

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 616 658**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/50 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2009 PCT/KR2009/001134**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2011 WO2009125925**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2009 E 09730525 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2275440**

(54) Título: PÉPTIDOS QUE MIMETIZAN EL FACTOR DE CRECIMIENTO Y SUS USOS

(30) Prioridad:

11.04.2008 KR 20080033687

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

13.06.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**CHUNG, YOUNG JI;
KIM, YOUNG DEUG;
KIM, EUN MI y
CHOI, JUN YOUNG**

(74) Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 616 658 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos que mimetizan el factor de crecimiento y sus usos

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un péptido que mimetiza el factor de crecimiento que tiene una actividad del factor de crecimiento, y una composición y un método para mejorar las condiciones de la piel o para tratar una herida usándolo.

10

Estado de la técnica

Se sabe que las hormonas de crecimiento secretadas a partir de glándulas pituitarias están directamente asociadas con el crecimiento y la diferenciación celular, y de ese modo afectan a una diversidad de respuestas celulares que incluyen, por ejemplo, la facilitación del crecimiento y desarrollo de cartílago o hueso, la restauración de órganos internos tales como músculo o hígado, la regeneración de heridas y respuestas inmunes frente a infección. Además, se ha informado que una cantidad de hormonas de crecimiento se reduce gradualmente debido al envejecimiento, y el nivel de hormonas de crecimiento en un grupo de 60 a 69 años de edad es únicamente 1/4 en comparación con el de un grupo de 20 a 29 años de edad. Por lo tanto, se han utilizado activamente terapias hormonales antienvejecimiento que complementan las insuficientes hormonas de crecimiento.

20

La hormona de crecimiento directamente se une a un receptor de la hormona de crecimiento en una célula, o induce una secreción del factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-1), que lleva a activar las moléculas señales celulares tales como JAKs (quinasas Janus)/STATs (Transductores de señal y activadores de Transcripción), MAPKs (proteína quinasas activadas por mitógeno), o PI3K (fosfatidil-3 quinasa). Por consiguiente, se ha supuesto que las hormonas de crecimiento estimulan el crecimiento de fibroblastos en folículos pilosos o piel, e inhiben la apoptosis mediante la regulación de un gen similar a *bcl-2*, *bcl-w*. Numerosos investigadores han elucidado estas actividades de los factores de crecimiento, y diversas compañías han intentado la comercialización de factores de crecimiento debido a su utilización.

30

El factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) se clasifica en dos tipos, es decir, FGF ácido (aFGF) y FGF básico (bFGF), y se ha informado que ambos se aíslan y purifican de cerebro de mamífero (Thomas y Gimenez-Gallego, *TIBS* 11:81-84 (1986)).

35

Entre los factores de crecimiento, el FGF ácido (aFGF) es una proteína que consiste en 154 aminoácidos, que es una de las moléculas fundamentales en una investigación biomédica de la restauración de tejido y curación de herida, por ejemplo, una actividad para regular el crecimiento de células animales, especialmente células humanas. Un mitógeno para un fibroblasto ácido fue encontrado primero por Trowell y col. (*J. Exp. Biol.* 16:60-70 (1939)) y Hoffman (*Growth* 4:361-376 (1940)). Además, se encontró que extractos de la pituitaria tienen una actividad mitogénica potente para fibroblastos (*Amelin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2.702-2.706 (1973)).

40

aFGF purificado permite a numerosas líneas celulares sintetizar ADN y dividirse como respuestas a estímulos, las cuales incluyen fibroblastos primarios, células endoteliales corneales y vasculares, condrocitos, mieloblastos, mioblastos, células del músculo liso, células neurogliales y neuroblastos (Each y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6.507-6.511 (1985); Kuo y col., *Fed. Proc.* 44:695 (1985); Gensburger y col., *C.R. Acad. Sc. Paris* 303:465-468 (1986)). Además, aFGF no solamente es una molécula mitogénica fuerte para las células endoteliales vasculares sino también induce *in vivo* el crecimiento de los vasos sanguíneos (Thomas y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6.409-6.413 (1985)). La actividad mitogénica de aFGF purificado también se puede utilizar en la facilitación de la curación de herida (Thomas, Patente Americana Nº 4.44.760).

50

Entretanto, el factor de crecimiento de queratinocito (KGF) es una proteína que consiste en 163 aminoácidos, y acelera la división de células epiteliales, contribuyendo a la rápida regeneración de varias heridas. KGF afecta a diversos tipos celulares como miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblasto. KGF juega un papel crucial en el tratamiento de lesiones celulares generadas por varias causas incluyendo adhesión entre células, división celular y envejecimiento. Además, KGF básicamente funciona como un puente entre generaciones celulares en la fase temprana del crecimiento capilar. Además del mejoramiento en la elasticidad de la piel, la promoción del crecimiento capilar y la aceleración de la curación de herida, KGF se puede utilizar con diversos usos.

60

Igualmente, el factor de crecimiento transformante (TGF) es una citoquina que tiene una actividad esencial para el crecimiento y la diferenciación de las células cutáneas en un sitio profundo de la piel para conservar la piel muy joven y sana. Por ejemplo, las células dañadas por el envejecimiento se pueden alterar para ser células muy saludables con mayor actividad de división a través de la transformación y la restauración. TGF trata las células dañadas y, por tanto, puede prevenir la formación de una cicatriz en un tejido. TGF se une a un receptor de EGF, llevando a incrementar la síntesis de una proteína de membrana basal y estimular el crecimiento de células endoteliales. TGF puede ejercer diversas eficacias además del mejoramiento en la elasticidad de la piel, promoción del crecimiento capilar, aceleración de la curación de herida e inducción del ambiente antienvejecimiento.

- Para la producción en masa de los factores de crecimiento anteriormente mencionados, muchos investigadores han realizado exhaustivas investigaciones sobre la producción de la proteína recombinante usando los sistemas de expresión de *E. coli*. Sin embargo, se encuentra que estas preparaciones necesitan un proceso de repliegue que consume tiempo y dinero y un proceso de purificación complejo para eliminar los contaminantes originados por *E. coli*. Para liberarse de tales limitaciones, se han preparado péptidos similares al factor de crecimiento mediante métodos de síntesis en fase sólida. Por ejemplo, la Patente Americana Nº 5.473.054 presentada por Jameson y col. revela que el fragmento JB2 (correspondiente a los aminoácidos 29-38 de IGF-1) y JB1 (correspondiente a los aminoácidos 61-70) tienen potencial de proliferación celular y el enantiómero de JB1, JB3 tiene actividad inhibidora de IGF-1. El documento WO 03/048192 presentado por Teruo y col. enseña que cada uno de los fragmentos peptídicos de IGF-1 que consiste en los aminoácidos 33-37 y el tetrapéptido derivado de sustancia-P ejerce eficacia complementaria para la curación de herida. Además, Kodama y col. informa que el fragmento peptídico de IGF-1 que consiste en los aminoácidos 50-70 tiene un efecto terapéutico para diabetes en ratones (*Autoimmunity*, 37:481-487 (2004)).
- Jimenez y col (*Journal of Surgical Research* 81, 238-242, 1999) revela que el factor de crecimiento de queratinocito 2 acelera la curación de herida en heridas por incisión. Kim y col. (*Biochemistry* 1998, 37, 8.853-8.862) revela la colocalización de heparina y sitios de unión al receptor en el factor de crecimiento de queratinocito. Osslund y col. (*Protein Science*, 1998, vol.7, ejemplar 8, 1.681-1.690) es un estudio del factor de crecimiento de queratinocito.
- A través de esta solicitud, se hace referencia a diversas patentes y publicaciones, y se proporcionan citaciones entre paréntesis.

Objeto de la invención

- Para desarrollar péptidos que tienen acciones idénticas a KGF, aFGF o TGF que se da de manera natural, y que tienen más características significativas tales como actividad, penetración en la piel y estabilidad que el KGF, aFGF o TGF que se da de manera natural, los presentes inventores han realizado exhaustivas investigaciones. Como resultado, los presentes inventores han descubierto diversos péptidos que mimetizan el factor de crecimiento (GF) que tienen excelentes características anteriormente descritas basándose en la secuencia de aminoácidos de los factores que se dan de manera natural, consiguiendo finalmente la presente invención.

Por consiguiente, es un objeto de esta invención proporcionar un péptido que tiene la actividad del factor de crecimiento y derivado del GF, que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

- Es otro objeto de esta invención proporcionar una composición para mejorar las condiciones de la piel.

Es aún otro objeto de esta invención proporcionar una composición para tratar una herida.

Es aún otro objeto de esta invención proporcionar un método para mejorar las condiciones de la piel.

- Es más aún otro objeto de esta invención proporcionar un método para tratar una herida.

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

- En un aspecto de esta invención, se proporciona un péptido que tiene una actividad de un factor de crecimiento (GF) y derivado de GF, que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

Para desarrollar péptidos que tengan acciones idénticas al KGF, aFGF o TGF que se da de manera natural, y que tiene características más significativas tales como actividad, penetración de la piel y estabilidad que el KGF, aFGF o TGF que se da de manera natural, los presentes inventores han realizado exhaustivas investigaciones. Como resultado, los presentes inventores han descubierto varios péptidos que mimetizan el factor de crecimiento que tienen excelentes características anteriormente descritas basándose en la secuencia de aminoácidos de los factores de crecimiento que se dan de manera natural.

- El péptido de la presente invención incluye la secuencia de aminoácidos derivada de GF humano que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

El término usado en el presente documento "péptido" se refiere a una molécula lineal formada por la unión de residuos de aminoácidos a través de enlaces peptídicos.

El péptido de la invención se puede preparar mediante procesos de síntesis química convencionales conocidos por los expertos en la técnica, en particular, técnicas de síntesis en fase sólida (Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2.149-54 (1963); Stewart, y col., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2º. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111 (1984)).

- El diseño del péptido según la presente invención está ilustrado en la Figura 1.

