

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 669**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/64** (2006.01)  
**A61Q 19/02** (2006.01)  
**A61K 8/11** (2006.01)  
**A61K 8/81** (2006.01)  
**A61K 8/85** (2006.01)  
**C07K 14/415** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2014 E 16178588 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 3095438**

54 Título: **Nuevos péptidos para la prevención y/o el tratamiento de manchas oscuras de la piel**

30 Prioridad:

**20.11.2013 EP 13382467**

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

**07.12.2017**

73 Titular/es:

**INFINITEC ACTIVOS S.L. (100.0%)  
Granollers 1-3 Nave 7, Poligono Industrial  
Raiguer  
08170 Montornés del Vallès, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**MOURELLE MANCINI, MARISABEL y  
CARCELLER MARGELI, MAGDALENA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 645 669 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

Nuevos péptidos para la prevención y/o el tratamiento de manchas oscuras de la piel

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de la farmacia y cosméticos, en particular, se refiere a nuevos péptidos para el uso cosmético para la prevención y/o tratamiento de las manchas oscuras de la piel.

**Antecedentes**

10 En dermatología, la hiperpigmentación es el oscurecimiento de un área de la piel o las uñas causada por un aumento o un exceso de producción de melanina. La melanina es producida por los melanocitos en la capa más profunda de la epidermis. La producción de melanina se denomina melanogénesis. Existen tres tipos básicos de melanina: eumelanina, feomelanina y neuromelanina.

15 El receptor de melanocortina 1 (MC1R) es conocido como un receptor periférico que se encuentra principalmente en distintas células cutáneas (melanocitos, queratinocitos, sebocitos y otros). MC1R está involucrado en las respuestas de la pigmentación y la inflamación, y en diversas células de melanoma, y se ha descubierto que controla las cantidades relativas de eumelanina y feomelanina en mamíferos. (Bednarek, M. et al., *Biopolymers*, 2008, 89(5), 401-408).

La hormona estimulante de  $\alpha$ -melanocitos ( $\alpha$ -MSH):

Ac-Ser<sup>1</sup>-Tyr<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Met<sup>4</sup>-Glu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Trp<sup>9</sup>-Gly<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Pro<sup>12</sup>-Val<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 1)

es un agonista endógeno para el MC1R.

A partir de estudios anteriores con  $\alpha$ -MSH y su análogo sintético (NDP- $\alpha$ -MSH):

20 Ac-Ser<sup>1</sup>-Tyr<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Nle<sup>4</sup>-Glu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-D-Phe<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Trp<sup>9</sup>-Gly<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Pro<sup>12</sup>-Val<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

se ha considerado que el segmento 6-9 (His<sup>6</sup>-D-Phe<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Trp<sup>9</sup>) es esencial para la interacción ligando-receptor.

25 Se sintetizaron análogos de los péptidos mencionados anteriormente con los siguientes diversos aminoácidos en lugar de Phe<sup>7</sup> y Trp<sup>9</sup> en NDP- $\alpha$ -MSH: Ala, Val, Cha, Lys, Glu, Phe, Pip, Pro, Oic, Tic, Sar, Gly. En vista de los resultados Bednarek *et al* concluyen que el residuo Trp<sup>9</sup> de NDP- $\alpha$ -MSH no es esencial para el reconocimiento molecular en el receptor de melanocortina 1 humano (hMC1bR).

30 El documento WO 2008/107533 desvela una combinación de al menos un inhibidor del receptor MC1R, un inhibidor de la tirosinasa derivado de la vitamina C y un inhibidor de la transferencia de melanosomas a los queratinocitos, para mejorar la actividad del inhibidor de la tirosinasa en el tratamiento de manchas oscuras en la piel. También describe el uso de la combinación en cosméticos y en dermatología para la preparación de composiciones para la despigmentación por blanqueamiento y/o decoloración.

Entre los inhibidores del receptor MC1-R, el documento WO 2008/107533 enumera la proteína Agouti, Melanostatine ®5 (nombre INCI: nonapéptido-1) y el lipo aminoácido undecilenoil fenilalanina comercializado con el nombre Sepiwhite MSH ®.

