

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 859**

51 Int. Cl.:

**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2013 PCT/KR2013/009601**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14185604**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2013 E 13884437 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2998313**

54 Título: **Péptido para inducir apoptosis específica de mastocitos y su uso**

30 Prioridad:

**13.05.2013 KR 20130053779**

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

**20.03.2019**

73 Titular/es:

**CAREGEN CO., LTD. (100.0%)  
46-38 LS-ro 91beon-gil Dongan-gu  
Anyang-si, Gyeonggi-do 431-848, KR**

72 Inventor/es:

**CHUNG, YONG JI;  
KIM, EUN MI;  
LEE, EUNG-JI;  
LEE, TAE-HOON y  
LEE, YOUNG-MIN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 704 859 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 para inducir apoptosis específica de mastocitos y su uso

**Campo técnico**

5 La presente solicitud de patente reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud de patente coreana N.º 10-2013-0053779 presentada en la Oficina de Propiedad Intelectual de Corea el 13 de mayo de 2013.

La presente invención se refiere a un péptido para inducir apoptosis específica de mastocitos y un uso del mismo.

**Antecedentes de la técnica**

10 Las reacciones de hipersensibilidad generalmente conocidas como alergias se llaman respuestas inmunes anormales contra antígenos. Estas reacciones se clasifican en cuatro tipos principales de acuerdo con la clasificación de Gell & Coombs: reacción de hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE, reacción de hipersensibilidad de tipo II mediada por anticuerpos, reacción de hipersensibilidad de tipo III mediada por complejos inmunes y reacción de hipersensibilidad de tipo IV mediada por interacciones entre células que presentan antígenos y linfocitos T. Las enfermedades alérgicas que se encuentran comúnmente en los alrededores son en su mayoría causadas por una reacción de hipersensibilidad de tipo I, e incluyen rinitis alérgica, asma, dermatitis alérgica y similares. Hay alimentos, como nueces y huevos, polen, ácaros del polvo y algunos medicamentos que son alérgenos bien conocidos (antígenos). Estos alérgenos se combinan con IgE, unidos a las subunidades  $\alpha$  de Fc $\epsilon$ RI, que es un receptor de IgE de mastocitos y forma complejos junto con las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , lo que permite la señalización de los receptores. A través de este procedimiento, se induce la degranulación de los mastocitos para activar la secreción de histamina, beta-hexosaminidasa, prostaglandina, leucotrieno, interleuquina (IL)-4, IL-5, IL-6 y TNF - $\alpha$ , que son factores que causan respuestas de prurito o inflamación. Las acciones de estos factores pueden ser factores agravantes de las reacciones alérgicas por la activación de la producción de IgE de los linfocitos B. Se sabe que los niveles altos de IgE en suero realmente se observan en pacientes alérgicos y, por lo tanto, la entrada de alérgenos provoca fácilmente reacciones de hipersensibilidad (Allergy Asthma Immunol Res., 5 (3): 170-174(2013)).

15 Las enfermedades se clasifican de acuerdo con el área en la que se observa una reacción de hipersensibilidad tipo I. La reacción de hipersensibilidad da como resultado rinitis alérgica en la mucosa nasal, asma en la mucosa de las vías respiratorias o tubos bronquiales y dermatitis atópica en la piel.

20 La tasa de prevalencia de la dermatitis atópica en personas mayores de 1 año fue del 6,1 % según los resultados de la Encuesta nacional de examen de salud y nutrición (Encuesta nacional de examen de salud y nutrición, Ministerio de Salud y Bienestar) informada en 2010 y la tasa de prevalencia de dermatitis atópica en adolescentes de 13 a 18 años de edad fue del 23,1 % en la Encuesta en línea sobre el comportamiento de la salud de los jóvenes de 2011 (encuesta en línea sobre el comportamiento de la salud de los jóvenes, Ministerio de Salud y Bienestar). Las lesiones comienzan debido a alérgenos generales o estimulación de IgE, y los pacientes se rascan las partes afectadas debido al prurito causado por la estimulación de la histamina secretada por la degranulación de los mastocitos, que da como resultado, en segundo lugar, la entrada de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, y similares, que son la flora de la piel. Se sabe que la entrada de dichos antígenos extraños puede causar respuestas inflamatorias adicionales en las partes afectadas o empeorar las enfermedades (Allergy Asthma Proc., May-Jun; 33(2012)).

25 Los agentes terapéuticos para la dermatitis atópica incluyen esteroides que muestran acciones antiinflamatorias a través de efectos inmunosupresores, antihistamínicos que bloquean la liberación de histamina de los mastocitos, antibióticos y similares. Sin embargo, la utilización de esteroides durante un largo período de tiempo causa efectos secundarios, como el crecimiento del vello, el adelgazamiento de la piel y la infección bacteriana, y la abstinencia de esteroides provoca un agravamiento rápido de los síntomas. Se ha informado que la utilización de antihistamínicos durante un largo período de tiempo causa efectos secundarios, como insomnio, ansiedad y pérdida de apetito. La utilización de antibióticos durante un largo período de tiempo también causa efectos secundarios, tales como resistencia a los antibióticos. Por lo tanto, se requiere el desarrollo de agentes terapéuticos más eficaces capaces de minimizar los efectos secundarios.

30 Las proteínas *in vivo* pueden minimizar los efectos secundarios debido a su alta biocompatibilidad. Sin embargo, las proteínas en sí tienen una estabilidad demasiado baja y altos costes de producción para la utilización como agentes terapéuticos. Las preparaciones de péptidos que utilizan regiones eficaces particulares de las proteínas *in vivo* tienen las mismas eficacias y pueden resolver problemas en asociación con la estabilidad y los costes de producción. Por lo tanto, los investigadores actuales realizaron una investigación que utiliza los efectos antialérgicos de los péptidos procedentes de proteínas *in vivo*, capaces de suprimir la activación de mastocitos.

35 La semaforina 3A es una de las proteínas semaforinas que tiene un dominio común rico en cisteína denominado dominio Sema. La proteína semaforina se conoció por primera vez como un factor de guía de axón repulsivo en el proceso de desarrollo del sistema nervioso. Las semaforinas de clase 3 son proteínas secretadas, incluyen seis tipos que van desde Sema3A a Sema3F, y emiten señales para formar complejos de receptores junto con el receptor de Plexina A y el receptor de Neurofilina. Como se sabe, en las primeras etapas, la semaforina 3A guía la contracción

de las neuronas sensibles al factor de crecimiento nervioso (NGF, de sus siglas en inglés) o se expresa a partir de células dendríticas y linfocitos T activados, regulando así el crecimiento de linfocitos T o la secreción de citocinas.

5 El documento WO2011/055550 desvela un fragmento de semaforina 3A humana que se utilizó como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedad intestinal inflamatoria, esclerosis múltiple, artritis, dermatitis y psoriasis.

El documento WO03/035100 desvela un péptido que comprende fragmentos de semaforina 3A, especialmente su dominio de unión que se utiliza como un modulador de la neurofilina y como un agente terapéutico para el tratamiento de alergias, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias, artritis, dermatitis y psoriasis.

10 El documento WO2010/064207 desvela péptidos procedentes de la semaforina 3A que se unen a la neurofilina 1 humana que incluye un péptido de unión a NRP1. Estos se desvelan como partes de proteínas de fusión, y la actividad de las proteínas de fusión se prueba en varias líneas celulares, incluidas las líneas celulares de cáncer.

Fukamachi y col. (Journal of Dermatological Science 61 (2011)), págs. 118-123, desvela la posibilidad de modular la expresión de semaforina 3A mediante la concentración de calcio e histamina.

15 A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a varias patentes y publicaciones, y las citas se proporcionan entre paréntesis.

### **Descripción detallada de la invención**

#### **Problema técnico**

20 Los presentes inventores se han esforzado por desarrollar un material que tenga una excelente actividad y estabilidad en comparación con la proteína semaforina 3A natural, a la vez que conservan las mismas funciones o funciones similares a las de la semaforina 3A. Como resultado, los presentes inventores han seleccionado un péptido derivado de semaforina 3A que tiene una bioactividad excelente (por ejemplo, la inducción de la apoptosis específica de mastocitos, la supresión de la actividad de mastocitos, la inhibición de la señalización de la proteína FcεRI, etc.) entre muchos candidatos peptídicos, y luego han completado la presente invención.

25 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar un péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1 de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades inmunes mediadas por Th2 de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades autoinmunes de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

30 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias inducidas por mastocitos de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

También se desvela un procedimiento para seleccionar un agente terapéutico para la enfermedad inducida por mastocitos.

También se desvela un procedimiento para prevenir o tratar enfermedades inmunes mediadas por Th2.

35 También se desvela un procedimiento para prevenir o tratar enfermedades autoinmunes.

También se desvela un procedimiento para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias inducidas por mastocitos.

Otros fines y ventajas de la presente divulgación serán más obvios con la siguiente descripción detallada de la invención, las reivindicaciones y los dibujos.

#### **Solución técnica**

40 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con la reivindicación adjunta.

45 Los presentes inventores se han esforzado por desarrollar un material que tenga una excelente actividad y estabilidad en comparación con la proteína semaforina A natural, a la vez que conservan las mismas funciones o funciones similares a las de la semaforina 3A. Como resultado, los presentes inventores han seleccionado un péptido derivado de semaforina 3A que tiene una bioactividad excelente (por ejemplo, la inducción de la apoptosis específica de mastocitos, la supresión de la actividad de mastocitos, la inhibición de la señalización de la proteína FcεRI, etc.) entre muchos candidatos peptídicos.