El péptido de la presente invención se puede preparar previendo una parte capaz de unirse a una proteína receptor del factor de crecimiento y optimizando una secuencia de aminoácidos de la parte prevista. Por ejemplo, se prevé una parte capaz de unirse a una proteína receptor en los aminoácidos 100-140 de queratinocitos, aminoácidos 110-125 de aFGF, y aminoácidos 35-49 de TGF- α . Despues, el péptido candidato se prepara en referencia con la secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada y, a continuación, se criba el péptido que tiene la actividad más excelente, dando como resultado los péptidos de esta invención.

SEQ ID NO: 1 está derivada de los aminoácidos 120-127 del KGF humano que se da de manera natural. SEQ ID NO: 2 está derivada de los aminoácidos 111-112 de aFGF humano que se da de manera natural. SEQ ID NO: 3 y 10 SEQ ID NO: 4 están derivadas de los aminoácidos 10-20 y 38-49 de TGF- α humano que se da de manera natural, respectivamente.

Aunque el péptido de esta invención por sí mismo tiene mayor estabilidad que el factor de crecimiento que se da de manera natural, su modificación permite tener mucha más estabilidad. Según una realización preferible, el extremo 15 C del péptido de la presente invención está modificado para tener un grupo hidroxilo (-OH) o un grupo amino (-NH₂).

Según una realización preferida, el extremo N del péptido de la presente invención está protegido con un grupo de protección seleccionado entre el grupo que consiste en grupo acetilo, grupo fluorenil metoxi carbonilo, grupo formilo, grupo palmitoilo, grupo miristilo, grupo estearilo o polietilenglicol (PEG).

20 Las modificaciones del péptido anteriormente descrito aumentan enormemente la estabilidad de esta invención. El término usado en el presente documento "estabilidad" se refiere a estabilidad *in vivo* y también estabilidad en almacenamiento (por ejemplo, estabilidad en almacenamiento a temperatura ambiente). El grupo de protección anteriormente descrito protege el péptido del ataque de la proteasa *in vivo*.

25 En otro aspecto de esta invención, se proporciona una composición para mejorar las condiciones de la piel, que comprende como principio activo el péptido que mimetiza el factor de crecimiento de esta invención.

30 En aún otro aspecto de esta invención, se proporciona una composición para tratar una herida, que comprende como principio activo el péptido que mimetiza el factor de crecimiento de esta invención.

En aún otro aspecto de esta invención se proporciona un método para mejorar las condiciones de la piel, que comprende la administración a un sujeto de una composición que contiene el péptido de esta invención.

35 En aún más otro aspecto de esta invención, se proporciona un método para tratar una herida, que comprende la administración a un sujeto de una composición que contiene el péptido de esta invención.

Puesto que el presente método comprende el péptido que mimetiza el factor de crecimiento de esta invención como los principios activos anteriormente descritos, se omiten las descripciones comunes entre ellos para evitar la 40 redundancia indebida que lleva a la complejidad de esta memoria.

Tal como se demuestra en los Ejemplos de más adelante, los péptidos que mimetizan el factor de crecimiento de la 45 presente invención que tienen acciones idénticas al factor de crecimiento que se da de manera natural (por ejemplo, KGF, aFGF y TGF) estimulan la proliferación de fibroblastos y queratinocitos, y la producción de colágeno y fibronectina. Por lo tanto, la composición de la presente invención tiene excelentes efficacias sobre los mejoramientos en las condiciones de la piel.

Según una realización preferible, la composición de esta invención se puede utilizar en mejoramientos en las 50 condiciones de la piel tales como mejoramiento de la arruga o la elasticidad de la piel, prevención del envejecimiento cutáneo, prevención de la pérdida del pelo, promoción del crecimiento capilar, mejoramiento de la hidratación de la piel, eliminación de los puntos negros o tratamiento del acné.

Interesantemente, el péptido que mimetiza el factor de crecimiento de la presente invención tiene excelentes efectos de curación de herida como se demuestra en los Ejemplos de más adelante.

55 Según una realización preferible, la composición de esta invención se puede utilizar en una herida cerrada y una herida abierta. Por ejemplo, la herida cerrada incluye contusión o moratón, y la herida abierta abrasión, laceración, avulsión, herida penetrada y herida de disparo de arma.

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

Según una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica que comprende (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido que mimetiza el factor de crecimiento de la presente invención; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65 El término usado en el presente documento "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente

para mostrar y conseguir eficacias y actividades del péptido de esta invención.

El vehículo farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente invención, que frecuentemente se usa en las formulaciones farmacéuticas incluye, pero no se limita a, lactosa, dextrosa, sacarosa,

5 sorbitol, manitol, almidón, goma de cultivo, fosfato de potasio, arginato, gelatina, silicato de potasio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabes, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. La composición farmacéutica según la presente invención además puede incluir un lubricante, un humectante, un edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión y un conservante. Los detalles de vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados y formulaciones se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (19º ed., 1995).

La composición farmacéutica según la presente invención se puede administrar oralmente o parenteralmente, y preferiblemente, se administra parenteralmente, por ejemplo, mediante administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, local o transdérmica.

15 Una cantidad de dosis adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo de los métodos de formulación farmacéutica, métodos de administración, edad del paciente, peso corporal, sexo, estado patógeno, dieta, tiempo de administración, vía de administración, tasa de excreción y sensibilidad para una composición farmacéutica usada. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar con una dosis diaria de 0,001-100 mg/kg.

20 Según las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, la composición farmacéutica según la presente invención puede estar formulada con vehículo farmacéuticamente aceptable y/o vehiculizante como se describió anteriormente, proporcionando finalmente varias formas, una forma de dosis unitaria y una forma de multidosis. Ejemplos no limitantes de las formulaciones incluyen, pero no se limitan a, una solución, una suspensión o una emulsión en aceite o medio acuoso, un extracto, un elixir, un polvo, un gránulo, un comprimido y una cápsula, y además puede comprender un agente de dispersión o un estabilizador.

25 Según una realización preferible, la composición es una composición cosmética que comprende (a) una cantidad cosméticamente eficaz del péptido que mimetiza el factor de crecimiento de la presente invención; y (b) un vehículo cosméticamente aceptable.

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

35 Las composiciones cosméticas de esta invención se pueden formular en una amplia diversidad de formas incluyendo, por ejemplo, una solución, una suspensión, una emulsión, una pasta, una pomada, un gel, una crema, una loción, un polvo, un jabón, un limpiador que contiene tensioactivo, un aceite, una base en polvo, una base de emulsión, una base de cera y un pulverizador. Específicamente, las composiciones cosméticas de esta invención se pueden formular en forma de suavizante de la piel, líquido nutritivo, crema nutritiva, crema de masaje, esencia, crema de ojos, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, compresa, pulverizador o polvo.

40 Cuando 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 zinc o mezclas de estas sustancias.

45 En la formulación en polvo o pulverizador, puede comprender lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio, polvo de poliamida y mezclas de estas sustancias. El pulverizador puede comprender además los propulsores habituales, por ejemplo, clorofluorohidrocarburos, propano/butano o dimetil éter.

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

55 La formulación de la suspensión puede comprender diluyentes líquidos, por ejemplo, agua, etanol o propilenglicol, agentes de suspensión, por ejemplo, alcoholes isostearílico etoxilados, ésteres de polioxietilen sorbitol y ésteres de polioxietelen sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar y tragacanto o mezclas de estas sustancias.

60 La formulación de las composiciones limpiadoras con tensioactivo pueden comprender sulfato de alcohol alifático, sulfato de éter de alcohol alifático, monoéster de sulfosucinato, isotinato, derivados de imidazolio, metiltaurato, sarcocinato, sulfato de éter de amida de ácido graso, alquil amido betaina, 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 estos ingredientes.

Además, las composiciones cosméticas de esta invención pueden contener auxiliares así como modificadores de bFGF como principios activos y vehículos. Ejemplos no limitantes de auxiliares incluyen antioxidantes, estabilizadores, solubilizadores, vitaminas, colorantes, mejoradores del olor o mezclas de estas sustancias.

5 Las características y ventajas de la presente invención se resumirán como sigue:

- (i) El péptido que mimetiza el factor de crecimiento de la presente invención posee funciones o actividades idénticas al factor de crecimiento que se da de manera natural;
- (ii) El péptido de la presente invención tiene mucha mayor estabilidad y potencia de penetración en la piel que el factor que se da de manera natural;
- (iii) Por lo tanto, la composición que comprende el péptido presenta excelentes eficacias de tratamiento, prevención o mejoramiento sobre enfermedades o condiciones que demandan las actividades del factor de crecimiento; y
- (iv) La excelente actividad y estabilidad del péptido de esta invención se puede aplicar ventajosamente a composiciones farmacéuticas, productos de parafarmacia y cosméticos.

Descripción de las figuras

20 La Figura 1 representa la secuencia de aminoácidos de los factores de crecimiento que se dan de manera natural y regiones seleccionadas para preparar los péptidos de la presente invención.

La Figura 2a representa un análisis de cromatografía líquida de alta resolución del péptido de SEQ ID NO: 1 preparado en el Ejemplo.

La Figura 2b representa un análisis de cromatografía líquida de alta resolución del péptido de SEQ ID NO: 2 preparado en el Ejemplo.

25 La Figura 2c representa un análisis de cromatografía líquida de alta resolución del péptido de SEQ ID NO: 3 preparado en el Ejemplo.

La Figura 2d representa un análisis de cromatografía líquida de alta resolución del péptido de SEQ ID NO: 4 preparado en el Ejemplo.

30 La Figura 3a es una gráfica que representa un efecto estimulador sobre el crecimiento de queratinocitos tratados con el péptido de SEQ ID NO: 1-4 preparado en el Ejemplo.

La Figura 3b es una gráfica que representa un efecto estimulador sobre el crecimiento de fibroblastos tratados con el péptido de SEQ ID NO: 1-4 preparado en el Ejemplo.