35 Melanostatine ®5 consiste en un nonapéptido sintético de los siguientes aminoácidos: Arg-Lys-Met-D-Phe-Phe-Pro-Pro-Trp-Val.

Sepiwhite es el nombre comercial de la N-undecil-10-enoil-L-fenilalanina. Sepiwhite es un antagonista notificado del receptor de la hormona estimulante de alfa-melanocitos ( $\alpha$ -MSH) que reduce la producción de melanina en melanocitos cultivados.

40 En los documentos WO2012/013136, WO2013/081147, KR2010/0097965, JP2006/062991 y CN101865925 se desvelan otros péptidos con efectos de blanqueamiento. Entre los inhibidores de la tirosinasa derivados de la vitamina C el documento WO 2008/107533 cita los esteres del ácido ascórbico, por ejemplo, el éster del ácido 2-glucósido ascórbico (nombre INCI: glucósido de ascorbilo, AA-2G) ácido 2-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-6-O-hexadecanoil-L-ascórbico, 6-palmitato de ascorbilo, sal de sodio o magnesio del ácido 2-fosfato ascórbico.

45 Como inhibidores de la transferencia de melanosomas, el documento WO 2008/107533 describe la nicotinamida (nombre INCI: niacinamida) y vitamina PP. En particular, describe una composición que comprende niacianimida (0,01 %-5 %), glucósido de ascorbilo (0,01 %-5 %) y melanostatine ® (0,1-40 ppm).

Se ha notificado que la combinación de N-undecil-10-enoil-L-fenilalanina (Sepiwhite) y niacinamida, es significativamente más eficaz que la niacinamida sola en la reducción de la hiperpigmentación facial. Se ha descubierto que la niacinamida inhibe la transferencia de melanosomas en células cultivadas y reduce la aparición

de manchas hiperpigmentadas en estudios clínicos. (Bissett, D.L., *J. Cosmet Dermatol*, 2009; 8 (4) 260-6).

Tal como se muestra en la técnica comentada anteriormente, existe un interés continuado en el hallazgo de nuevos componentes que sean útiles en la prevención y/o el tratamiento de las manchas oscuras cutáneas.

### Breve descripción de la invención

5 Los inventores han descubierto sorprendentemente un nuevo péptido de fórmula (II):



en la que

R<sub>5</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R<sub>7</sub>-C(O)- y R<sub>7</sub>-OC(O)-,

R<sub>6</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR<sub>7</sub>, -SR<sub>7</sub>, y -NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>,

10 R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> se seleccionan independientemente entre H-, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>,  
y sales aceptables y solvatos cosméticamente aceptables de los mismos.

Dicho péptido es útil en la prevención cosmética y/o el tratamiento cosmético de las manchas oscuras cutáneas. Por tanto, otro aspecto se refiere al uso del péptido de fórmula (II) como se ha definido anteriormente para la prevención cosmética y/o el tratamiento cosmético de las manchas oscuras cutáneas.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a composiciones que comprenden un péptido de fórmula (II) y uno o más agentes blanqueadores tales como arbutina, vitamina C, fosfato de ascorbilo, niacinamida, dinacondrina, un péptido inhibidor de la tirosinasa, tretinoína, hidroquinona, ácido kójico y ésteres del mismo con ácidos grasos, ácido azelaico, glutatión, extractos de *Cinnamomum subavenium*, alfa-hidroxiácidos tales como ácido láctico o ácido glicólico, niacinamida, ácido ferúlico, vitamina E, ácido eláxico, extractos de granada y mezclas de los mismos.

20 A continuación se describen estos aspectos y realizaciones preferidas de los mismos. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

### Descripción detallada de la invención

En el contexto de la presente invención, los siguientes términos tienen el significado que se detalla a continuación.

25 En el contexto de la presente invención, cuandoquiera que se mencione un aminoácido sin especificar su estereoquímica se ha de entender que la mención señala los estereoisómeros tanto D como L. Por ejemplo, cualquier mención a la leucina (o Leu) señala tanto la D-leucina como la L-leucina. Cuando se pretende una estereoisomería específica, esto se indica, por ejemplo D-Ala se usa para señalar el estereoisómero D de alanina.