Las semaforinas son una gran familia de proteínas que incluye proteínas secretadas y de unión a la membrana, y se caracterizan por un dominio extracelular que contiene un dominio de semaforina compuesto por 500 restos de

- aminoácidos. De estas, la semaforina 3A es una proteína secretada que pertenece a la familia de las semaforinas de clase 3, y se sabe que realiza varias funciones intracelulares, como la regulación de los procedimientos de desarrollo que incluyen la migración celular, la morfogénesis y la remodelación tisular, mediante la mediación de las señales repelentes celulares a través de receptores de neuropilinas y plexinas (PLXN), así como la guía de los axones neuronales. Estructuralmente, el dominio Sema presente en la semaforina es importante para funcionar como un módulo de interacción de proteínas durante el procedimiento de guía de axones. El dominio Sema también está presente en los receptores del factor de crecimiento de células hepáticas, proteínas sexuales y proteínas virales. El dominio Sema se caracteriza por un conjunto altamente conservado de restos de cisteína, que forman cuatro enlaces disulfuro para estabilizar estructuralmente las proteínas.
- Mientras tanto, se ha informado que la eliminación del gen de la semaforina 3A induce un desarrollo anormal del hueso y del cartílago, y que las moléculas de señalización relacionadas con la semaforina 3A (Semaforina 3A, Neuropilina-1, y plexinas PLXNA1 y PLXNA2) se expresan en la osificación endocondral. Esto significa roles latentes de los mismos en el desarrollo esquelético y la distribución neuronal.
- Los presentes inventores sintetizaron una pluralidad de péptidos procedentes de semaforina 3A que exhiben las características descritas anteriormente, basadas en fracciones asociadas con funciones de la semaforina 3A humana. Más específicamente, los presentes inventores prepararon de forma selectiva péptidos de la presente invención mediante la síntesis parcialmente arbitrariamente de varias fracciones de la proteína semaforina 3A para buscar primero las fracciones que pueden unirse a proteínas receptoras, y luego optimizar las secuencias de aminoácidos de las fracciones previstas. De estos péptidos candidatos, se seleccionó un péptido que tenía la actividad más excelente y, por lo tanto, se preparó el péptido de la SEQ ID NO: 1 de la presente invención.
- De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, el péptido de la SEQ ID NO: 1 de la presente invención procede de la semaforina 3A humana (Número de Acceso de GenBank, NP\_006071; SEQ ID NO: 2), y se muestra en la tabla 1.
- El péptido de la presente invención tiene funciones de semaforina 3A humana natural (por ejemplo, actividad antialérgica) y mostró de manera eficaz la inducción de apoptosis específica de mastocitos y la inhibición de la actividad de mastocitos (véanse las Figuras 2a-2c y las Figs. 3a-3b). Además, el péptido de la presente invención suprimió la formación de complejos del receptor FcεRI (véanse las figuras 4a-4c).
- De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, el péptido de la presente invención induce apoptosis específica de mastocitos.
- De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, el péptido de la presente invención reduce la cantidad de histamina secretada por los mastocitos e inhibe la actividad intercelular de la beta-hexosaminidasa.
- De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, el péptido de la presente invención inhibe la señalización de FcεRI. La señalización de FcεRI se inhibe mediante la supresión de la formación de complejos del receptor FcεRI, y la inhibición de la formación de complejos del receptor FcεRI se puede verificar a través de la inhibición de la fosforilación de ERK1/2, p38 o Lyn.
- El término utilizado en el presente documento "péptido" se refiere a una molécula lineal formada mediante el enlace entre restos de aminoácidos a través de enlaces peptídicos. Los péptidos de la presente invención pueden prepararse mediante procedimientos de síntesis química convencionales conocidos por un experto en la materia, en particular, técnicas de síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-54 (1963); Stewart, y col., Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111 (1984)).
- El péptido de la presente invención en sí tiene una excelente estabilidad en comparación con la proteína semaforina 3A natural, pero su estabilidad puede mejorarse aún más a través de la modificación de aminoácidos.
- De acuerdo con la presente invención, el péptido de la presente invención tiene una estabilidad térmica muy excelente en comparación con la proteína semaforina 3A natural. La proteína semaforina 3A natural tiene una estabilidad baja en el momento del almacenamiento durante un largo período de tiempo, así como dificultades en la preparación y altos costes de producción. Sin embargo, el péptido de la presente invención puede producirse en masa a un coste muy bajo, y puede prevenir al máximo el deterioro en la bioactividad debido a la estabilidad física y química a altas temperaturas, y tiene además efectos terapéuticos mejorados por el incremento del período restante *in vivo* (véase la Figura 5). Por lo tanto, el péptido de la presente invención se puede aplicar favorablemente a un producto que requiera un almacenamiento a largo plazo, como medicamentos, cuasi medicamentos y cosméticos.
- De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, el extremo N o el extremo C del péptido puede modificarse en un grupo hidroxilo (-OH), un grupo amino (-NH<sub>2</sub>), un grupo azida (-NHNH<sub>2</sub>), o similares.
- De acuerdo con una realización preferida, los péptidos de la presente invención tienen en su extremo N un grupo de protección seleccionado del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenilmetoxicarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y un polietilenglicol (PEG).

Las modificaciones de los péptidos descritas anteriormente aumentan en gran medida la estabilidad de los péptidos de la presente invención. El término utilizado en el presente documento "estabilidad" se refiere a la estabilidad *in vivo* y, también, a la estabilidad de almacenamiento (por ejemplo, estabilidad de almacenamiento a temperatura ambiente). El grupo de protección descrito anteriormente protege los péptidos del ataque de la proteasa *in vivo*.

- 5 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades inmunes mediadas por Th2, que contiene el péptido anterior como principio activo.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades autoinmunes, que contiene el péptido anterior como principio activo.

- 10 Dado que la presente composición comprende los péptidos procedentes de la semaforina 3A de la presente invención como principios activos descritos anteriormente, las descripciones comunes entre ellos se omiten para evitar redundancias indebidas que conducen a la complejidad de la presente especificación.

- 15 De acuerdo con la presente invención, las enfermedades inmunes mediadas por Th2 de la presente invención son rinitis alérgica, asma bronquial, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, conjuntivitis alérgica, urticaria, edema vascular, alergia alimentaria, alergia física, neumonitis hipersensible, enfermedades alérgicas ocupacionales, o alergia a fármacos.

De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, las enfermedades autoinmunes de la presente invención se causan a través de la activación de la ruta mediada por la Lyn quinasa, y la activación de la ruta mediada por la Lyn quinasa se desencadena a través de un aumento en la fosforilación de la Lyn quinasa.

- 20 De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, las enfermedades autoinmunes de la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, obesidad, hiperlipidemia, diabetes, aterosclerosis y síndrome metabólico.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias inducidas por mastocitos, que contiene el péptido anterior como principio activo.

- 25 Dado que la presente composición comprende los péptidos procedentes de la semaforina 3A de la presente invención como principios activos descritos anteriormente, las descripciones comunes entre ellos se omiten para evitar redundancias indebidas que conducen a la complejidad de la presente especificación.

De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención induce apoptosis específica de mastocitos.

- 30 De acuerdo con la presente invención, las enfermedades inflamatorias inducidas por mastocitos son el asma, dermatitis atópica, psoriasis, cistitis intersticial, obesidad, esclerosis múltiple, enfermedad arterial coronaria (EAC), artritis, o enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

- 35 De acuerdo con una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica que contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido que tiene actividad de proteína semaforina 3A de la presente invención; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La expresión utilizada en el presente documento "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para mostrar y lograr las eficacias y actividades del péptido relacionado con la proteína semaforina 3A de la presente invención.

- 40 El vehículo farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente invención, que se utiliza comúnmente en formulaciones farmacéuticas, incluye, aunque sin limitaciones, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, caucho cultivable, fosfato potásico, arginato, gelatina, silicato de potasio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabes, metilcelulosa, benzoato de metilhidroxí, benzoato de propilhidroxí, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. La composición farmacéutica de la presente divulgación puede incluir además, además de los componentes descritos anteriormente, un lubricante, un agente humectante, un edulcorante, una fragancia, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante o similares. Los vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences (19<sup>a</sup> ed., 1995).

- 50 La composición farmacéutica de la presente divulgación puede administrarse por vía oral o parenteral. Para administración parenteral, se puede administrar por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraabdominal, transdermal o similar.

Una dosis apropiada de la composición farmacéutica de la presente divulgación puede determinarse de diversas maneras dependiendo de factores tales como el procedimiento de preparación, el procedimiento de administración, la edad, el peso corporal y el sexo del paciente, la condición patológica, la dieta, el tiempo de administración, la ruta de administración, la tasa de excreción o la sensibilidad de respuesta. Una dosis recomendada de la composición

farmacéutica de la presente divulgación es de 0,0005-1.000 mg/kg por día.

5 La composición farmacéutica de la presente divulgación puede prepararse en una forma de dosificación unitaria o en una forma de dosificación múltiple junto con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con un procedimiento que puede ser empleado fácilmente por los expertos en la materia. La formulación puede estar en forma de solución en medio aceitoso o acuoso, suspensión, emulsión, extracto, polvo, gránulo, comprimido, cápsula o gel (por ejemplo, hidrogel), y puede incluir además un dispersante o estabilizador.

La composición de la presente divulgación es una composición cosmética que comprende: (a) una cantidad cosméticamente eficaz del péptido relacionado con la semaforina 3A de la presente divulgación descrita anteriormente; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad cosméticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente de la composición de la presente divulgación para lograr eficacias cosméticas de la presente composición.