35 La Figura 4 son imágenes microscópicas que representan un efecto estimulador sobre el crecimiento de queratinocitos y fibroblastos tratados con el péptido de SEQ ID NO: 1-4 preparado en el Ejemplo.

La Figura 5a representa una gráfica para mostrar elevado nivel de colágeno en queratinocitos incubados con péptidos (péptidos 1-4).

La Figura 5b representa una gráfica para mostrar elevado nivel de fibronectina en queratinocitos incubados con péptidos (péptidos 1-4).

40 La Figura 6 es una gráfica que compara la estabilidad en calor de los péptidos de la presente invención y aFGF que se da de manera natural.

La Figura 7 representa una imagen de un hidrogel que contiene los péptidos.

La Figura 8 es una imagen de tejido para observar los efectos de curación de herida en tejido herido de ratones Balb/C después de que al área herida de ratones Balb/C se trate con hidrogel que contiene los péptidos de la presente invención durante 10 días.

45 Descripción detallada de la invención

Ahora se describirá la presente invención a más detalle por medio de los ejemplos. Será obvio para los expertos en la técnica que estos ejemplos tienen la intención de ser más concretamente ilustrativos y el alcance de la presente invención que se describe en las reivindicaciones adjuntas no está limitado a o por los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo de preparación 1: Síntesis de Ac-Tyr-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gly-Trp-Thr-His (SEQ ID NO:1)

55 Se añadieron 10 ml de cloruro de metileno (MC) a 700 mg de resina de clorotritilo (CTL resina, Nova Biochem Cat Nº 01-64-0021) introducido en un reactor y se agitó durante 3 min. Después de separar la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF) al resultante y, a continuación, se llevó a cabo la agitación durante 3 min, después de lo cual se separó el disolvente. Se añadieron 10 ml de solución de diclorometano al reactor y, a continuación, se añadieron 200 mmol de Fmoc-His(Trt)-OH y 400 mmol de diisopropiletilamina (DIEA) al reactor, después de lo cual se disolvió la mezcla por agitación y, a continuación, se emprendió la reacción con agitación durante 1 h. Después de la reacción, se lavó el resultante y se dejó reaccionar durante 10 min en metanol y DIEA (2:1) disuelto en DCM, seguido de lavado con exceso de DCM/DMF (1:1). Después de la separación del disolvente, se añadieron 10 ml de DMF al reactor y se agitó durante 3 min, seguido de separación del disolvente. Se añadieron 10 ml de una solución de desprotección (20% piperidina/DMF) al reactor y se agitó durante 10 min a temperatura ambiente, y se realizó la separación de la solución. Después de añadir el mismo volumen de la solución de

desprotección, se emprendió la reacción durante 10 min y se separó la solución, seguido de lavado secuencialmente con DMF (dos veces), MC y DMF para producir resinas His-(Trt)-CTL. Se añadió 10 ml de DMF a un nuevo reactor y a continuación se añadieron 200 mmol de Fmoc-Thr(tBu)-OH (Bachem, Suiza), 200 mmol de HoBt y 200 mmol de Bop, seguido de agitación para solubilización. Se añadieron 400 mmol de DIEA al reactor dos veces como fracción y se llevó a cabo la agitación durante al menos 5 min para disolver todos los contenidos sólidos. La solución de aminoácidos disueltos se introdujo en el reactor que contenía la resina desprotegida y se emprendió la reacción con agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la separación de la solución de reacción, se agitó el resultante tres veces con solución DMF durante 5 min para separar los residuos no reaccionados. Se tomó una pequeña cantidad de la resina reaccionada para evaluar la extensión de las reacciones por el ensayo de Ninhidrina.

5 Usando la solución de desprotección, se realizó la desprotección dos veces de la misma manera que se describió anteriormente para producir resinas Thr(tBu)-His-(Trt)-CTL. Después de lavar con DMF y MC, se llevó a cabo el ensayo de Ninhidrina y, a continuación, se realizaron los acoplamientos de aminoácidos como se describió anteriormente. Basándose en la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 1, Fmoc-Trp, Fmoc-Gly, Fmoc-Gly, FmocLys(Boc), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Lys(Boc) y Fmoc-Tyr(tBu) se acoplaron secuencialmente a las resinas. El grupo protector de Fmoc se separó mediante incubación con la solución de desprotección dos veces durante 10 min. Para la acetilación, se incubaron anhídrido acético, DIEA y HoBt con las peptidil resinas dos veces durante 1 h, y las peptidil resinas preparadas se lavaron tres veces secuencialmente con DMF, MC y metanol, se secaron bajo el flujo de gas de nitrógeno, se secaron completamente mediante secado por vacío bajo P₂O₅ y, a continuación, se dejaron reaccionar con 30 ml de la solución restante [que contenía TFA al 81,5 % (ácido trifluoroacético), agua destilada al 5 %, tioanisol al 5 %, fenol al 5 %, EDT al 2,5 % y TIS al 1 %] 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 líquido madre. Después de la destilación bajo presión reducida para reducir el volumen total entre dos, la precipitación se indujo usando 50 ml de éter frío y los precipitados formados se recogieron mediante centrifugación, seguido de lavado dos veces con éter frío. Después de separar el líquido madre, el resultante se secó bajo atmósfera de nitrógeno para proporcionar 1,18 g de Ac-YKSKKGGWTH no purificada de SEQ ID NO: 1 (tasa de producción, 72,6 %). El peso molecular del producto final se determinó como 1233,8 (PM teórico 1223,4) usando un analizador de masas.

10 15 20 25

Ejemplo de preparación 2: Síntesis de otros péptidos

30 Los péptidos de las SEQ ID NO: 2-4 se sintetizaron como los procesos descritos en el Ejemplo de preparación 1. SEQ ID NO:2 (Tyr-Ile-Ser-Lys-Lys-His-Ala-Gly-Lys-Asn-Trp-Phe: YISKKHAGKNWF) corresponde a los aminoácidos 111-122 de aFGF, SEQ ID NO:3 (Asp-Ser-His-Thr-Gln-Tyr-Cys-Phe-His-Gly-Thr: DSHTQYCFHGT) a los aminoácidos 10-20 de TGF- α , y SEQ ID NO:4 (Gly-Tyr-Val-Gly-Val-Arg-Cys-Glu-Ala-Ala-Asp-Leu-Asp-Ala: GYVGVRCEAADLDA) a los aminoácidos 38-49 de TGF- α . Los pesos moleculares determinados de los péptidos están resumidos en la Tabla 1:

35

TABLA 1

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos	Valores analizados (analizador de masas)	
		Valores analizados	Valores teóricos
1	Ac-YKSKKGGWTH	1233,6	1233,4
2	YISKKHAGKNWF	1478,8	1478,7
3	DSHTQYCFHGT	1295,9	1295,4
4	GYVGVRCEAADLDA	1438,0	1437,6

40 Ejemplo experimental 1: Influencia de los péptidos sobre el crecimiento de queratinocitos HaCaT y fibroblastos NIH3T3

Para evaluar si los cuatro péptidos preparados en los Ejemplos de Preparación 1-2 tienen actividades similares de factor de crecimiento-1, se llevó a cabo la prueba colorimétrica de la SRB (Sulforodamina B; Sigma-Aldrich) usando queratinocitos HaCaT y fibroblastos NIH3T3 según el método de Rizzino y col. (Rizzino, y col. *Cancer Res.*, 48:4.266 (1988)).

45

50 Los queratinocitos HaCaT (*The Korean Cell Line Bank*) y los fibroblastos NIH3T3 (*The Korean Cell Line Bank*) se cultivaron en matraces de 250 ml que contenían EMEM (medio esencial mínimo de Eagle; Gibco, USA) complementado con FBS al 10 % (suero bovino fetal). Las células cultivadas se trataron con solución de tripsina al 0,25 % para separar las células del fondo de los matraces de cultivo y se centrifugaron para recoger los sedimentos celulares. Después de que se resuspendieran las células en EMEM que no contenía FBS, su alícuota (4 x 10³) se añadió a cada pocillo de placas de 96 pocillos y se cultivaron bajo CO₂ al 7 % durante 24 h a 37 °C. Después de 24 h de cultivo, el medio se intercambió con un medio fresco que no contenía suero y las células se cultivaron con aFGF humano (NIBSC, UK) o cuatro péptidos sintetizados (10 ng/ml o 1.000 ng/ml) disueltos en agua y DMSO al 10 % durante 72 h bajo las mismas condiciones que se describieron anteriormente. Después de separar los sobrenadantes, las células se lavaron una vez usando PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se incubaron con solución de SRB. Las células se lavaron suficientemente con PBS y se observaron bajo un microscopio para encontrar la viabilidad celular. Además, se midió la absorbancia a 590 nm para analizar la proliferación celular.

55

La Figura 3a y la Figura 3b representan los datos de análisis para el crecimiento de queratinocitos y fibroblastos, respectivamente. La Fig. 4 representa el patrón de crecimiento de queratinocitos y fibroblastos que se observó bajo microscopio después de 72 h de tratamiento con péptidos.