30 Los grupos "alquilo" pueden ser ramificados o no ramificados, y preferentemente tienen de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono. Una clase más preferida de grupos alquilo tiene de 1 a aproximadamente 16 átomos de carbono y una clase más preferida de grupos alquilo tiene de 1 a 6 y de 14 a 18. Incluso se prefieren más los grupos alquilo que tienen 1, 2, 3, 4, 15, 16 o 17 átomos de carbono. Metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, isobutilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo son grupos alquilo particularmente preferidos en los compuestos de la presente invención. Otra clase preferida de grupos alquilo tiene de 6 a aproximadamente 10 átomos de carbono; e inclusive más preferentemente 7, 8 o 9 átomos de carbono. Heptilo, octilo y nonilo son los  
35 grupos alquilo más preferidos de esta clase.

La expresión "alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>" significa una cadena de hidrocarburo lineal o ramificado que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono en el mismo y que tiene de dos a doce átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo. El doble enlace de un grupo alquenilo puede estar sin conjugar o conjugado con otro grupo insaturado. Los grupos alquenilo adecuados incluyen, pero no se limitan a grupos alquenilo tales como  
40 vinilo, alilo, butenilo (por ejemplo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo), pentenilo (por ejemplo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo), hexenilo (por ejemplo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo, 5-hexenilo), butadienilo, pentadienilo (por ejemplo, 1,3-pentadienilo, 2,4-pentadienilo), hexadienilo (por ejemplo, 1,3-hexadienilo, 1,4-hexadienilo, 1,5-hexadienilo, 2,4-hexadienilo, 2,5-hexadienilo), 2-etilhexenilo (por ejemplo, 2-etilhex-1-enilo, 2-etilhex-2-enilo, 2-etilhex-3-enilo, 2-etilhex-4-enilo, 2-etilhex-5-enilo,), 2-propil-2-butenilo, 4,6-dimetil-oct-6-enilo. Un grupo alquenilo puede estar sin sustituir o sustituido con uno o dos sustituyentes adecuados.  
45

"Ariilo" en el presente documento se refiere a radicales de anillo individual o doble de 6 a aproximadamente 10 átomos de carbono en el anillo, tales como fenilo, naftilo o indenilo. El radical ariilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como hidroxilo, mercapto, halo, alquilo, fenilo, alcoxi, haloalquilo, nitro, ciano, dialquilamino, aminoalquilo, acilo, alcoxycarbonilo, etc.

50 Las sales cosméticamente aceptables de los péptidos proporcionados por la presente invención también están

dentro del alcance de la presente invención. La expresión “sales cosméticamente aceptables” significa una sal generalmente admitida para su uso en animales y más en particular en seres humanos, e incluye las sales utilizadas para formar sales de adición de bases, ya sea sales de adición de bases inorgánicas, tales como por ejemplo y en un sentido no limitante litio, sodio, potasio, calcio, magnesio o aluminio, entre otros, o sales de adición de bases orgánicas, tales como por ejemplo y en un sentido no limitante etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, arginina, lisina, histidina o piperazina entre otros, o sales de adición de ácido, ya sea sales de adición de ácidos orgánicos, tales como por ejemplo y en un sentido no limitante acetato, citrato, lactato, malonato, maleato, tartrato, fumarato, benzoato, aspartato, glutamato, succinato, oleato, trifluoroacetato, oxalato, pamoato o gluconato entre otros, o sales de adición de ácidos inorgánicos, tales como por ejemplo y en un sentido no limitante cloruro, sulfato, borato o carbonato entre otros. La naturaleza de la sal no es crítica, a condición de que sea cosméticamente aceptable. Las sales cosméticamente aceptables de los derivados peptídicos de la invención pueden obtenerse por métodos convencionales bien conocidos en el estado de la técnica [Berge S.M., Bighley L.D. y Monkhouse D.C. (1977) “*Pharmaceutical Salts*” *J. Pharm. Sci.* 66:1-19].