15 La composición cosmética de la presente divulgación puede formularse en cualquier forma comúnmente utilizada en la materia. Ejemplos no limitativos incluyen solución, suspensión, emulsión, pasta, gel, crema, loción, polvo, jabón, limpiador que contiene surfactante, aceite, base en polvo, base de emulsión, base de cera, pulverizador, etc. Más específicamente, puede prepararse en loción calmante, loción nutritiva, crema nutritiva, crema para masajes, esencia, crema para ojos, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, paquete, pulverizador o polvo.

Cuando la composición de la presente divulgación está en forma de pasta, crema o gel, puede utilizarse aceite animal, aceite vegetal, cera, parafina, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicol, silicona, bentonita, sílice, talco, óxido de zinc, etc. como vehículo.

20 Cuando la composición de la presente divulgación está en forma de polvo o pulverizador, puede utilizarse lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio o polvo de poliamida como vehículo. Especialmente, la pulverización puede comprender además un propulsor tal como hidroc fluorocarbono, propano/butano o dimetil éter.

25 Cuando la composición de la presente divulgación está en forma de solución o emulsión, puede utilizarse un disolvente, solubilizante o emulsionante como vehículo, cuyos ejemplos incluyen agua, etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol de bencilo, benzoato de bencilo, propilenglicol, aceite de 1,3 butilglicol, éster alifático de glicerol, propilenglicol o éster de ácido graso de sorbitán.

30 Cuando la composición de la presente divulgación está en forma de suspensión, puede utilizarse un diluyente líquido tal como agua, etanol o propilenglicol, una suspensión tal como alcohol isoestearílico etoxilado, éster de polioxietileno sorbitol y éster de polioxietileno sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar, tragacanto, etc. como vehículo.

35 Cuando la composición de la presente divulgación está en forma de limpiador que contiene un surfactante, puede utilizarse sulfato de alcohol alifático, sulfato de alcohol éter alifático, monoéster de ácido sulfosuccínico, isetionato, derivados de imidazolinio, taurato de metilo, sarcosinato, amida de ácido graso éter sulfato, alquilamidobetaína, alcohol alifático, glicéridos de ácidos grasos, dietanolamida de ácidos grasos, aceite vegetal, derivados de lanolina, ésteres de ácidos grasos de glicerol etoxilados, etc. como vehículo.

40 Además del péptido como el principio activo y los ingredientes vehículos, la composición cosmética de la presente divulgación puede comprender además aquellos ingredientes comúnmente utilizados en composiciones cosméticas. Los ejemplos incluyen adyuvantes comunes tales como antioxidantes, estabilizantes, solubilizantes, vitaminas, pigmentos y fragancias.

45 También se desvela un procedimiento para seleccionar un agente terapéutico para la enfermedad inflamatoria inducida por mastocitos, incluyendo el procedimiento: (a) tratar células que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica para semaforina 3A con un material de prueba; y (b) analizar la expresión o actividad de la proteína semaforina 3A intracelular, en el que el material de prueba se determina como un agente terapéutico de la enfermedad inflamatoria inducida por mastocitos si el material de prueba suprime la formación del complejo del receptor FcεRI mediante la sobreexpresión de la proteína semaforina 3A o el incremento de la actividad de la proteína semaforina 3A.

50 Dado que el procedimiento de la presente invención implica la proteína semaforina 3A que contiene el anterior péptido procedente de semaforina 3A de la presente invención, las descripciones de los contenidos superpuestos entre las dos se omiten para evitar una complejidad excesiva de la especificación debido a las descripciones repetitivas de las mismas.

55 De acuerdo con el procedimiento de selección, en primer lugar, se ponen en contacto las células que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica la semaforina 3A con un material de prueba para analizar. Las células que contienen la secuencia de nucleótidos de la diana de la presente invención no están particularmente limitadas, pero los mastocitos se excluyen preferentemente ya que la sobreexpresión de la proteína semaforina 3A puede inducir la

apoptosis de los mastocitos. Tal como se utiliza en el presente documento para describir el procedimiento de selección de la presente invención, la expresión "material de prueba" se refiere a un material desconocido que se utiliza en la selección para evaluar si el material de prueba influye o no en la actividad del gen o proteína semaforina 3A o si el material de prueba inhibe o no la formación de complejos del receptor FcεRI por la proteína semaforina 3A.

5 El material de prueba incluye, aunque sin limitaciones, materiales químicos, péptidos y extractos naturales. El material de prueba analizado mediante el procedimiento de selección es un compuesto único, una mezcla de compuestos (por ejemplo, un extracto natural o un cultivo celular o tisular), un anticuerpo o un péptido. El material de prueba puede obtenerse a partir de bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Estas bibliotecas de compuestos se obtienen mediante procedimientos conocidos en la materia. Las bibliotecas de compuestos sintéticos

10 están disponibles comercialmente en Maybridge Chemical Co. (UK), Brandon Associates (USA), Microsource (USA) y Sigma-Aldrich (USA) y las bibliotecas de compuestos naturales están disponibles comercialmente en Pan Laboratories (USA) y MycoSearch (USA).

El material de prueba puede obtenerse a partir de varios procedimientos de bibliotecas combinacionales conocidos en la materia, por ejemplo, de un procedimiento de bibliotecas biológicas, un procedimiento de bibliotecas de fase

15 sólida o fase de solución paralela espacialmente direccionable, un procedimiento de bibliotecas sintéticas que requiere la deconvolución, un procedimiento de bibliotecas de "un compuesto-una perla" y un procedimiento de bibliotecas sintéticas que utiliza selección por cromatografía de afinidad. Los procedimientos sintéticos de las bibliotecas moleculares se desvelan en DeWitt y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909 (1993); Erb y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 11422 (1994); Zuckermann y col., J. Med. Chem. 37: 2678 (1994); Cho y col., Science

20 261: 1303(1993); Carell y col., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059 (1994); Carell y col., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; y Gallop y col., J. Med. Chem. 37: 1233 (1994).

Después, el nivel de expresión y la actividad de la diana (por ejemplo, semaforina 3A) de la presente invención se miden a partir de las células tratadas con el material de prueba. El nivel de expresión y la actividad pueden medirse como se describe a continuación, y como resultado de la medición, el material de prueba puede determinarse como

25 material para aliviar o tratar enfermedades inflamatorias inducidas por mastocitos si el material de prueba aumenta la expresión o actividad de la secuencia de nucleótidos del marcador o inhibe la formación de complejos del receptor FcεRI por la semaforina 3A sobreexpresada.

De acuerdo con un cierto aspecto, en la etapa (b), la actividad de la semaforina 3A se analiza mediante la medición de la formación del complejo del receptor FcεRI por la semaforina 3A sobreexpresada, y más específicamente, se

30 puede verificar la inhibición de la formación del complejo del receptor FcεRI a través de la inhibición de la fosforilación de ERK1/2, p38 y Lyn.

El procedimiento de selección puede llevarse a cabo mediante diversos procesos, especialmente mediante un procedimiento de alto rendimiento a través de diversos ensayos de unión conocidos por los expertos en la materia.

El material de prueba o el gen o proteína semaforina 3A se pueden marcar con un marcador detectable. Por

35 ejemplo, dichos marcadores detectables incluyen, pero sin limitaciones, marcadores químicos (por ejemplo, biotina), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, peroxidasa, luciferasa, β-galactosidasa y β-glucosidasa), marcadores radioactivos (por ejemplo, C14, 1125, P32 y S35), marcadores fluorescentes (por ejemplo, cumarina, fluoresceína, FITC (isotiocianato de fluoresceína), rodamina 6G, rodamina B, TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), HEX,

40 TET, Dabsyl y FAM), marcadores luminiscentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) o marcadores de metal (por ejemplo, oro y plata).

Para utilizar el material de prueba, proteína o gen semaforina 3A marcado de manera detectable, puede analizarse una unión del gen o proteína semaforina 3A con material de prueba a través de la señal generada por el marcador. Cuando se utiliza fosfatasa alcalina, puede utilizarse bromocloroindolilfosfato (BCIP), azul nitro tetrazolio (NBT, de sus siglas en inglés), naftol-AS-B1-fosfato y ECF (quimi fluorescencia mejorada) como sustrato; en el caso de utilizar peroxidasa de rábano picante, puede utilizarse cloronaftol, aminoetilcarbazol, diaminobenzidina, D-luciferina, lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridinio), éter de bencilo de resorufina, luminol, reactivo rojo Amplex (10-acetil-3,7-

45 dihidroxifenoxazino, Pierce), HYR (p-fenilendiamina-HCL y pirocatecol), TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), ABTS (2,2-Azine-di[3-etilbenzotiazolina sulfonato]), OPD (o-fenilendiamina) y naftol/pironina como sustrato.

También se desvela un procedimiento para prevenir o tratar enfermedades inmunes mediadas por Th2, que comprende administrar una composición que comprende el péptido de la presente invención como principio activo a un sujeto.

También se desvela un procedimiento para prevenir o tratar enfermedades autoinmunes, que comprende administrar una composición que comprende el péptido de la presente invención como principio activo a un sujeto.

También se desvela un procedimiento para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias inducidas por mastocitos, que comprende administrar una composición que comprende el péptido de la presente invención como principio activo a un sujeto.

Dado que el presente procedimiento utiliza la composición descrita anteriormente, las descripciones comunes entre

ellos se omiten para evitar redundancias indebidas que conducen a la complejidad de la presente especificación.