- 5 Tal como se muestra en la Figura 3a, los cuatro péptidos de esta invención estimulan drásticamente el crecimiento de queratinocitos. Especialmente, los péptidos 1, 3 y 4 de esta invención tienen efectos mucho mejores sobre el crecimiento de queratinocitos. Además, como se muestra en la Figura 3b, se observó que los péptidos de esta invención facilitan el crecimiento de fibroblastos. En particular, los péptidos 1 y 2 de esta invención tenían excelentes efectos sobre el crecimiento de fibroblastos. Tal como se representa en la Figura 4, se reveló que los péptidos de la presente invención elevan significativamente el crecimiento de queratinocitos y fibroblastos.
- 10

Ejemplo experimental 2: influencia de péptidos sobre la producción de colágeno y fibronectina

- 15 Se incubaron queratinocitos HaCaT cultivados durante 48 h con los péptidos de la presente invención durante 72 h. Se examinaron los niveles de procolágeno y fibronectina, indicadores para mostrar el mejoramiento de las arrugas de la piel. Se realizó la cuantificación usando el kit de ELISA para procolágeno (Takara, Japón) y el kit de ELISA para fibronectina (CHEMICON, USA). Tal como se muestra en la Figura 5a, se reveló que los péptidos de la presente invención elevan el nivel de procolágeno en queratinocitos. En primer lugar, se mostró que el péptido 2 de la presente invención estimula notablemente la producción de procolágeno. Además, como se demuestra en la Figura 5b, se reveló que los péptidos de la presente invención elevaban el nivel de fibronectina en queratinocitos. Especialmente, se mostró que los péptidos 1 y 4 de la presente invención facilitan sorprendentemente la producción de procolágeno.
- 20
- 25 Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que los péptidos de la presente invención presentan efectos significativos para el mejoramiento en las condiciones de la piel.

Ejemplo experimental 3: Estabilidad en calor de los péptidos preparados

- 30 Se disolvieron los cuatro péptidos preparados en los Ejemplos de Preparación 1-2 y productos estándar del factor de crecimiento (KGF, aFGF y TGF- α ; NIBSC, UK) en un tampón fosfato a una concentración de 0,11 mg/ml. Las soluciones preparadas (1 ml) se introdujeron en viales de cristal y se mantuvieron en reposo a 37 °C. Después, se tomaron las soluciones los días 0, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 60 y 100, y se centrifugaron para separar de los péptidos desnaturalizados o proteínas, seguido de cuantificación usando HPLC (Fig. 6). La cantidad residual de los péptidos preparados era mucho mayor que la de los factores de crecimiento que se dan de forma natural. Se trataron células con los péptidos residuales como muestra según el mismo método descrito en el Ejemplo 1, y se sometieron a prueba MTT (Scudiero, D.A., y col. *Cancer Res.* 48: 4827-4833 (1988)) para determinar las actividades residuales del péptidos y los factores de crecimiento que se dan de manera natural. Se podría apreciar que todos los péptidos de la presente invención tienen actividad más superior que los factores de crecimiento que se dan de manera natural.
- 35
- 40

Ejemplo 1: Preparación de nano péptidos

- 45 Se disolvieron 50 mg del péptido sintetizado en los Ejemplos de Preparación en 500 ml de agua destilada mediante agitación energética. Se mezcló la solución peptídica con 5 g de lecitina, 0,3 ml de oleato de sodio, 50 ml de etanol y una pequeña cantidad de aceites, y se ajustó su volumen con agua destilada a 1 l. La solución resultante se sometió a un microfluidizador bajo alta presión para emulsificación, proporcionando de ese modo nanosomas que tenían 100 nm de tamaño. Los nanosomas se prepararon para tener una concentración final de aproximadamente 50 ppm y se usaron como ingredientes para cosméticos solos o en combinación con otros.
- 50

Ejemplo de formulación 1: Preparación de suavizante de piel usando nano péptidos

Se formuló un suavizante de piel que contenía uno o más nanosomas de péptido preparados en el Ejemplo 1 según la siguiente formulación:

55

TABLA 2

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosomas de péptido	0,001
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 apropiada

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Benzofenona-9	0,05
Perfume	Cantidad mínima
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de formulación 2: Preparación de crema nutritiva usando nano péptidos

Se formuló una crema nutritiva que contenía uno o más nanosomas de péptido preparados en el Ejemplo 1 según la 5 siguiente composición

TABLA 3

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosomas de péptido	0,001
Aceite de "espuma de la pradera" (Meadowfoam)	3,0
Alcohol cetearílico	1,5
Ácido esteárico	1,5
Esterato de glicerilo	1,5
Parafina líquida	10,0
Cera	2,0
Polisorbato 60	0,6
Sesquioleato de sorbitano	2,5
Escualano	3,0
1,3-butilenglicol	3,0
Glicerina	5,0
Amina de trietanol	0,5
Acetato de tocoferilo	0,5
Conservante, pigmentos	Cantidad apropiada
Perfume	Cantidad apropiada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de formulación 3: Líquido nutritivo

10 Se formuló un líquido nutritivo que contenía uno o más nanosomas de péptido preparados en el Ejemplo 1 según la siguiente composición:

TABLA 4

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosomas de péptido	0,002
1,3-butilenglicol	4,0
Glicerina	4,0
Alcohol cetearílico	0,8
Esterato de glicerilo	1,0
Trietanol amina	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 sorbitano	0,5
Polímero de carboxivinilo	1,0
Conservante, pigmentos	Cantidad apropiada
Perfume	Cantidad apropiada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de formulación 4: Preparación de esencia usando nano péptidos

Se formuló una esencia que contenía uno o más nanosomas de péptido preparados en el Ejemplo 1 según la 15 siguiente composición:

20

TABLA 5

Ingredientes	Contenido (% en peso)

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosomas de péptido	0,005
Glicerina	10,0
1,3-butilenglicol	5,0
PEG 1500	2,0
Alatoína	0,1
DL-pantenol	0,3
EDTA-2Na	0,02
Hidroxietil celulosa	0,1
Hialuronato de sodio	8,0
Polímero de carboxivinilo	0,2
Trietanol amina	0,18
Octildodeceth-16	0,4
Etanol	6,0
Perfume, conservante, pigmentos	Cantidad apropiada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de formulación 5: Hidrogel para tratar una herida

5 Se formuló un parche de hidrogel que contenía uno o más péptidos preparados según la siguiente composición (Figura 7). Los trozos de hidrogel (1x1 cm²) se prepararon usando un rodillo y cuchilla (*doctor blade*), y se usó en experimentos adicionales. Se mostró la imagen del trozo de hidrogel en la Figura 7.

TABLA 6

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosomas de péptido	0,005
Glicerina	10,0
1,3-butilenglicol	5,0
Goma de xantano	2,0
Polímero de acrilato	23
Agarosa	2
Aceite de jojoba	5
Perfume, conservante, pigmentos	Cantidad apropiada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

10 Ejemplo experimental 4: Efectos de los péptidos sobre la curación de herida en ratones Balb/C

Se quitaron los pelos de las partes de lomo de ratones machos Balb/C usando un cortador de pelo y se sometieron a una herida con un tamaño entre aproximadamente 3 mm y 5 mm sobre su lomo usando una cuchilla quirúrgica desechable. Un día después, se administró de manera tópica al área de la herida el parche de hidrogel preparado que contenía uno o más péptidos y aFGF como control positivo, respectivamente. Después de tres días, la misma cantidad del parche de hidrogel y aFGF se pegó de nuevo a la misma herida. Siete días después, se observaron a simple vista los efectos de curación de la herida en el tejido de la herida de los ratones Balb/C (Figura 8). Tal como se muestra en la Figura 8. Se observó a simple vista el efecto de curación de herida en el área de herida administrado con el parche de hidrogel preparado que contenía uno o más péptidos en comparación con un no tratamiento (control negativo). Además, se pudo distinguir a simple vista que el área de herida tratado con el parche de hidrogel preparado contenía uno o más nanosomas de péptido se curó con el lapso de tiempo mayor que con aFGF. Estos resultados sugieren que los péptidos de la presente invención tienen estabilidad superior en el cuerpo externo en comparación con los factores de crecimiento que se dan de manera natural, permitiendo funcionar en un área de herida durante un largo tiempo. Además, se pudo apreciar que los cosméticos de nanosoma y el hidrogel que comprende los péptidos de la presente invención ejercen mejoramientos significativos en la piel y excelentes eficacias sobre el tratamiento de heridas ya que pueden tener una actividad del factor de crecimiento y una aumentada semivida *in vivo*.

ES 2 616 658 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Caregen Co., Ltd.

<120> Péptidos que mimetizan el factor de crecimiento y sus usos

<160> 4

<170> Kopatentin 1.71

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido 1

<400> 1

Tyr	Lys	Ser	Lys	Lys	Gly	Gly	Trp	Thr	His
1				5					10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido 2

<400> 2

Tyr	Ile	Ser	Lys	Lys	His	Ala	Gly	Lys	Asn	Trp	Phe
1				5						10	

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido 3

<400> 3

ES 2 616 658 T3

Asp Ser His Thr Gln Tyr Cys Phe His Gly Thr
1 5 10

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido 4

<400> 4

Gly Tyr Val Gly Val Arg Cys Glu Ala Ala Asp Leu Asp Ala
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que tiene una actividad de un factor de crecimiento (GF) y derivado de GF, que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.
5
2. El péptido según la reivindicación 1, en donde el extremo C del péptido está modificado para tener un grupo hidroxilo (-OH) o un grupo amino (-NH₂).
10
3. El péptido según la reivindicación 1, en donde el extremo N del péptido está protegido con un grupo de protección seleccionado entre el grupo que consiste en grupo acetilo, grupo fluorenil metoxi carbonilo, grupo formilo, grupo palmitoilo, grupo miristilo, grupo estearilo y polietilenglicol (PEG).
15
4. Uso del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para fabricar una composición para mejorar una condición de la piel.
15
5. Uso del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para fabricar una composición para tratar una herida.
20
6. El uso según las reivindicaciones 4 a 5, en donde la composición comprende (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
25
7. El uso según la reivindicación 4, en donde el mejoramiento en la condición de la piel es el mejoramiento en las arrugas o elasticidad de la piel, la prevención del envejecimiento de la piel, la prevención de la pérdida del pelo, la promoción del crecimiento capilar, el mejoramiento de la hidratación de la piel, la eliminación de los puntos negros o el tratamiento del acné.