La expresión “compuesto de blanqueamiento cutáneo” o “agente de blanqueamiento cutáneo” se refiere a un compuesto capaz de aclarar y/o borrar las manchas oscuras en la piel. La presente invención se refiere como compuestos blanqueadores a compuestos que inhiben la actividad o expresión de la tirosinasa, es decir, en una realización de la presente invención, un “compuesto de blanqueamiento cutáneo” es un “inhibidor de la tirosinasa”. En una realización, el compuesto de blanqueamiento cutáneo se selecciona entre el grupo que consiste en arbutina, vitamina C, fosfato de ascorbilo de sodio, niacinamida, preferentemente niacinamida PC, un péptido inhibidor de la tirosinasa y mezclas de los mismos. En una realización preferida, el compuesto de blanqueamiento cutáneo se selecciona entre el grupo que consiste en arbutina, fosfato de ascorbilo de sodio, vitamina C, niacinamida PC, un péptido inhibidor de la tirosinasa, tretinoína, hidroquinona, ácido kójico y ésteres del mismo con ácidos grasos, ácido azelaico, glutatión, extractos de *Cinnamomum subavenium*, alfa-hidroxiácidos tales como ácido láctico o ácido glicólico, niacinamida, ácido ferúlico, vitamina E, ácido elágico, extractos de granada y mezclas de los mismos.

En una realización particular la mezcla de compuestos de blanqueamiento cutáneo se selecciona entre una mezcla de dos compuestos de blanqueamiento cutáneo, más preferentemente la mezcla de compuestos de blanqueamiento cutáneo se selecciona entre una mezcla de arbutina y fosfato de ascorbilo de sodio y una mezcla de niacinamida y fosfato de ascorbilo de sodio.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un péptido inhibidor de la tirosinasa de fórmula (II). El péptido de fórmula (II) actúa intracelularmente bloqueando o inhibiendo la actividad de la tirosinasa.

Preferentemente, el péptido inhibidor de la tirosinasa es un péptido de fórmula (II):



en la que

$R_5$  se selecciona entre el grupo que consiste en H-,  $R_7\text{-C(O)-}$  y  $R_7\text{-OC(O)-}$ ,

$R_6$  se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR<sub>7</sub>, -SR<sub>7</sub> y -NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>,

$R_7$  y  $R_8$  se seleccionan independientemente entre H-, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>,

y sales y solvatos cosméticamente aceptables de los mismos.

En una realización el péptido inhibidor de la tirosinasa es un péptido de fórmula:



en la que

$R_5$  se selecciona entre el grupo que consiste en H-,  $R_7\text{-C(O)-}$  y  $R_7\text{-OC(O)-}$ ,

$R_6$  se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR<sub>7</sub>, -SR<sub>7</sub> y -NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>,

$R_7$  y  $R_8$  se seleccionan independientemente entre H-, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>,

y sales y solvatos cosméticamente aceptables de los mismos.

En una realización  $R_7$  y  $R_8$  son H.

En una realización  $R_7$  es alcanilo C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>, preferentemente un alcanilo C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> seleccionado entre el grupo que consiste en acetilo, propanoilo, butanoilo, pentanoilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, nonanoilo, decanoilo, undecanoilo, dodecanoilo, tridecanoilo, tetradecanoilo, pentadecanoilo, hexadecanoilo, heptadecanoilo, octadecanoilo, nonadecanoilo e icosanoilo. En una realización preferida, el alcanilo seleccionado entre el grupo consiste en acetilo, propanoilo, pentadecanoilo, hexadecanoilo y heptadecanoilo. En una realización  $R_5$  es acetilo

(Ac). En otra realización R<sub>5</sub> es hexadecanoílo (o frecuentemente denominado palmitoílo (Palm)).

En una realización, cuando R<sub>6</sub> es-NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son H.

En una realización el péptido de fórmula (II) se selecciona entre el grupo:

Ac-Ile-Ser-DLeu-Leu-Asp-DAla-Gln-Ser-NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>

5 Ac-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-DAla-Gln-Ser-NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>

Ac-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub> [(SEQ ID NO: 3)-NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>]

Palm-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-DAla-Gln-Ser-NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>

Palm-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub> [(SEQ ID NO: 4)-NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>]

Palm-Ile-Ser-DLeu-Leu-Asp-DAla-Gln-Ser-NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>,

10 y sales y solvatos cosméticamente aceptables de los mismos,

en los que R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo, propilo y butilo.

Una "mancha oscura en la piel" o "mancha oscura cutánea" en el presente documento se refiere a la hiperpigmentación de la piel causada por el aumento de la melanina. La hiperpigmentación puede ser difusa o focal.