### **Efectos ventajosos**

Las características y ventajas de la presente invención se resumen a continuación.

- 5 (i) El péptido de la presente invención puede realizar las mismas funciones o funciones similares a las de la semaforina 3A natural, y tiene una excelente penetración en la piel debido a su pequeño tamaño.
- (ii) El péptido de la presente invención induce la apoptosis específica de los mastocitos e inhibe la actividad de los mastocitos (por ejemplo, reduce la cantidad de histamina secretada e inhibe la actividad de la beta-hexosaminidasa).
- 10 (iii) Además, el péptido de la presente invención inhibe la señalización de FcεRI, más específicamente, la formación de complejos del receptor FcεRI, que se muestra a través de la inhibición de la fosforilación de ERK1/2, p38 y Lyn.
- (iv) Por lo tanto, la excelente actividad y estabilidad del péptido de la presente invención se puede aplicar de manera muy favorable a medicamentos, cuasi medicamentos y cosméticos.

### **Breve descripción de los dibujos**

- 15 La Figura 1 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento del péptido de la SEQ ID NO: 1, preparado por el ejemplo sintético de la presente invención.
- La Figura 2a ilustra los resultados de la citometría de flujo que muestran un efecto de promover la apoptosis de los mastocitos, tratados con un péptido de SEQ ID NO: 1, preparado por el ejemplo sintético de la presente invención.
- 20 La Figura 2b ilustra los resultados de la transferencia de Western de Bcl2 que muestran un efecto de promover la apoptosis de los mastocitos tratados con un péptido de SEQ ID NO: 1, preparado por el ejemplo sintético de la presente invención.
- La Figura 2c ilustra los efectos citotóxicos en queratinocitos y fibroblastos, que muestra que el efecto de promover la apoptosis de mastocitos en el momento del tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO: 1, preparado por el ejemplo sintético de la presente invención, es una reacción específica de célula.
- 25 La Figura 3a ilustra los resultados de ELISA que muestran la reducción en la secreción de histamina de mastocitos en el momento del tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO: 1, preparado por el ejemplo sintético de la presente invención.
- La Figura 3b ilustra los resultados de las pruebas de actividad que muestran la reducción en la secreción de beta-hexosaminidasa de mastocitos en el momento del tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO: 1, preparado por el ejemplo sintético de la presente invención.
- 30 La Figura 4a ilustra los resultados de los gráficos obtenidos mediante la expresión numérica de las intensidades de banda a través de densitometría, como resultados de pruebas de verificación de los niveles de fosforilación de ERK y p38 Mark, que muestra la inhibición de la señalización del receptor de IgE de los mastocitos en el momento del tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO: 1, preparado por el ejemplo sintético de la presente invención.
- 35 La Figura 4b ilustra los resultados de las pruebas de verificación del nivel de fosforilación de la proteína Lyn relacionada con el receptor, que muestra la inhibición de la señalización del receptor de IgE de los mastocitos en el momento del tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO: 1, preparado por el ejemplo sintético de la presente invención.
- 40 La Figura 4c ilustra los resultados del análisis de inmunoprecipitación que muestran que la inhibición de la señalización del receptor de IgE de mastocitos en el momento del tratamiento con el péptido de la SEQ ID NO: 1, preparado por el ejemplo sintético de la presente invención, se debe a la supresión de la formación del complejo receptor.
- 45 La Figura 5 ilustra los resultados de estabilidad térmica del péptido de SEQ ID NO: 1, preparado por el ejemplo sintético de la presente invención.

### **Modos de llevar a cabo la invención**

- La presente invención se describirá ahora con mayor detalle mediante los ejemplos. Sería obvio para los expertos en la materia que se pretende que estos ejemplos sean, concretamente, más ilustrativos y que el ámbito de la presente invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas no se limita a o mediante los ejemplos.

### **Ejemplos**

#### **EJEMPLO DE PREPARACIÓN 1: Síntesis de Trp-Val-Pro-Tyr-Gln-Ala-Arg-Val-Pro-Tyr-Pro-Arg (SEQ ID NO:1)**

- Se introdujeron 700 mg de resina de cloruro de cloro tritilo (resina CTL, Nova Biochem Cat No. 01-64-0021) en un reactor, al que se añadieron 10 ml de cloruro de metileno (MC, de sus siglas en inglés), seguido de agitación durante 3 min. Después de eliminar la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF) al resultante y luego se agitó durante 3 minutos, después de lo cual se eliminó el disolvente. Se añadieron 10 ml de solución de diclorometano al reactor y luego se añadieron al reactor 200 mmoles de Fmoc-Arg (pbf)-OH (Bachem, Suiza) y 400 mmoles de DIEA (N,N'-diisopropil etilamina), después de lo cual se disolvió la mezcla mediante agitación y, luego, se llevó a cabo la

reacción con agitación durante 1 hora. Después del lavado, se hicieron reaccionar metanol y DIEA (2:1) disueltos en DCM (diclorometano) con la resina durante 10 minutos y, luego, se lavó el resultante utilizando un exceso de DCM/DMF (1:1). Después de eliminar la solución, se añadieron 10 ml de DMF al resultante y se llevó a cabo una agitación durante 3 minutos, seguido de la eliminación del disolvente. Se añadieron 10 ml de una solución de desprotección (piperidina/DMF al 20 %) al reactor y se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de la eliminación de la solución. Después de añadir el mismo volumen de la solución de desprotección, se llevó a cabo la reacción durante 10 minutos y se eliminó la solución, seguido de un lavado secuencial con DMF (3 veces), MC (1 vez) y DMF (1 vez) para obtener resinas Arg(pbf)-CTL. Se añadieron 10 ml de solución DMF a un nuevo reactor y luego se añadieron 200 mmoles de Fmoc-Pro-OH (Bachem, Suiza), 200 mmoles de HoBt y 200 mmoles de Bop, seguido de agitación para solubilización. Se añadieron 400 mmoles de DIEA al reactor dos veces como fracción y se llevó a cabo una agitación durante al menos 5 minutos para disolver todos los contenidos sólidos. Se introdujo la solución de aminoácidos disueltos en el reactor que contenía la resina desprotegida y se llevó a cabo la reacción con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la eliminación de la solución de reacción, se agitó el resultante tres veces (cada uno durante 5 min) con solución DMF para eliminar los residuos sin reaccionar. Se tomó una pequeña cantidad de la resina reaccionada para evaluar el alcance de las reacciones mediante la prueba con ninhidrina. Utilizando la solución de desprotección, se realizó la desprotección dos veces de la misma manera que se describió anteriormente para producir la resina Pro-Arg(pbf)-CTL. Después de lavar con DMF y MC, se llevó a cabo una prueba adicional de ninhidrina y se realizaron las uniones secuenciales de los aminoácidos a continuación como se describe anteriormente. Basado en la secuencia de aminoácidos diseñada por los presentes inventores, Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Pro, Fmoc-Val, Fmoc-Arg(pbf), Fmoc-Ala, Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Pro, Fmoc-Val y Fmoc-Trp(Boc) se unieron secuencialmente a las resinas. Se eliminó el grupo protector de Fmoc mediante la incubación a fondo con la solución de desprotección dos veces durante 10 minutos. Para la acetilación, se incubaron anhídrido acético, DIEA y HoBt con las resinas de peptidilo durante 1 hora. Se lavaron las resinas de peptidilo preparadas tres veces con DMF, MC y metanol, respectivamente, y se secaron gradualmente en atmósfera de nitrógeno, después de lo cual se secaron completamente al vacío bajo P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Las resinas secas se hicieron reaccionar con 30 ml de una solución saliente [que contenía ácido trifluoroacético (TFA) al 95 %, agua destilada al 2,5 %, tioanisolal 2,5 %] durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación intermitente. Se filtró la resina y se lavó con un pequeño volumen de solución TFA, después de lo cual se combinó el filtrado con el licor madre. Después de la destilación a presión reducida para reducir el volumen total en dos, se indujo la precipitación utilizando 50 ml de éter frío y se recogieron los precipitados formados mediante centrifugación, seguido de lavado dos veces con éter frío. Después de eliminar el licor madre, se secó completamente el resultante en atmósfera de nitrógeno para producir 0,85 g del péptido 1 no purificado, NH<sub>2</sub>-Trp-Val-Pro-Tyr-Gln-Ala-Arg-Val-Pro-Tyr-Pro-Arg-OH (tasa de rendimiento; 89,9 %). Se determinó el peso molecular del producto final como 1531,8 (PM teórico: 1531,795) utilizando un analizador de masas.

35 TABLA 1

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos	Valores analizados (analizador de masas)	
		Valores analizados	Valores teóricos
1(Péptido-1)	WVPYQARVPYPR	1531,8	1531,795

**Ejemplo de ensayo 1: Investigación sobre el efecto de la apoptosis de los mastocitos activados que utiliza un péptido sintético**

Con el fin de investigar el efecto antialérgico del péptido de la SEQ ID NO: 1, preparado por el ejemplo sintético 1, se analizó el efecto de apoptosis del péptido sobre los mastocitos activados.