Fig. 1

Secuencia de aminoácidos de KGF y péptido 1

CNDMT PEQMA TNVNC SSPER HTRSY DYM EG GDIRV RRLFC RTQWY LRIDK
RGKV K GTQEM KNNYN IMEIR TVAVG IVAIK GVESE FYLAM NKEGK LYAKK
ECNED CNFKE LILEN HYNT Y ASAKW THNGG EMFVA LNQKG IPV RG KTKK
EQKTA HFLPM ATT

Péptido seleccionado 1 : YKSKKGGWTH

Secuencia de aminoácidos de aFGF y péptido 2

AEGEI TFTA LTEKF NLPPG NYKKP KLLYC SNGGH FLRIL PDGTV DGTRD
RSDQH IQLQL SAESV GEVYI KSTET GQYLA MDTDG LLYGS QTPNE ECLFL
ERLEE NHYNT YISKK HAEKN WFVGL KKNGS CKRGP RTHYG QKAIL FLPLP
VSSD

Péptido seleccionado 2: YISKKHAGKNWF

Secuencia de aminoácidos de TGF- α y péptido 3 y 4

VVSHF NDCPD SHTQF CFHAT CRFLV HEDKP ACVCH SGYVG ARCEH ADLLA

Péptido seleccionado 3: DSHTQYCFHGT