15 El "tratamiento cosmético" de la "mancha oscura en la piel" o "mancha oscura cutánea" se refiere a aclarar las manchas oscuras en la piel, eliminando (es decir, borrando) manchas oscuras en la piel, reduciendo el tamaño de las manchas oscuras en la piel y/o reduciendo el número de manchas oscuras en la piel.

La "prevención cosmética" de la "mancha oscura en la piel" o "mancha oscura cutánea" se refiere a prevenir la aparición de manchas oscuras en la piel, prevenir el oscurecimiento de las manchas oscuras en la piel ya existentes, y/o prevenir el aumento del tamaño de las manchas oscuras en la piel ya existentes.

20 Los términos excipientes o adyuvantes se refieren también a los vehículos. Dichos excipientes, adyuvantes o vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua, aceites o tensioactivos, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como por ejemplo y en un sentido no limitante aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, aceites de ricino, polisorbatos, ésteres de sorbitano, sulfatos de éter, sulfatos, betainas, glucósidos, maltósidos, alcoholes grasos, nonoxinoles, poloxámeros, polioxietilenos, polietilenglicoles, dextrosa, glicerol y similares. "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin describe diluyentes, adyuvantes o excipientes como vehículos adecuados.

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos de ciertas realizaciones de la invención y no se pueden considerar como restrictivos en modo alguno.

### Ejemplos

30 Ejemplo 1 Cultivo de melanocitos y procedimiento de incubación

Día 1 - Se hacen crecer melanocitos humanos por tripsinización y centrifugación a 1500 rpm (433 x g) en una centrífuga Allegra X-22R (Beckman Coulter) durante 5 minutos y después se resuspenden en 1 ml de un medio de cultivo completo para contar el número de células. Un volumen de 10 µl de la solución de células se tiñó con colorante azul de tripano y las células se cuentan con un hemocitómetro. Después, una solución de células se prepara a una concentración de 2.5 x10<sup>5</sup> células/ml en un medio completo y 100 µl de la suspensión de células es la semilla en pocillos de placas de 96 pocillos. Las placas se incuban a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %.

Día 2 - Las células de semilla se lavan y se tratan con los diferentes productos en condiciones basales y en condiciones promelanógenas. Para ello, se retira el medio de los pocillos y se añaden 100 µl de los productos en medio basal con FBS al 0,5 %. Anteriormente, los productos de ensayo se solubilizan en el mismo medio. Las placas se incuban a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante 5 días. Los experimentos se realizan usando 4 pocillos por condición. La acumulación de melanina en el interior de las células se controla a diario por microscopía óptica.

Días 3 y 4 - Todos los tratamientos se renuevan cada 24 horas.

Día 5 - Determinación de la viabilidad celular: Con el fin de determinar el número de células viables, se añaden 10 µl de CCK-8 (WST-8) en cada pocillo. Las placas se incuban a 37 °C durante 1 hora y la absorbancia se mide a 450 nm usando Synergy II multimodo (Biotek Instruments Inc., Winooski, Estados Unidos). La moda y la DE se calculan para cada concentración usando la aplicación Microsoft Excel

Ejemplo 2. Determinación de melanina

Con el fin de determinar el contenido de melanina en las células tratadas como se describe en el ejemplo 1, el medio se retira de cada pocillo y las células se lavan con PBS 1 N y se incuban durante 3 días a 37 °C facilitando la solubilización de la melanina en NaOH.

- 5 Día 7 - Una vez que la solubilización de la melanina está completa, se añaden 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MilliQ por pocillo y el contenido se determina por absorbancia usando un Synergy II (Biotek Instruments Inc., Winooski, EE.UU.) a 390 nm. La moda y la DE se calculan para cada concentración.

Ejemplo 3. Determinación de melanina e inhibición de la actividad de la tirosinasa de seta

Se determinó la actividad de varios péptidos de fórmula (II) (enumerados en la Tabla 1 a continuación) para reducir la melanina como se explica en el ejemplo 2 después de tratar las células como se explica en el ejemplo 1.

