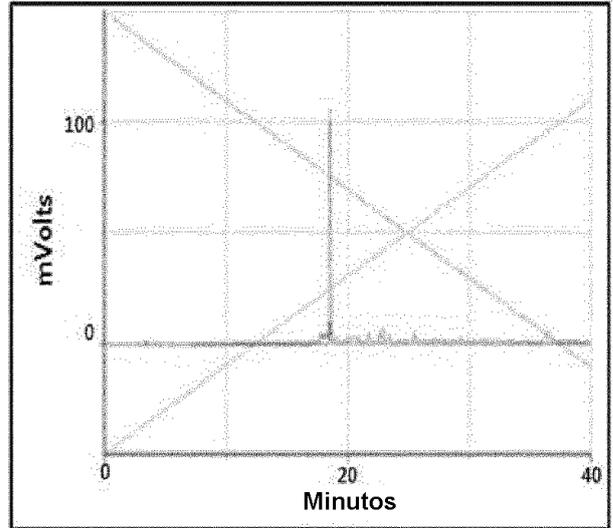
REIVINDICACIONES

1. Un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1.
- 5 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, donde el péptido tiene en su extremo N un grupo protector seleccionado a partir del grupo constituido por grupo acetilo, grupo fluorenilmetoxicarbonilo, grupo formilo, grupo palmitoilo, grupo miristilo, grupo estearilo y polietilenglicol (PEG).
3. Un uso del péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 para estimular el crecimiento del cabello y mejorar la producción del cabello.
- 10 4. Un uso del péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 para mejorar las condiciones de la piel, donde la mejora en las condiciones de la piel es una mejora en la elasticidad de la piel o las arrugas, prevención del envejecimiento de la piel, mejora de la hidratación de la piel, eliminación de heridas o regeneración de la piel.
- 15 5. Un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con la ruta de transducción de señales de EDA1 (ectodisplasina A1), donde el trastorno relacionado con la ruta de transducción de señales de EDA1 (ectodisplasina A1) es un trastorno óseo, osteoporosis u obesidad.