Péptido seleccionado 4: GYVGVRCEAADLDA

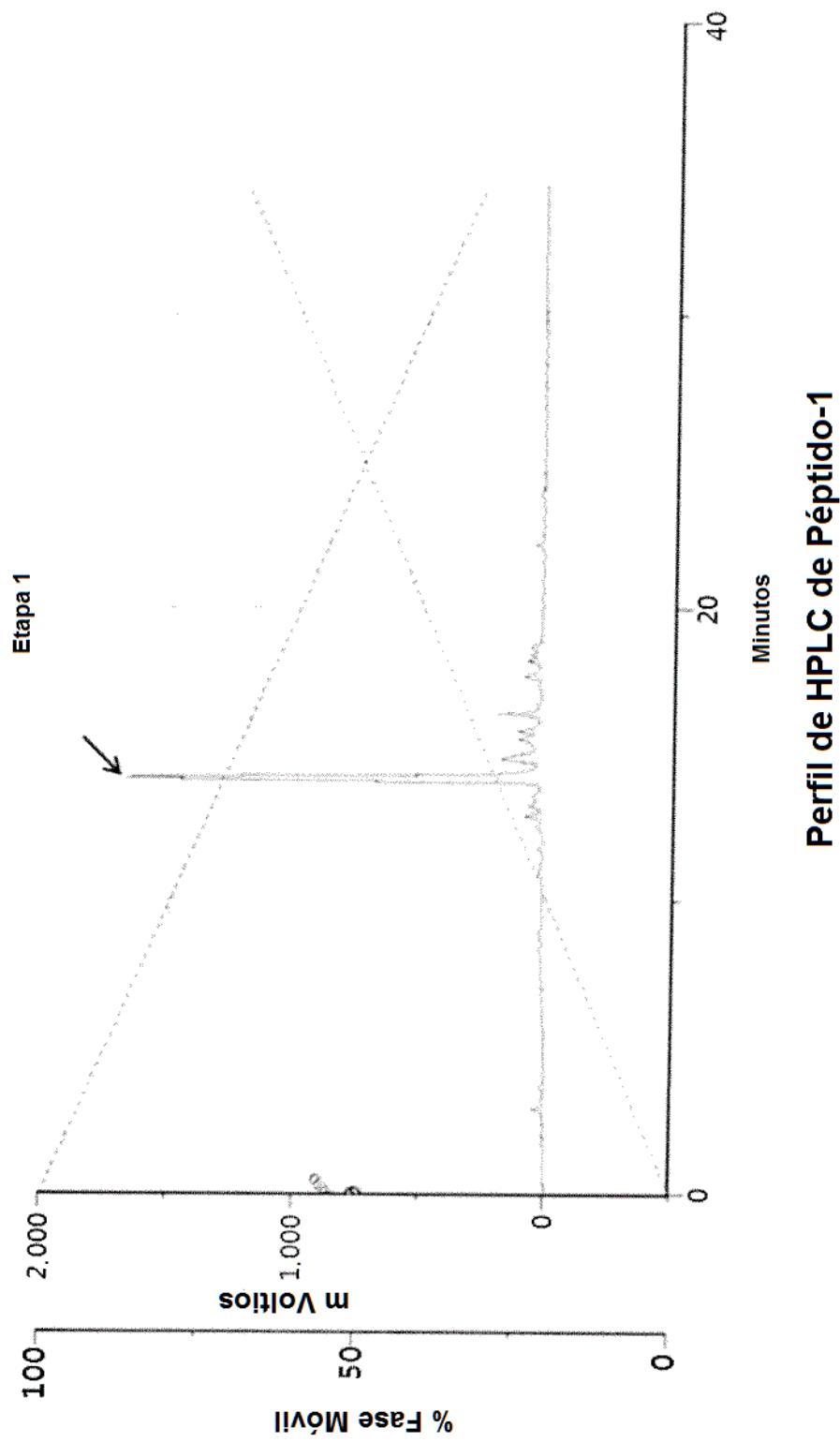
Fig. 2a

Fig. 2b

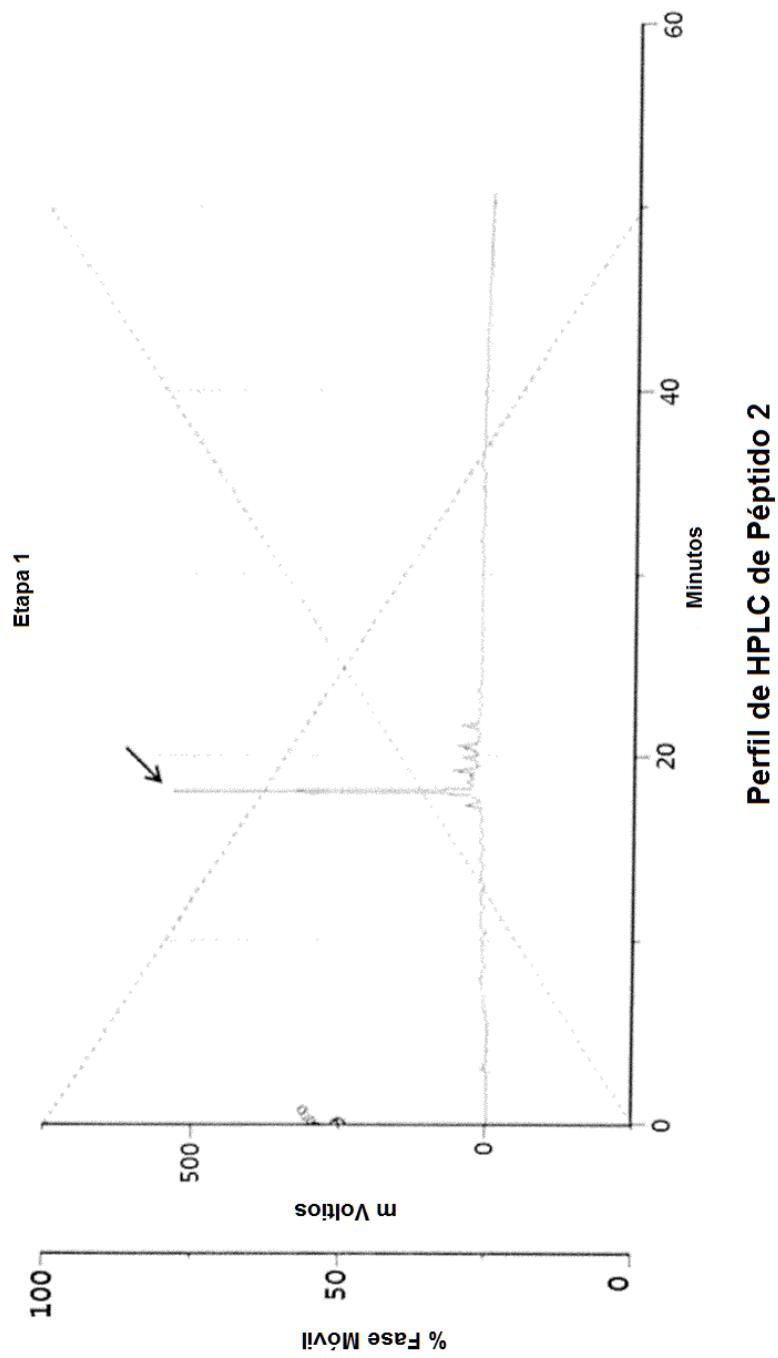


Fig. 2c

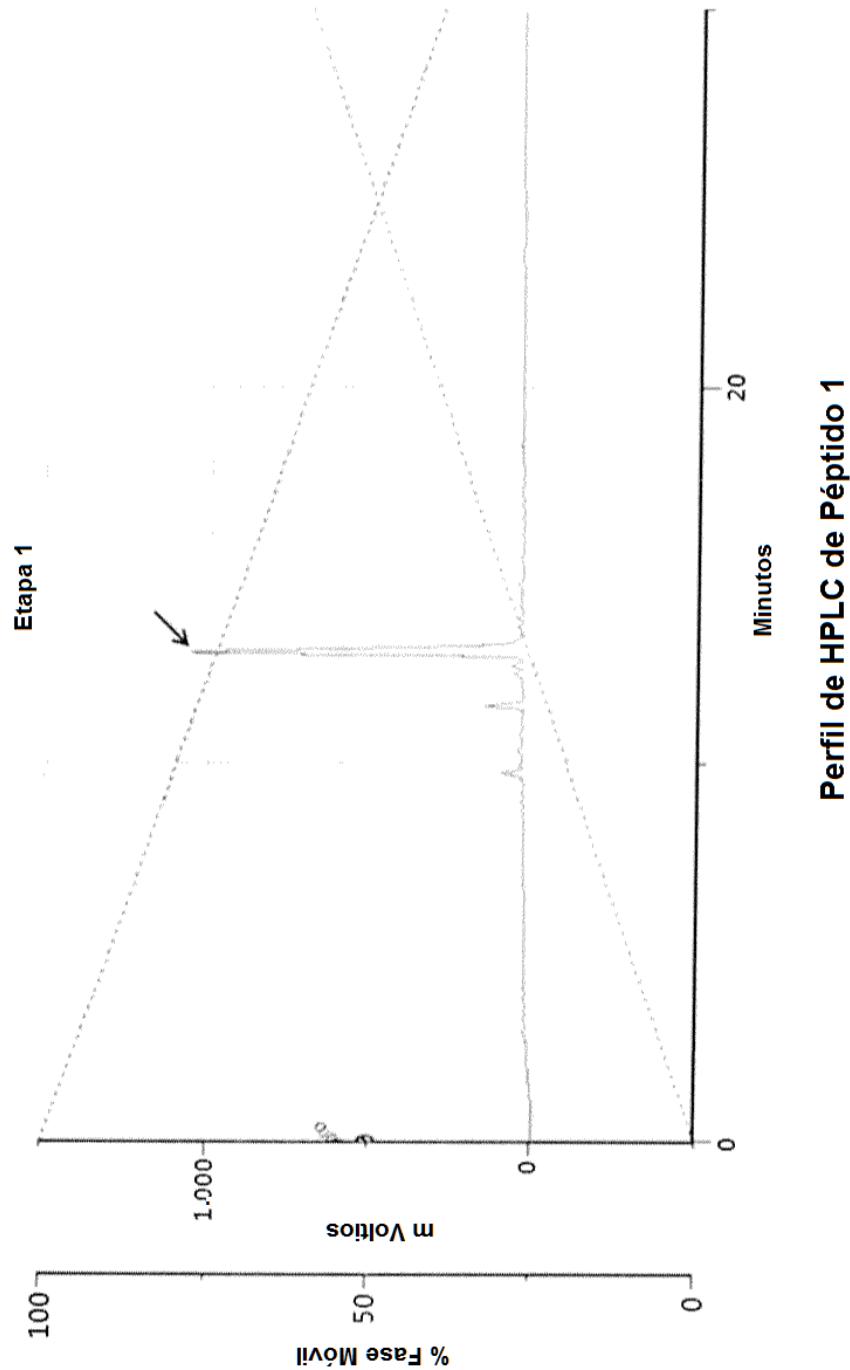


Fig. 2d

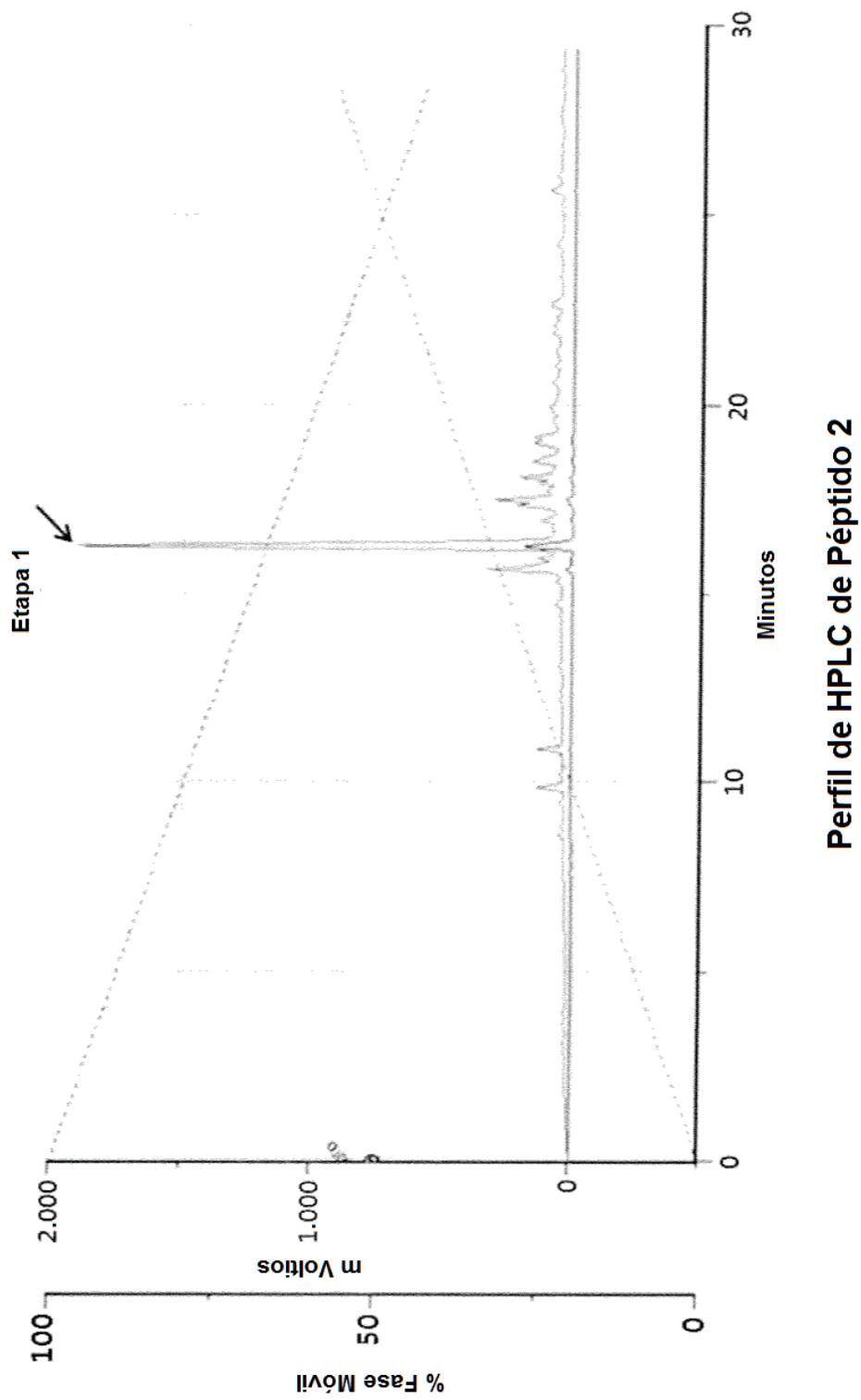


Fig. 3a

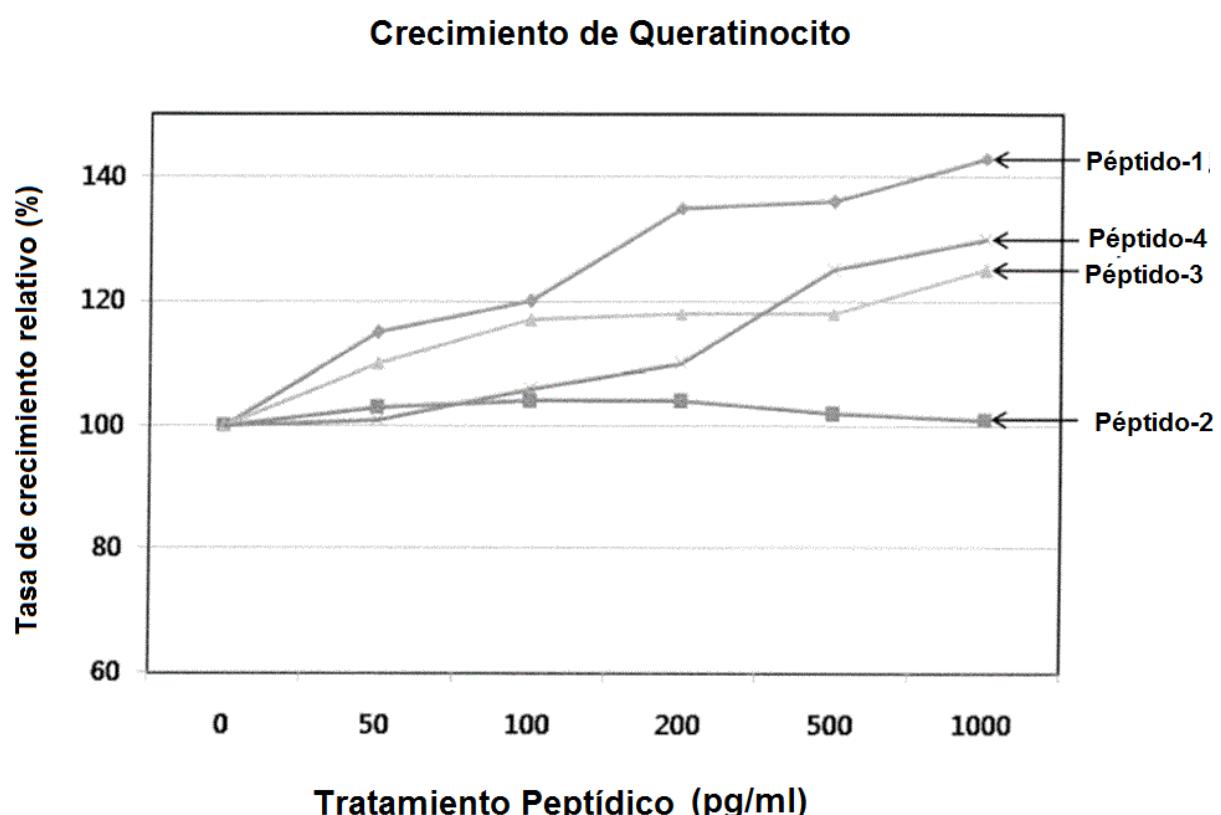


Fig. 3b

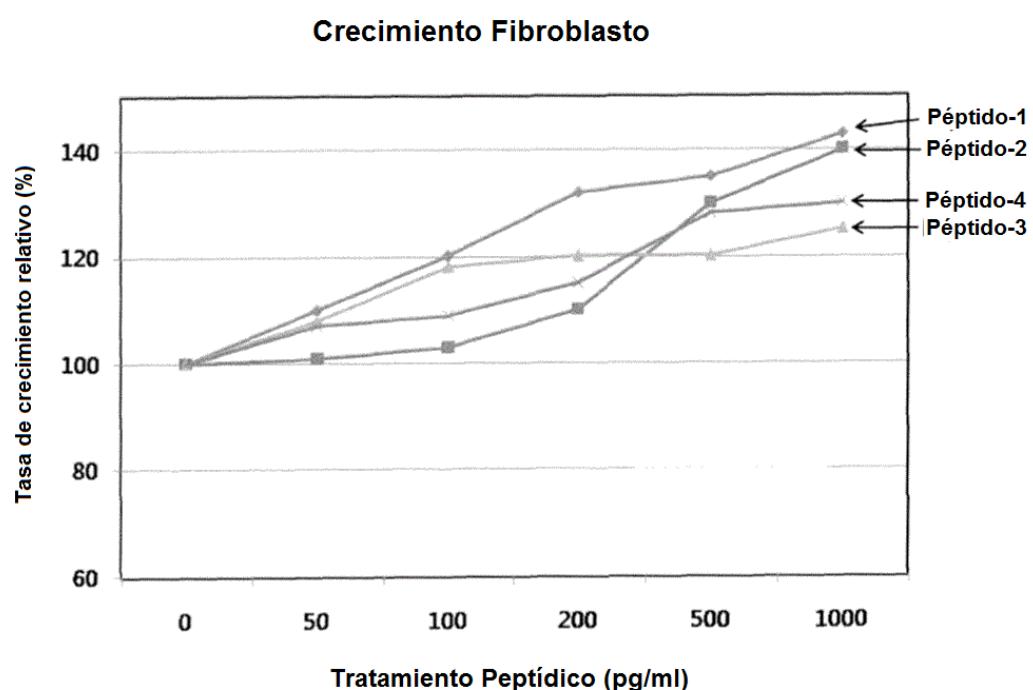


Fig. 4