- 10 La actividad de varios péptidos de fórmula (II) para inhibir la actividad de la tirosinasa se determinó como se explica a continuación:

15 El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos; se dosificaron en cada pocillo 100 µl de mezcla de reacción que contenía PBS pH 6,5, 25 µl de L-tirosina (1.5 mM) y 20 µl de los compuestos a diferentes concentraciones. Después, se añadieron 15 U de tirosinasa de seta (20 µl) a cada pocillo. También se sometió a ensayo una mezcla de reacción sin la adición de ningún compuesto y se usó como control de actividad máxima. Los pocillos sin enzima sirvieron como blanco de reactivo (control negativo). El ensayo se realizó usando un intervalo de concentraciones de compuesto de 0 a 100 µg/ml.

Las placas se incubaron a 30 °C durante 10 min y la cantidad de L-DOPA producida en la mezcla de reacción se midió usando el lector de placas Sinergy II (Biotek) a 490 nm.

- 20 La actividad se expresó como el % del máximo considerado el 100 %

SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN DE TIROSINASA	% DE CONTENIDO DE MELANINA
Ac-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-NH <sub>2</sub>	28	87
Ac-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-(d)Ala-Gln-Ser-NH <sub>2</sub>	31	80
Ac-Ile-Ser-(d)Leu-Leu-Asp-(d)Ala-Gln-Ser-NH <sub>2</sub>	40	68
Palm-Ile-Ser-(d)Leu-Leu-Asp-(d)Ala-Gln-Ser-NH <sub>2</sub>	48	65
Palm-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-(d)Ala-Gln-Ser-NH <sub>2</sub>	42	78
Palm-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-NH <sub>2</sub>	39	85

Tabla 1

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> INFINITEC ACTIVOS, S.L.
- 25 <120> NUEVOS PÉPTIDOS PARA LA PREVENCIÓN Y/O EL TRATAMIENTO DE MANCHAS OSCURAS DE LA PIEL
- <130> P10071EPPC01
- <150> EP14800064.9
- <151> 20-11-2014
- <160> 4
- 30 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 35 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN  
 <220>

5 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 1

**Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val**  
**1 5 10**

10 <210> 2  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

15 <223> Péptido inhibidor de la tirosinasa  
 <400> 2

**Ile Ser Leu Leu Asp Ala Gln Ser**  
**1 5**

<210> 3  
 <211> 8

20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

<223> Péptido inhibidor de la tirosinasa  
 <220>

25 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN  
 <220>

<221> MOD\_RES

30 <222> (8)..(8)  
 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 3

**Ile Ser Leu Leu Asp Ala Gln Ser**  
**1 5**

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido inhibidor de la tirosinasa

<220>

<221> LÍPIDO

<222> (1) .. (1)

<223> PALMITATO

10 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (8) .. (8)

<223> AMIDACIÓN

<400> 4

15           Ile Ser Leu Leu Asp Ala Gln Ser  
              1                               5

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido de fórmula (II):  
R<sub>5</sub>-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-R<sub>6</sub>      R<sub>5</sub>-[(SEQ ID NO: 2)-R<sub>6</sub>] (II)  
en la que
- 5      R<sub>5</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R<sub>7</sub>-C(O)- y R<sub>7</sub>-OC(O)-;  
R<sub>6</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR<sub>7</sub>, -SR<sub>7</sub>, y -NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>;  
R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> se seleccionan independientemente entre H-, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>;  
y sales y solvatos cosméticamente aceptables del mismo.
- 10      2. Uso no terapéutico del péptido de fórmula (II) como se define en la reivindicación 1 para la prevención  
cosmética y/o el tratamiento cosmético de las manchas oscuras cutáneas.
- 15      3. Una composición que comprende un péptido de fórmula (II) como se define en la reivindicación 1 y uno o  
más agentes blanqueadores seleccionados entre el grupo que consiste en arbutina, vitamina C, fosfato de  
ascorbilo, niacinamida, dinacondrina, un péptido inhibidor de la tirosinasa, tretinoína, hidroquinona, ácido  
kójico y ésteres del mismo con ácidos grasos, ácido azelaico, glutatión, extractos de *Cinnamomum*  
*subavenium*, alfa-hidroxiácidos tales como ácido láctico o ácido glicólico, niacinamida, ácido ferúlico,  
vitamina E, ácido elágico, extractos de granada y mezclas de los mismos.