Fig. 1



Péptido de secuencia 1



Péptido de secuencia 2

Fig. 2a

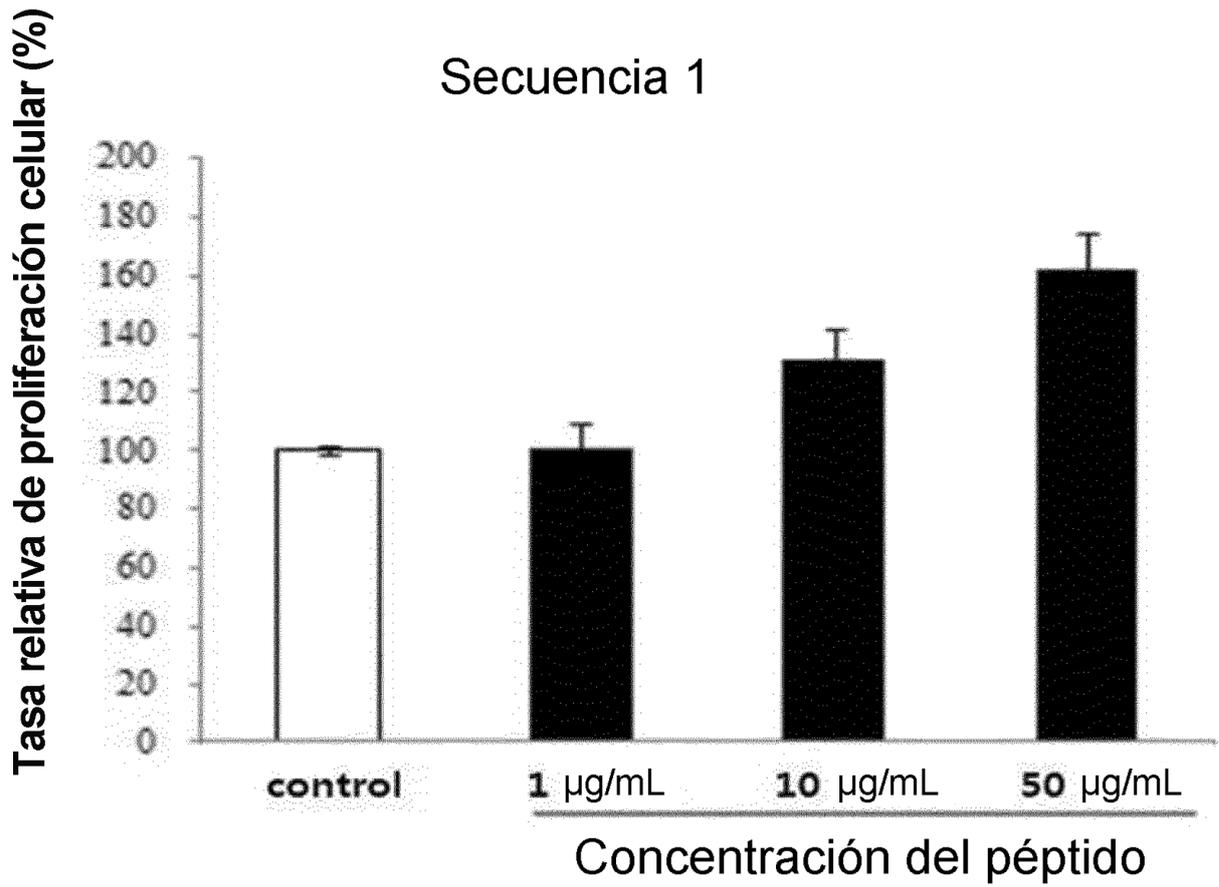


Fig. 2b