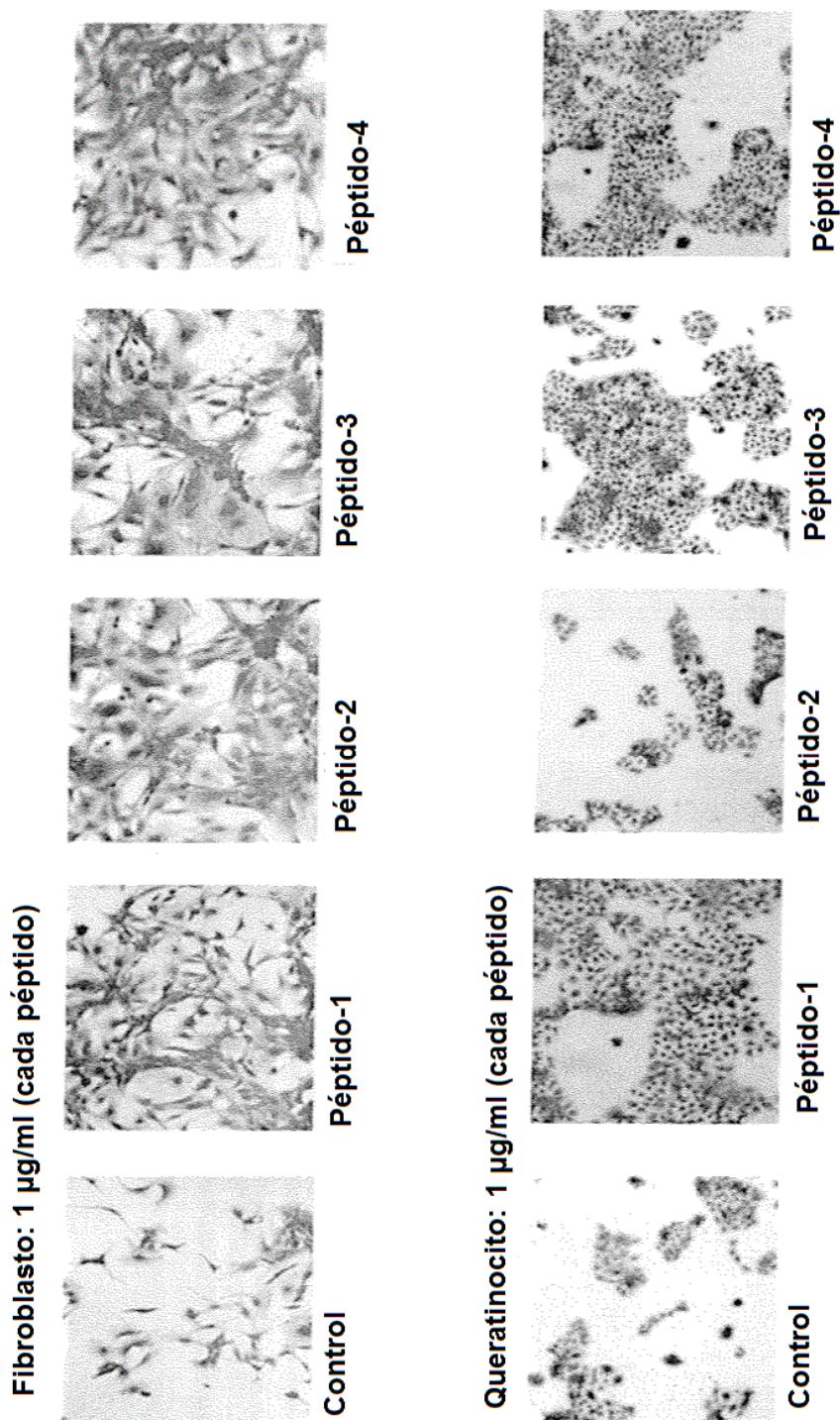


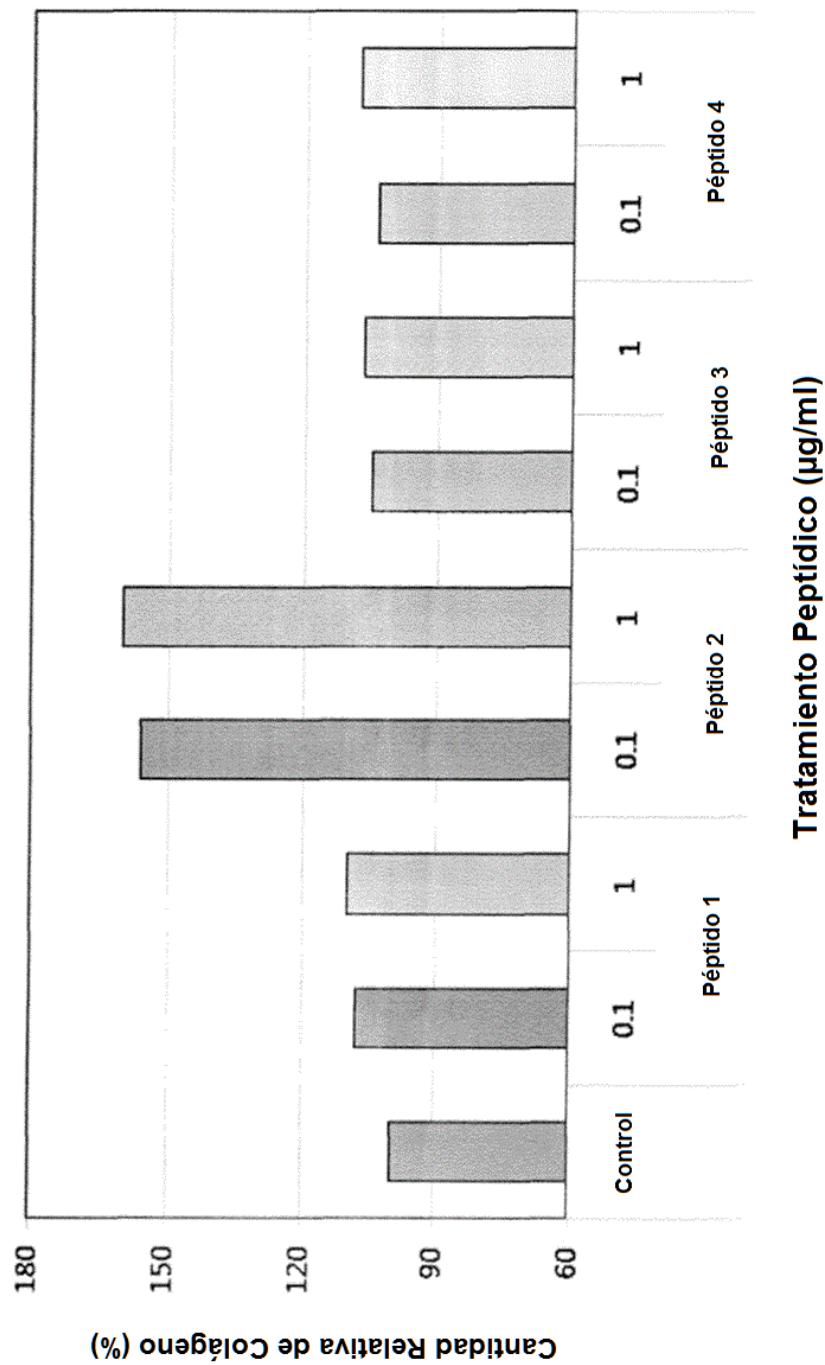
Fig. 5a

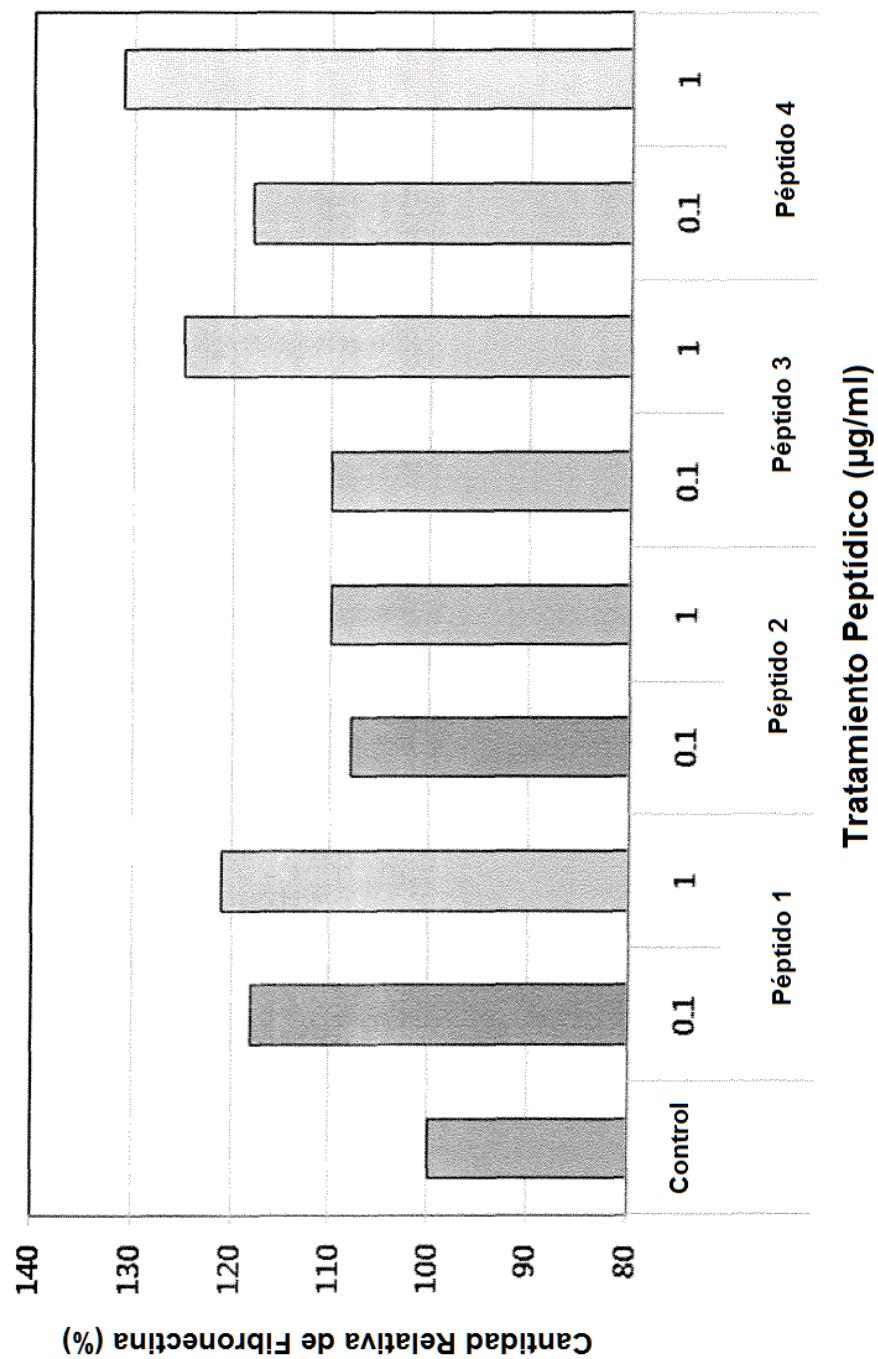
Fig. 5b

Fig. 6

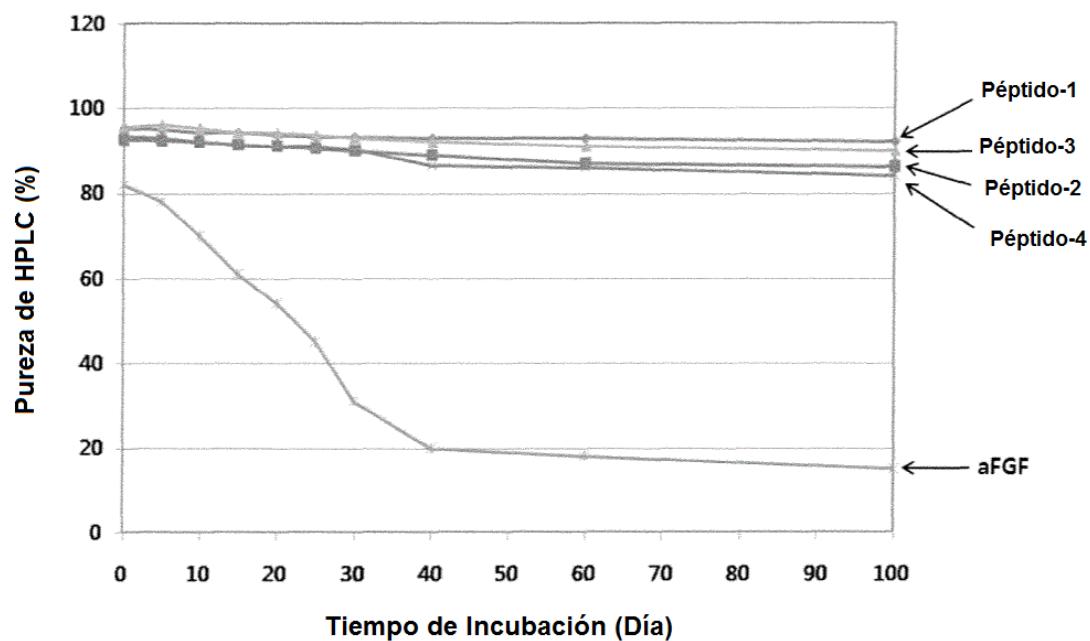


Fig. 7

Hidrogel

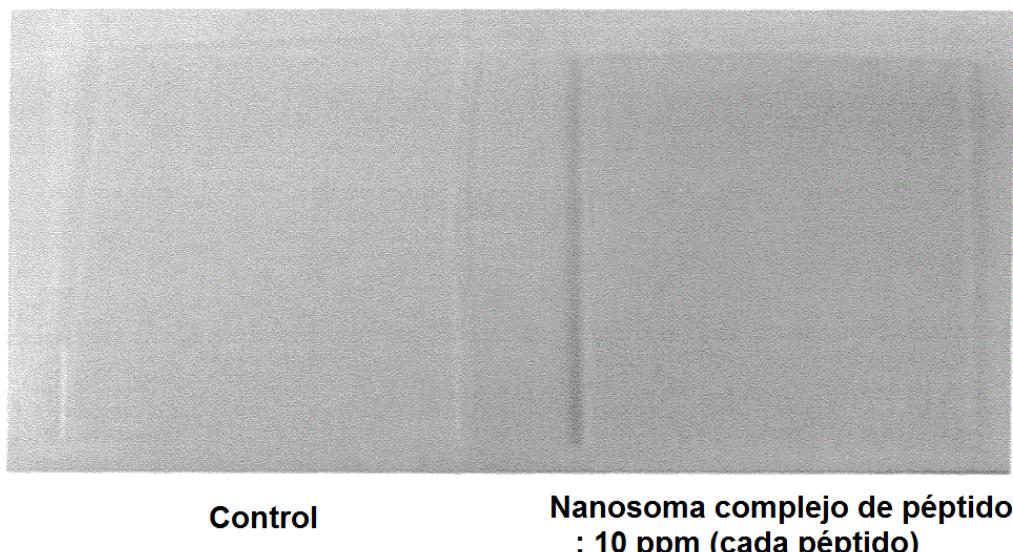
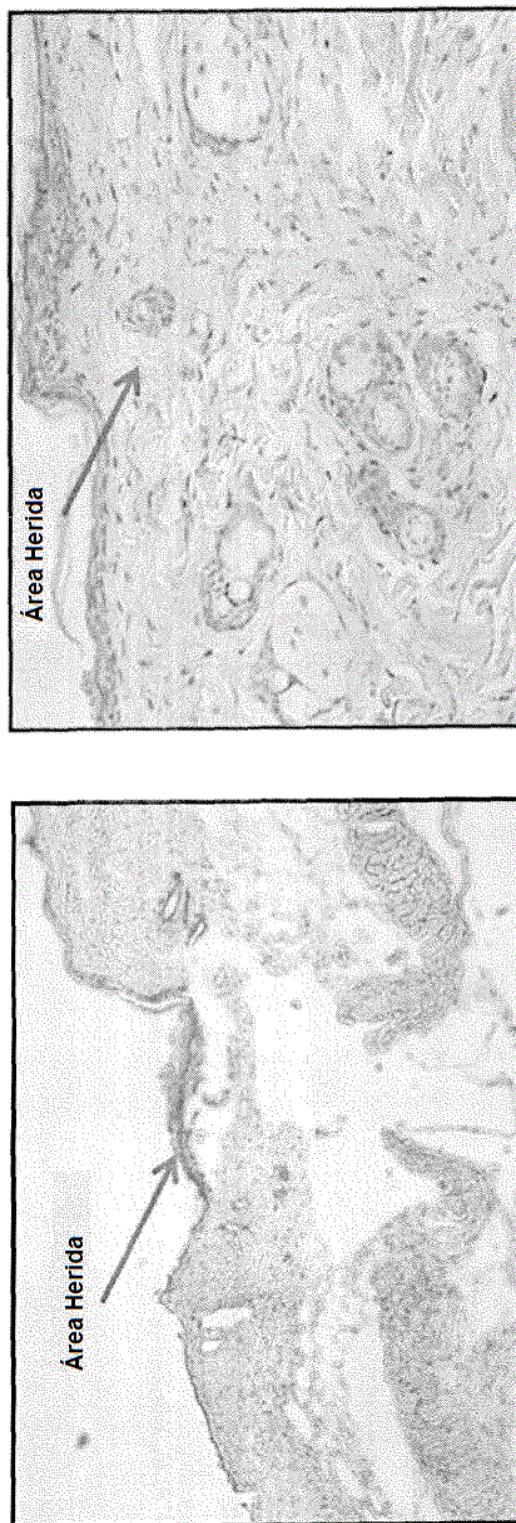


Fig. 8



Hidrogel con Nanosoma Complejo de Peptido

Control Solamente Hidrogel