40 En primer lugar, se cultivaron líneas de mastocitos de rata RBL-2H3 (Korean Cell Line Bank, Korea) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, U.S.A.) complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS, Sigma) utilizando un matraz para cultivo de tejidos (SPL, Korea). Las líneas celulares cultivadas se separaron del fondo del recipiente de cultivo utilizando una solución de tripsina al 1 %, y luego solo se recogieron los depósitos celulares por centrifugación. Se suspendieron de nuevo los depósitos celulares en líquido de cultivo DMEM, se colocaron en cada pocillo de una placa de 6 pocillos para cultivo de tejidos (SPL, Corea) a  $1 \times 10^5$  células por pocillo y luego se cultivaron durante 24 h en condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 24 h, se intercambió el medio con el mismo líquido de cultivo. En la prueba bajo condiciones activadas, se llevó a cabo el tratamiento con IgE y HAS, y se disolvió una muestra en blanco para determinar una referencia y el péptido de la presente invención en agua destilada al 10 % en un estado estéril, seguido de cultivo a concentraciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml durante 27 h en las mismas condiciones que anteriormente. Una vez completado el cultivo, se eliminó el líquido sobrenadante del cultivo, se separaron las líneas celulares cultivadas del fondo del recipiente de cultivo utilizando una solución de tripsina al 1 % y, a continuación, solo se recogieron los precipitados celulares mediante centrifugación. Se tiñeron las células con un kit de tinción con anexina V-PI (BD pharmigen), y luego se midieron las intensidades de FL1 y FL2 utilizando citometría de flujo, FACS. Se contaron las células apoptóticas positivas para anexina V (véase la Figura 2a). Para seguir investigando el efecto apoptótico, se obtuvieron las células tratadas en las mismas condiciones que en el ensayo anterior, y se confirmó el nivel de expresión de la proteína pro-apoptótica Bcl2 mediante transferencia

de western (véase la Figura 2b).

Mientras tanto, para investigar si el efecto de la apoptosis es o no una reacción específica de los mastocitos, se realizó la prueba de citotoxicidad utilizando células HaCaT como queratinocitos y células NIH3T3 como fibroblastos. Se colocaron las células en una placa de 96 pocillos para cultivo de tejidos a  $5 \times 10^3$  células por pocillo, y luego se cultivaron durante 24 h en condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 24 h, se intercambió el medio con el mismo líquido de cultivo. Se disolvieron una muestra en blanco para determinar una referencia y el péptido sintético en agua destilada al 10 % en un estado estéril, seguido de cultivo a concentraciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml durante 27 h en las mismas condiciones que anteriormente. Una vez completado el cultivo, se trató el líquido de cultivo con reactivo MTT (5 mg/ml; SIGMA, USA) con 1/10 de volumen y se cultivó además durante 4 h, y el formazán generado se disolvió en DMSO y se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro (Molecular devices, USA) (véase la Figura 2c).

La Figura 2a muestra los resultados de FACS al contar los mastocitos apoptóticos después del tratamiento con el péptido. Como se puede ver a partir de la figura 2a, se pudo verificar que el péptido de la presente invención incrementó el conteo de células positivas a Anexina V para inducir eficazmente la apoptosis en mastocitos inactivados y activados (10 µg/ml de grupo de tratamiento).

La Figura 2b muestra los resultados de la transferencia Western del nivel de expresión de la proteína pro-apoptótica intracelular Bcl2 después del tratamiento con el péptido. Como se puede ver a partir de la figura 2b, se pudo verificar que el péptido de la presente invención indujo la apoptosis para reducir el nivel de expresión de Bcl2 en mastocitos inactivados y activados.

La Figura 2c muestra resultados citotóxicos en células HaCaT como líneas de queratinocitos humanos y células NIH3T3 como líneas celulares de fibroblastos después del tratamiento con el péptido. Como se puede ver a partir de la figura 2c, el péptido de la presente invención no exhibió citotoxicidad en las otras células de la piel excluyendo los mastocitos.

Para resumir los resultados anteriores del ejemplo de prueba 1, puede verse que el péptido de la presente invención tiene actividad para inducir apoptosis específica de mastocitos, y la actividad se confirma tanto en el estado de inactivación como en el estado de activación a través del tratamiento con IgE (SIGMA, USA) y HSA (alérgeno; SIGMA, USA), pero la actividad es más notable en los mastocitos activados.

#### **Ejemplo de ensayo 2: Investigación sobre la eficacia inhibitoria de la actividad de los mastocitos del péptido sintético**

En el cultivo de células RBL-2H3 sensibilizadas por el tratamiento con IgE (1 µg/ml) durante 16 h, se eliminó el medio de cultivo existente y se intercambió con un tampón Tyrode. Después, se trataron las células con el péptido (1 y 10 (µg/ml) sintetizado en el ejemplo 1 y quercetina (40 µM; SIGMA, USA) como control positivo, seguido de cultivo durante 20 h. Después de eso, se trataron las células con HAS 1 µg/ml como alérgeno, seguido de cultivo durante 1 h. Como resultado, para medir la cantidad de histamina secretada en los mastocitos, se recogió el líquido del cultivo celular y se utilizó un kit ELISA de histamina (IBL internacional) (véase la figura 3a). Además, para medir la actividad de la beta-hexosaminidasa, se determinó el grado de desarrollo del color después de una reacción con un sustrato, p-N-acetil-glucosamina (NAG; SIGMA, USA) mediante la medición de la absorbancia a 405 nm utilizando un espectrofotómetro (véase la figura 3b).

La Figura 3a muestra los resultados de la medición de la cantidad de histamina secretada en los mastocitos después del tratamiento con el péptido. Como se puede ver a partir de la figura 3a, se puede confirmar la actividad de la quercetina, como control positivo, que reduce la cantidad de secreción de histamina, que se ha incrementado por la estimulación de IgE y HSA. El grupo tratado con el péptido de la presente invención también tenía actividad para reducir la cantidad de secreción de histamina de una manera dependiente de la concentración. La actividad (o tendencia) inhibitoria anterior también podría confirmarse como la misma en la prueba de actividad de la beta-hexosaminidasa (véase la figura 3b).

Para resumir los resultados anteriores del ejemplo de prueba 2, el péptido de la presente invención tiene efectos de inhibición de la histamina y beta-hexosaminidasa secretada debido a la activación de los mastocitos, y estos efectos pueden conducir a efectos de la supresión de las respuestas de inflamación posteriores y el prurito.

#### **Ejemplo de ensayo 3: Verificación del efecto inhibitorio de la señalización del receptor de IgE (FcεRI) del péptido sintético**

Para investigar el mecanismo inhibitorio de la actividad de los mastocitos del péptido preparado por el ejemplo sintético 1, se probó el efecto de inhibir la señal de la proteína FcεRI, como un receptor al que se une la IgE del estímulo de los mastocitos. Se colocaron las células en una placa de 60 mm de tamaño para cultivo (SPL, Korea) a  $1,5 \times 10^6$  células por pocillo, y luego se cultivaron durante 24 h en condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de eso, se trataron las células con IgE (1 µg/ml) durante 24 h para la sensibilización celular, y luego se disolvió una muestra en blanco para determinar una referencia y el péptido sintético en agua destilada al 10 % en un estado estéril, seguido de un tratamiento con una concentración de 10 µg/ml durante 20 minutos, y luego se estimularon las

células mediante tratamiento con alérgeno HSA 1 µg/ml durante 5 minutos o 30 minutos. Se obtuvieron las células después de la finalización de todos los tratamientos a través del tratamiento con tripsina, y luego el grado de fosforilación de ERK1/2, p38 y Lyn, que son moléculas involucradas en la señalización de FcεRI, se confirmaron mediante transferencia de western (véanse las Figuras 4a y 4b).

5 Además, para investigar si el efecto inhibitorio de la señalización de FcεRI por el péptido de la presente invención se produce o no mediante la inhibición de la reticulación de las subcadenas del receptor de IgE, FcεRI, se llevó a cabo la estimulación con HSA durante 10 min en las mismas condiciones de prueba y, a continuación, se sometieron las células obtenidas de este modo a inmunoprecipitación utilizando anticuerpo IgE. Después de la primera separación  
10 utilizando inmunoprecipitación, se llevó a cabo una transferencia de Western que utiliza un anticuerpo de subcadena gamma FcεRI para confirmar la cantidad de proteína de las subcadenas gamma que se unen a IgE (véase la figura 4c).

La Figura 4a muestra los resultados de observación de los niveles de fosforilación de las proteínas de señal del receptor de IgE FcεRI, expresados en las superficies de los mastocitos después del tratamiento con el péptido. Como se puede ver a partir de la figura 4a, el péptido de la presente invención mostró una eficacia para inhibir la fosforilación de las proteínas de señal FcεRI, ERK1/2 y p38. También se verificó que, la fosforilación de la otra proteína Lyn se inhibió significativamente de una manera dependiente de la concentración en el grupo de tratamiento peptídico (véase la figura 4b).  
15

La Figura 4c muestra los resultados de observación de la reticulación entre las subcadenas del receptor de IgE (FcεRI) después del tratamiento con el péptido. Se sabe que, el receptor de IgE tiene complejos compuestos por subcadenas alfa, beta y gamma, y si la unión a IgE se produce por la subcadena alfa, las subcadenas beta y gamma se juntan para formar complejos. Por lo tanto, para investigar la actividad del péptido de la presente invención para inhibir la formación de complejos del receptor FcεRI, se llevó a cabo la inmunoprecipitación con el anticuerpo IgE, y luego se llevó a cabo la transferencia Western en las subcadenas gamma. Como resultado, se verificó que el péptido de la presente invención tiene actividad para inhibir significativamente la formación de complejos del receptor FcεRI.  
20

25 Para resumir los resultados anteriores del ejemplo de prueba 3, el péptido de la presente invención inhibe la formación de complejos del receptor FcεRI, que está presente en las superficies de los mastocitos y participa en la actividad celular, mostrando así la eficacia del bloqueo de la señalización de FcεRI.