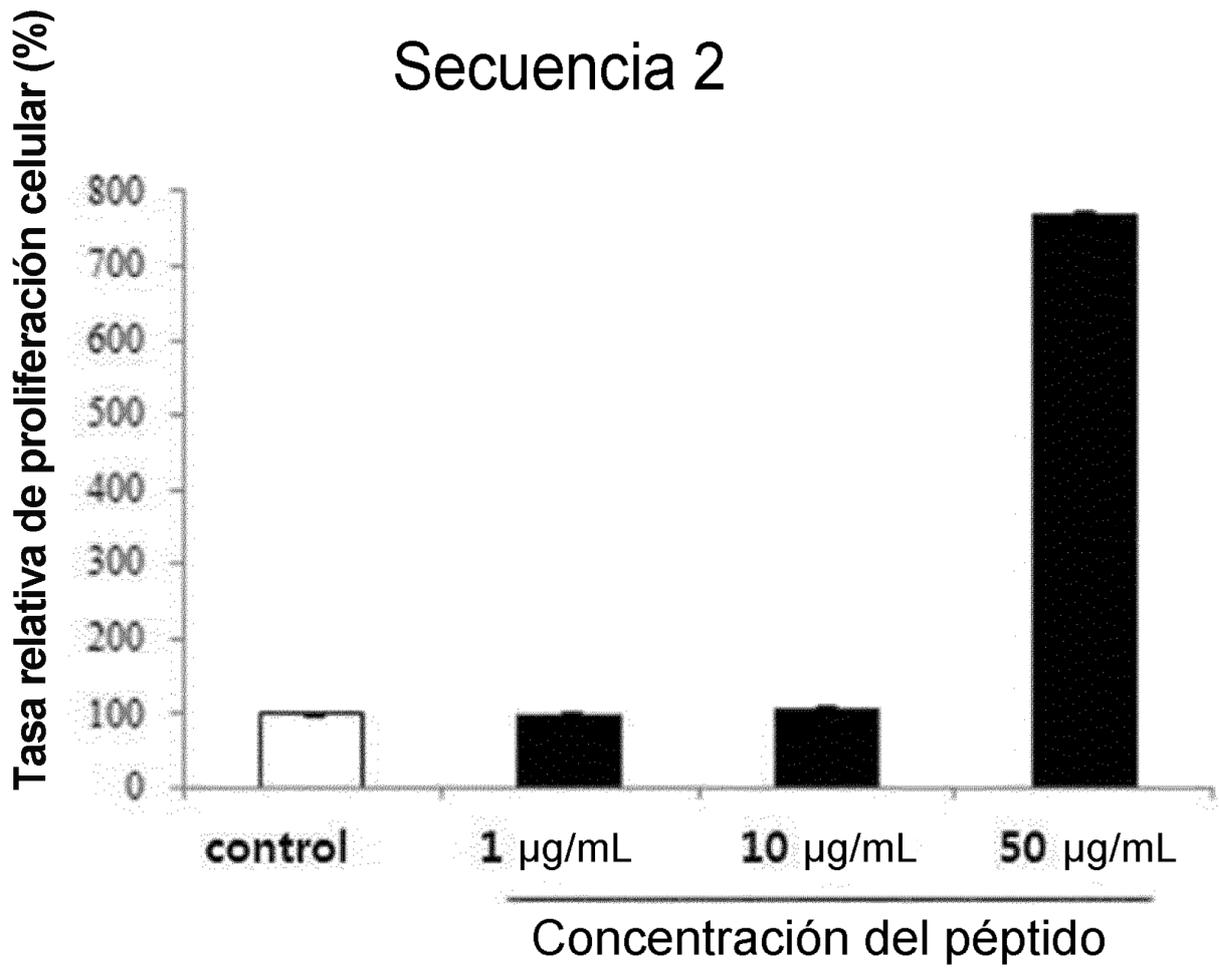


Fig. 3a

Secuencia 1

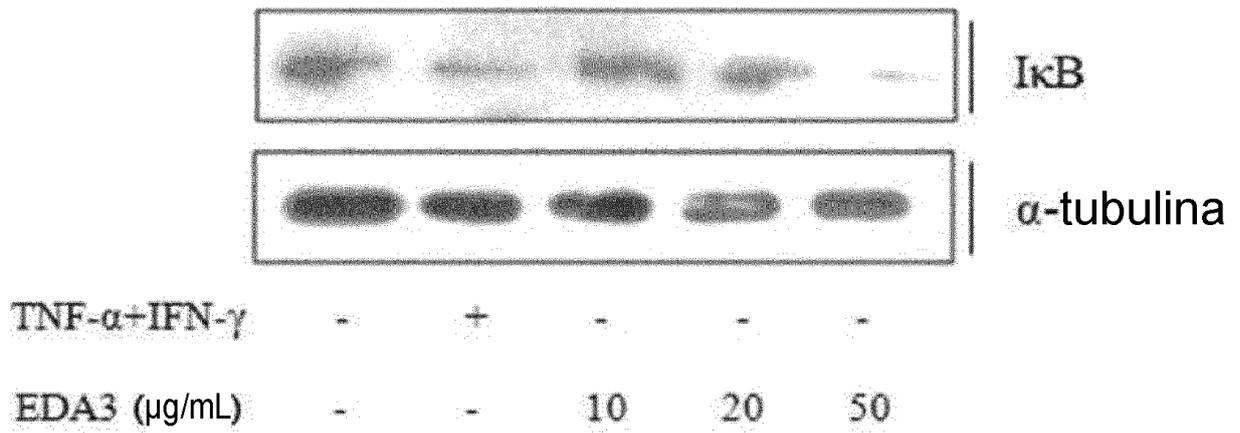


Fig. 3b

Secuencia 2

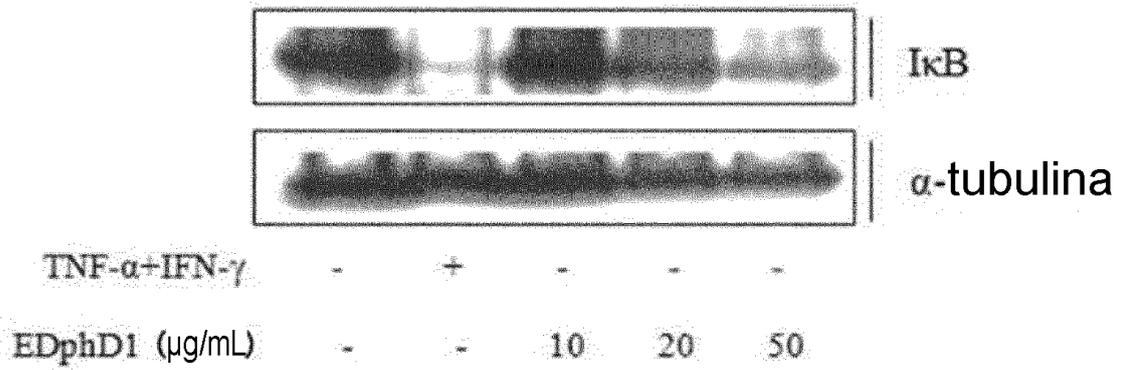


Fig. 4a
Secuencia 1

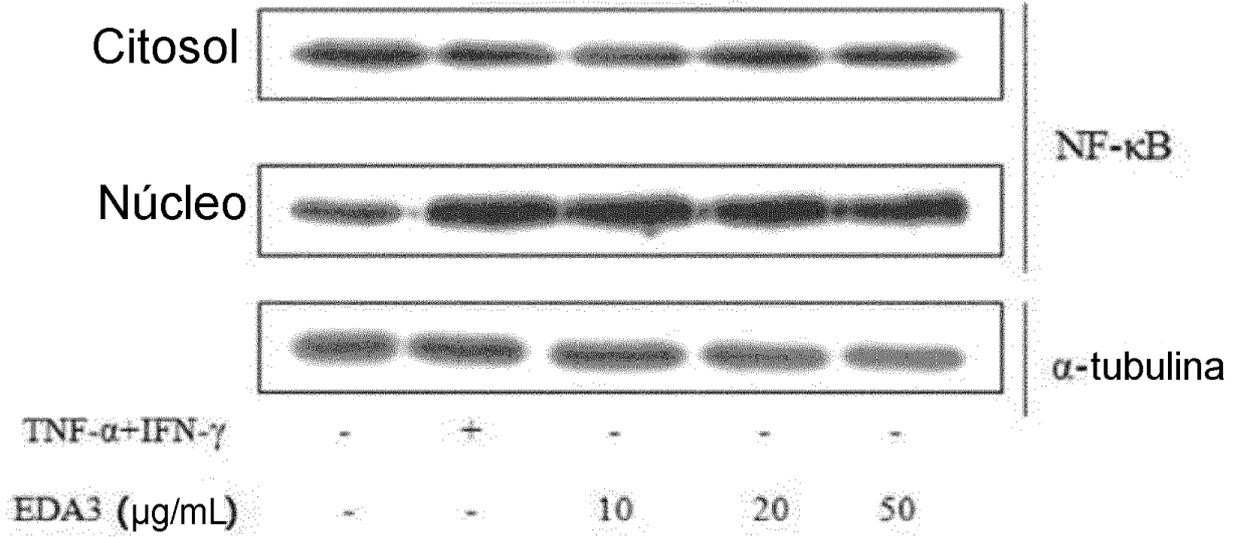


Fig. 4b
Secuencia 2

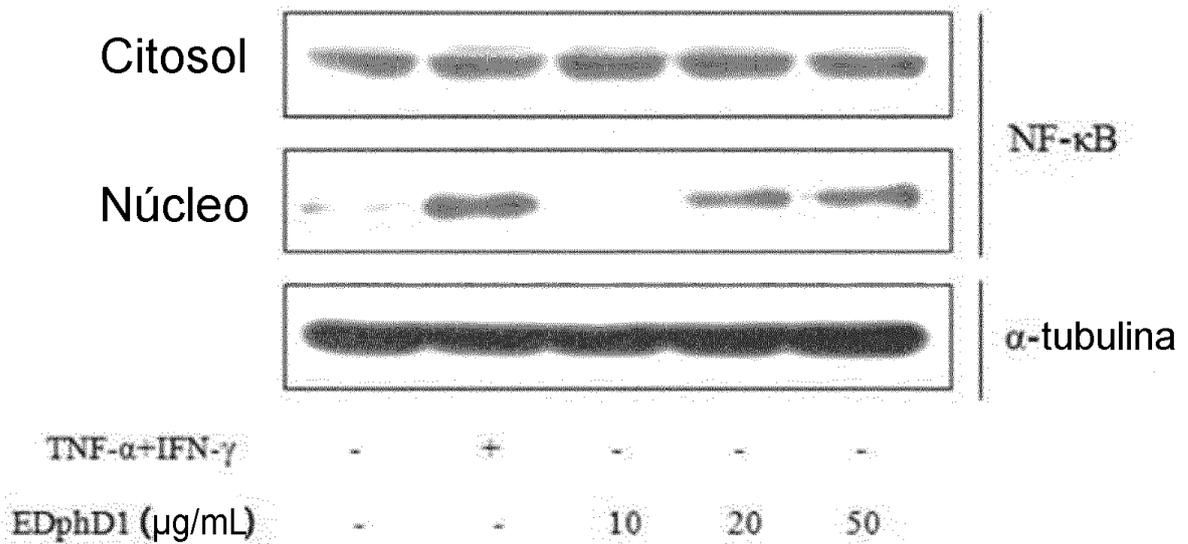