**Ejemplo de ensayo 4: Estabilidad térmica del péptido preparado**

El péptido preparado por el ejemplo 1 sintético y un factor de crecimiento de forma estándar (Semaforina 3A) comprado de NIBSC (UK) se formaron para dar 0,1 mg/ml utilizando solución salina tamponada con fosfato. Se colocó 1 ml de la solución preparada en cada vial de vidrio y se dejó reposar a 37 °C. Se muestreó la solución en reposo a 37 °C en los días 0, 5, 10, 20, 30, 50 y 70. Cada día se llevó a cabo centrifugación para eliminar los péptidos o proteínas modificados, y se tomó el sobrenadante. Se utilizó HPLC para la cuantificación (véase la Figura 5).  
30

**EJEMPLO 1: Preparación de nanopéptidos**

Se disolvieron 50 mg de péptido sintetizado en los ejemplos de preparación en 500 ml de agua destilada mediante agitación suficiente. Se mezcló la solución peptídica con 5 g de lecitina, 0,3 ml de oleato sódico, 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 a alta presión para su emulsificación, lo que proporciona de este modo nanosomas que tienen un tamaño de aproximadamente 100 nm. Se prepararon los nanosomas para tener una concentración final de aproximadamente 50 ppm y se utilizaron como ingredientes para cosméticos.  
40

**EJEMPLO DE FORMULACIÓN 1: Suavizante para la piel**

Se formuló un suavizante para la piel que comprende nanosomas que contienen péptidos preparados en el ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

45

TABLA 2

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

## ES 2 704 859 T3

(continuación)

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

### **EJEMPLO DE FORMULACIÓN 2: Crema hidratante**

Se formuló una crema hidratante que comprende nanosomas que contienen péptidos preparados en el ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

TABLA 3

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	0,001
Aceite de semillas de la hierba de la pradera	3,0
Alcohol cetearílico	1,5
Acido esteárico	1,5
Estearato de glicerilo	1,5
Parafina líquida	10,0
Cera	2,0
Polisorbato 60	0,6
Sesquioleato de sorbitán	2,5
Escualano	3,0
1,3-butilenglicol	3,0
Glicerina	5,0
Trietanol amina	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 hidratante**

Se formuló un líquido hidratante que comprende nanosomas que contienen péptidos preparados en el ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

TABLA 4

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	0,002
1,3-butilenglicol	4,0
Glicerina	4,0
Alcohol cetearílico	0,8
Estearato de glicerilo	1,0
Trietanol amina	0,13
Acetato de tocoferilo	0,3
Parafina líquida	5,0
Escualano	3,0
Aceite de nueces de Macadamia	2,0
Polisorbato 60	1,5
Sesquioleato de sorbitán	0,5
Polímero de carboxivinilo	1,0
Conservante, pigmentos	Cantidad adecuada
Perfume	Cantidad adecuada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

**5 EJEMPLO DE FORMULACIÓN 4: Esencia**

Se formuló una esencia que comprende nanosomas que contienen péptidos preparados en el ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

TABLA 5

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	0,005
Glicerina	10,0
1,3-butilenglicol	5,0
PEG 1500	2,0
Alantoina	0,1
DL-pantenol	0,3
EDTA-2Na	0,02



ES 2 704 859 T3

Met Gly Trp Leu Thr Arg Ile Val Cys Leu Phe Trp Gly Val Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Arg Ala Asn Tyr Gln Asn Gly Lys Asn Asn Val Pro Arg Leu  
 20 25 30  
 Lys Leu Ser Tyr Lys Glu Met Leu Glu Ser Asn Asn Val Ile Thr Phe  
 35 40 45  
 Asn Gly Leu Ala Asn Ser Ser Ser Tyr His Thr Phe Leu Leu Asp Glu  
 50 55 60  
 Glu Arg Ser Arg Leu Tyr Val Gly Ala Lys Asp His Ile Phe Ser Phe  
 65 70 75 80  
 Asp Leu Val Asn Ile Lys Asp Phe Gln Lys Ile Val Trp Pro Val Ser  
 85 90 95  
 Tyr Thr Arg Arg Asp Glu Cys Lys Trp Ala Gly Lys Asp Ile Leu Lys  
 100 105 110  
 Glu Cys Ala Asn Phe Ile Lys Val Leu Lys Ala Tyr Asn Gln Thr His  
 115 120 125  
 Leu Tyr Ala Cys Gly Thr Gly Ala Phe His Pro Ile Cys Thr Tyr Ile  
 130 135 140  
 Glu Ile Gly His His Pro Glu Asp Asn Ile Phe Lys Leu Glu Asn Ser  
 145 150 155 160  
 His Phe Glu Asn Gly Arg Gly Lys Ser Pro Tyr Asp Pro Lys Leu Leu  
 165 170 175  
 Thr Ala Ser Leu Leu Ile Asp Gly Glu Leu Tyr Ser Gly Thr Ala Ala  
 180 185 190  
 Asp Phe Met Gly Arg Asp Phe Ala Ile Phe Arg Thr Leu Gly His His  
 195 200 205  
 His Pro Ile Arg Thr Glu Gln His Asp Ser Arg Trp Leu Asn Asp Pro  
 210 215 220  
 Lys Phe Ile Ser Ala His Leu Ile Ser Glu Ser Asp Asn Pro Glu Asp  
 225 230 235 240

ES 2 704 859 T3

Asp Lys Val Tyr Phe Phe Phe Arg Glu Asn Ala Ile Asp Gly Glu His  
 245 250 255

Ser Gly Lys Ala Thr His Ala Arg Ile Gly Gln Ile Cys Lys Asn Asp  
 260 265 270

Phe Gly Gly His Arg Ser Leu Val Asn Lys Trp Thr Thr Phe Leu Lys  
 275 280 285

Ala Arg Leu Ile Cys Ser Val Pro Gly Pro Asn Gly Ile Asp Thr His  
 290 295 300

Phe Asp Glu Leu Gln Asp Val Phe Leu Met Asn Phe Lys Asp Pro Lys  
 305 310 315 320

Asn Pro Val Val Tyr Gly Val Phe Thr Thr Ser Ser Asn Ile Phe Lys  
 325 330 335

Gly Ser Ala Val Cys Met Tyr Ser Met Ser Asp Val Arg Arg Val Phe  
 340 345 350

Leu Gly Pro Tyr Ala His Arg Asp Gly Pro Asn Tyr Gln Trp Val Pro  
 355 360 365

Tyr Gln Gly Arg Val Pro Tyr Pro Arg Pro Gly Thr Cys Pro Ser Lys  
 370 375 380

Thr Phe Gly Gly Phe Asp Ser Thr Lys Asp Leu Pro Asp Asp Val Ile  
 385 390 395 400

Thr Phe Ala Arg Ser His Pro Ala Met Tyr Asn Pro Val Phe Pro Met  
 405 410 415

Asn Asn Arg Pro Ile Val Ile Lys Thr Asp Val Asn Tyr Gln Phe Thr  
 420 425 430

Gln Ile Val Val Asp Arg Val Asp Ala Glu Asp Gly Gln Tyr Asp Val  
 435 440 445

Met Phe Ile Gly Thr Asp Val Gly Thr Val Leu Lys Val Val Ser Ile  
 450 455 460

Pro Lys Glu Thr Trp Tyr Asp Leu Glu Glu Val Leu Leu Glu Glu Met  
 465 470 475 480

Thr Val Phe Arg Glu Pro Thr Ala Ile Ser Ala Met Glu Leu Ser Thr  
 485 490 495

Lys Gln Gln Gln Leu Tyr Ile Gly Ser Thr Ala Gly Val Ala Gln Leu  
 500 505 510

Pro Leu His Arg Cys Asp Ile Tyr Gly Lys Ala Cys Ala Glu Cys Cys  
 515 520 525

Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Asp Gly Ser Ala Cys Ser Arg  
 530 535 540

Tyr Phe Pro Thr Ala Lys Arg Arg Thr Arg Arg Gln Asp Ile Arg Asn  
 545 550 555 560

Gly Asp Pro Leu Thr His Cys Ser Asp Leu His His Asp Asn His His  
 565 570 575

Gly His Ser Pro Glu Glu Arg Ile Ile Tyr Gly Val Glu Asn Ser Ser  
 580 585 590

Thr Phe Leu Glu Cys Ser Pro Lys Ser Gln Arg Ala Leu Val Tyr Trp  
 595 600 605

Gln Phe Gln Arg Arg Asn Glu Glu Arg Lys Glu Glu Ile Arg Val Asp  
 610 615 620

Asp His Ile Ile Arg Thr Asp Gln Gly Leu Leu Leu Arg Ser Leu Gln  
 625 630 635 640

ES 2 704 859 T3

Gln Lys Asp Ser Gly Asn Tyr Leu Cys His Ala Val Glu His Gly Phe  
645 650 655

Ile Gln Thr Leu Leu Lys Val Thr Leu Glu Val Ile Asp Thr Glu His  
660 665 670

Leu Glu Glu Leu Leu His Lys Asp Asp Asp Gly Asp Gly Ser Lys Thr  
675 680 685

Lys Glu Met Ser Asn Ser Met Thr Pro Ser Gln Lys Val Trp Tyr Arg  
690 695 700

Asp Phe Met Gln Leu Ile Asn His Pro Asn Leu Asn Thr Met Asp Glu  
705 710 715 720