Fig. 5a

Secuencia 1

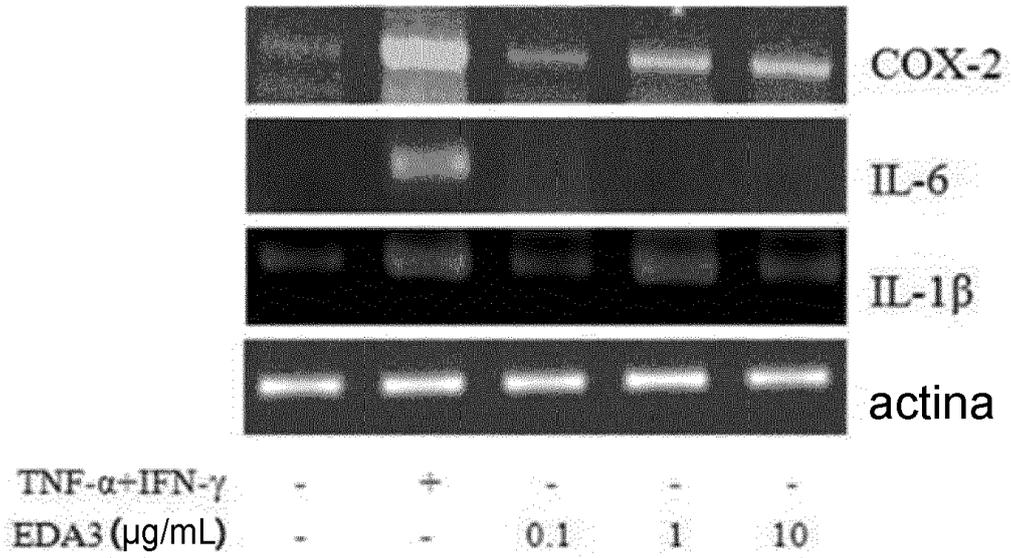


Fig. 5b

Secuencia 2

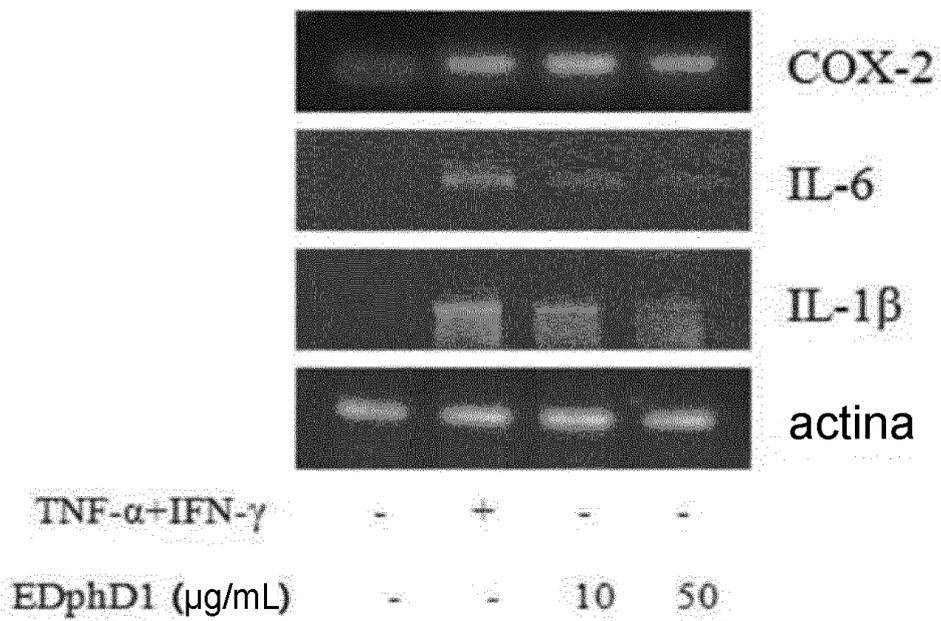


Fig. 6a

Secuencia 1

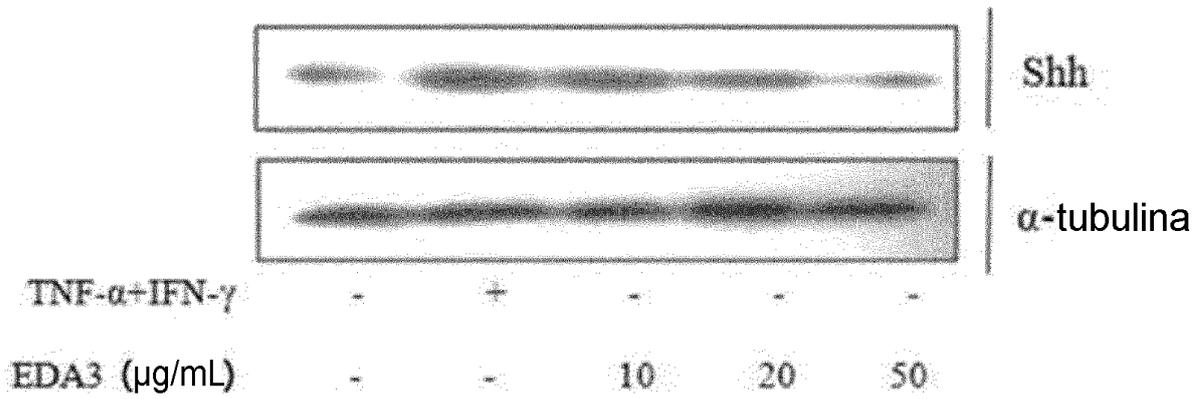


Fig. 6b

Secuencia 2

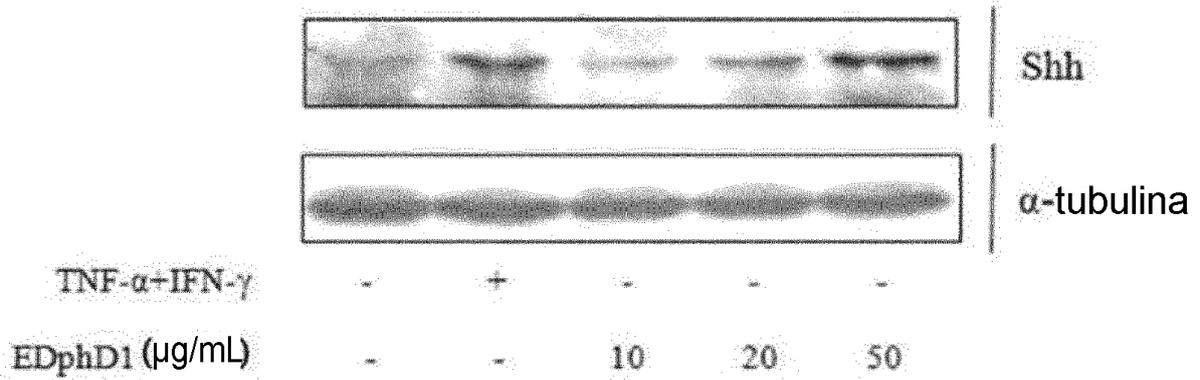


Fig. 7