Phe Cys Glu Gln Val Trp Lys Arg Asp Arg Lys Gln Arg Arg Gln Arg  
725 730 735

Pro Gly His Thr Pro Gly Asn Ser Asn Lys Trp Lys His Leu Gln Glu  
740 745 750

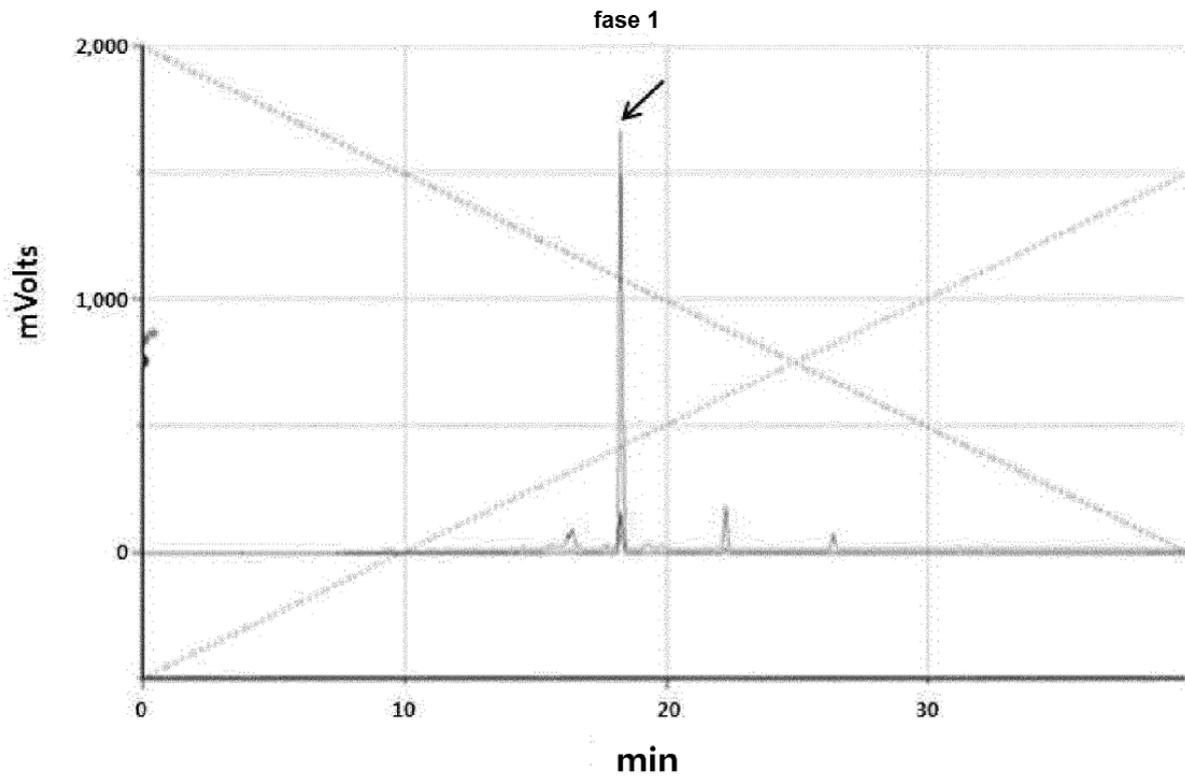
Asn Lys Lys Gly Arg Asn Arg Arg Thr His Glu Phe Glu Arg Ala Pro  
755 760 765

Arg Ser Val  
770

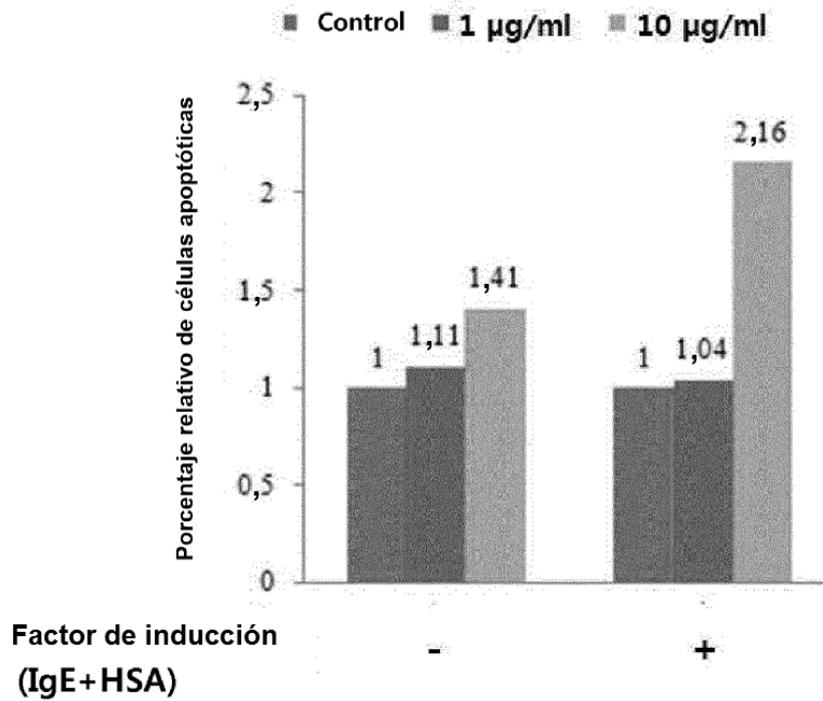
**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
2. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido procede de la proteína humana semaforina 3A (Sema3A).
3. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido induce apoptosis específica de mastocitos.
- 5 4. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido tiene actividad para reducir la cantidad de histamina secretada por los mastocitos.
5. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido inhibe la actividad intracelular de la beta-hexosaminidasa.
6. Una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades inmunes mediadas por Th2, que contiene, como principio activo, el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,  
10 en la que la enfermedad inmune mediada por Th2 es rinitis alérgica, asma bronquial, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, conjuntivitis alérgica, urticaria, edema vascular, alergia alimentaria, alergia física, neumonitis hipersensible, enfermedades alérgicas ocupacionales, o alergia a fármacos.
7. Una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades autoinmunes, que contiene, como principio activo, el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 15 8. La composición de la reivindicación 7, en la que la enfermedad autoinmune es obesidad, hiperlipidemia, diabetes, aterosclerosis o síndrome metabólico.
9. Una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias inducidas por mastocitos, que contiene, como principio activo, el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la enfermedad inflamatoria inducida por mastocitos es asma, dermatitis atópica, psoriasis, cistitis intersticial, obesidad, esclerosis múltiple, enfermedad arterial coronaria (EAC), artritis, o enfermedad inflamatoria intestinal (EII).  
20
10. La composición de la reivindicación 9, en la que la composición farmacéutica induce apoptosis específica de mastocitos.

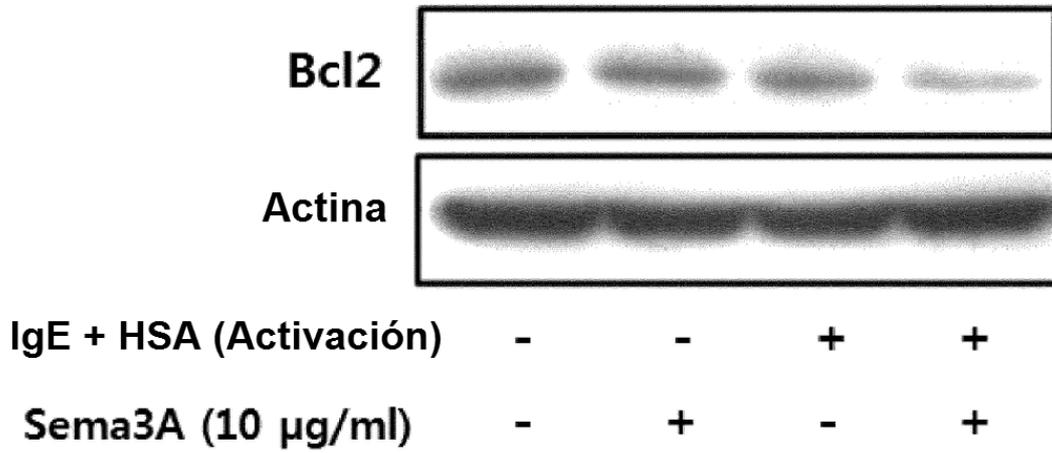
**Fig. 1**



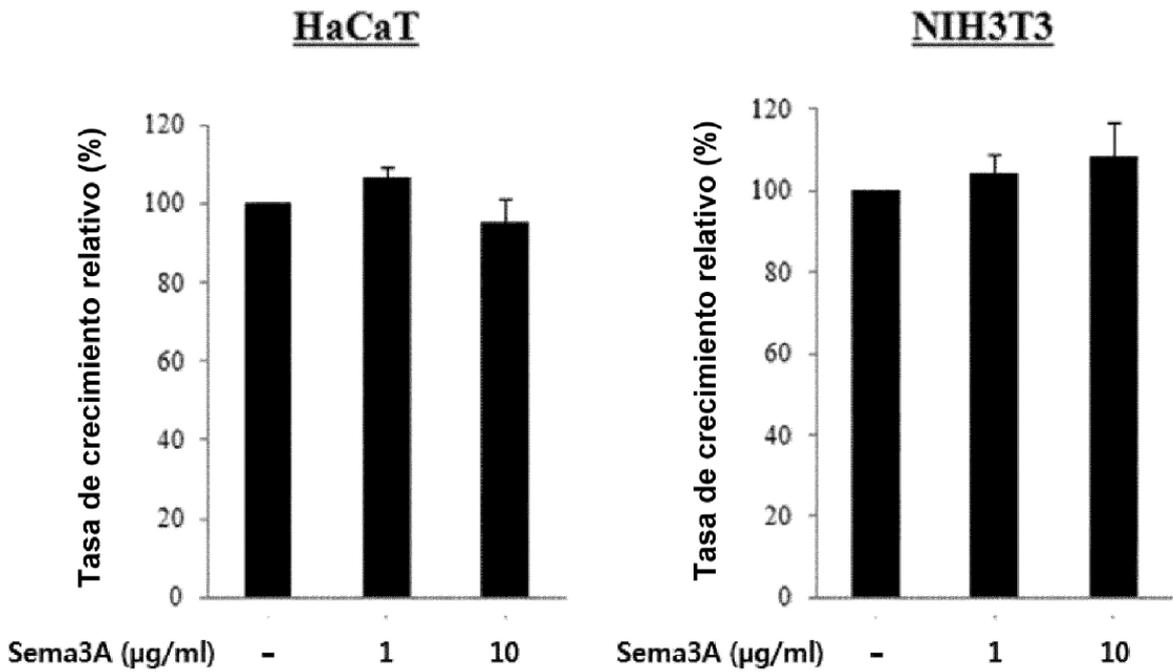
**Fig. 2a**



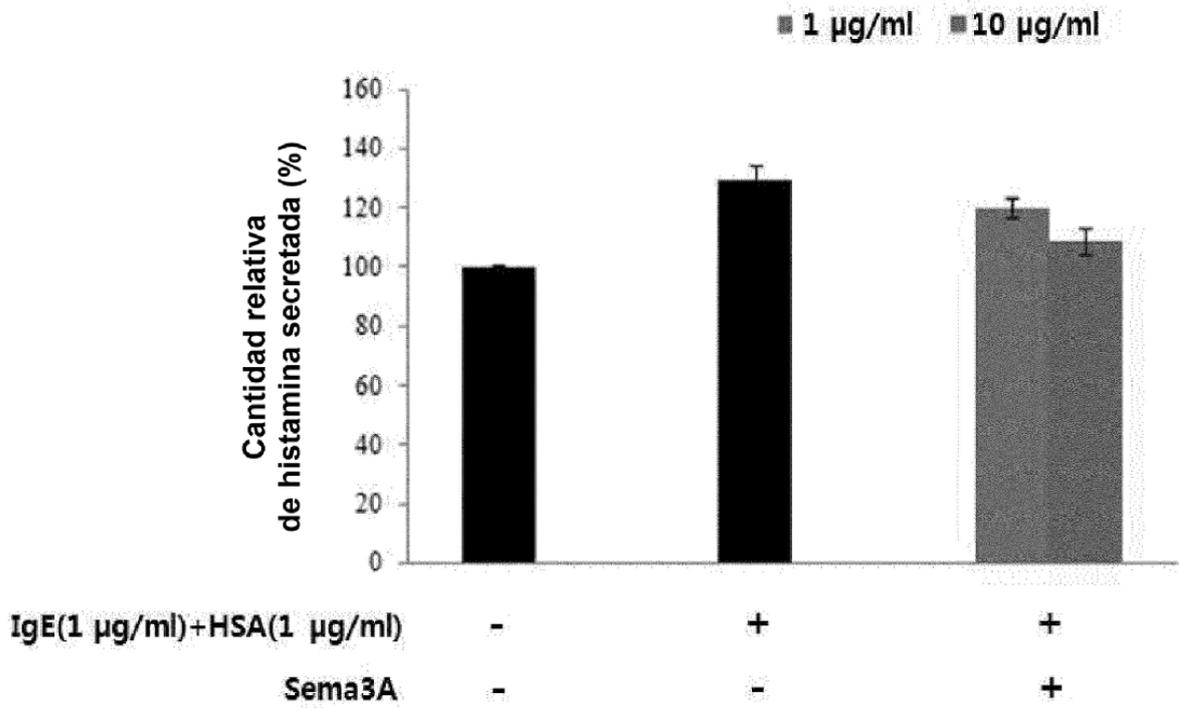
**Fig. 2b**



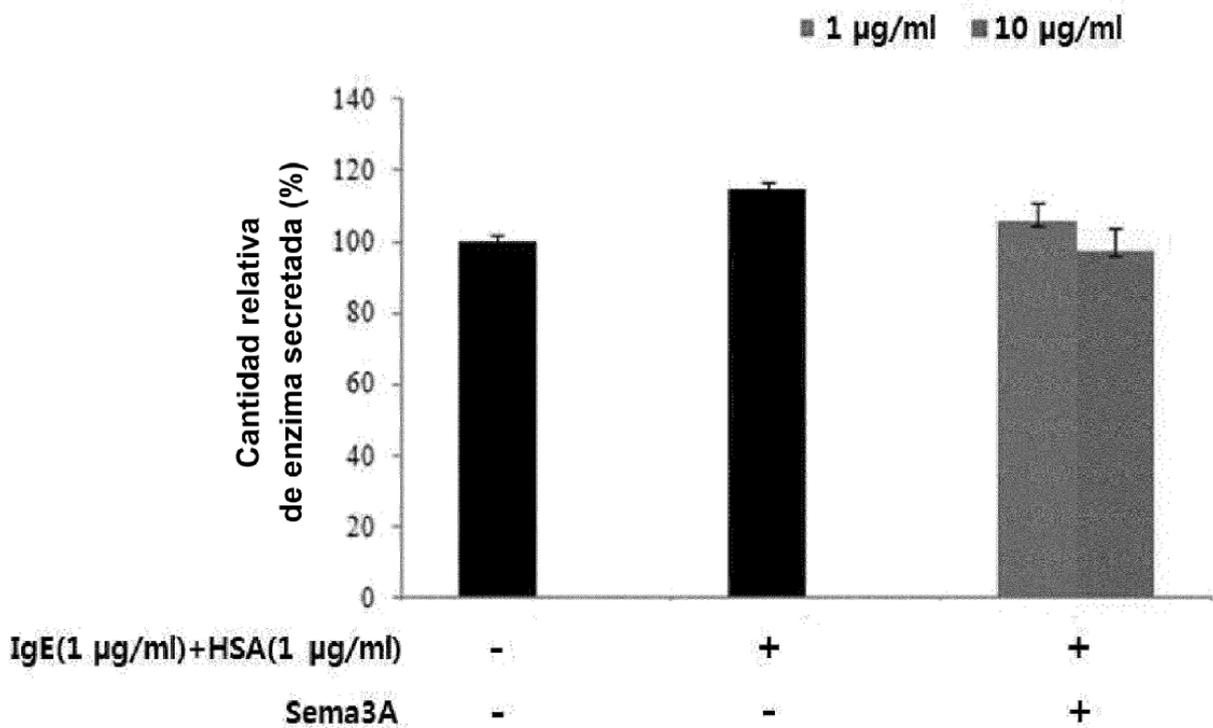
**Fig. 2c**



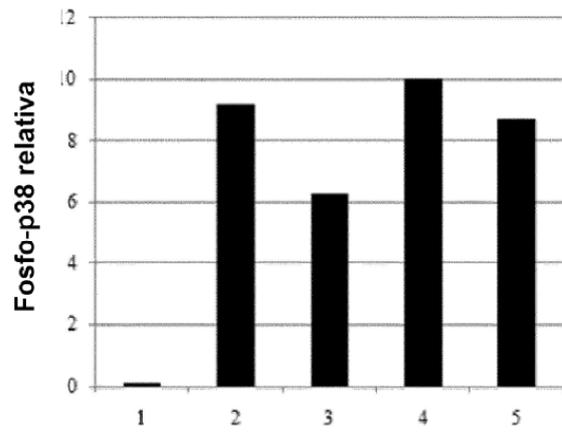
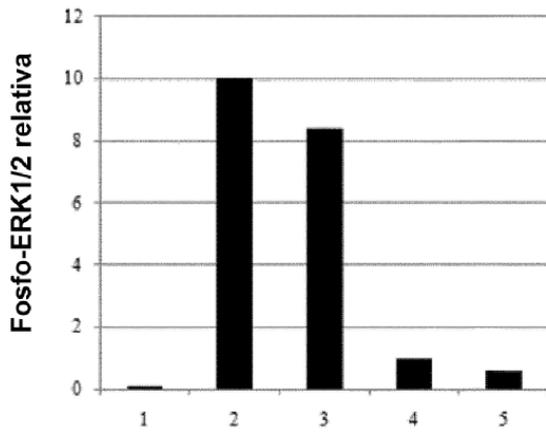
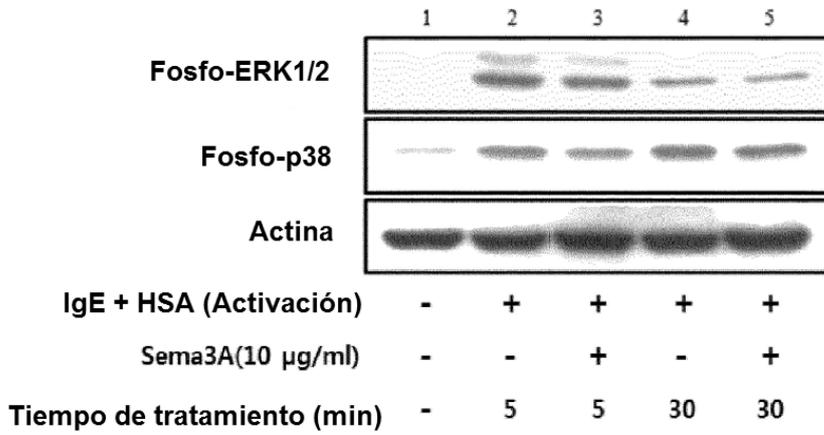
**Fig. 3a**



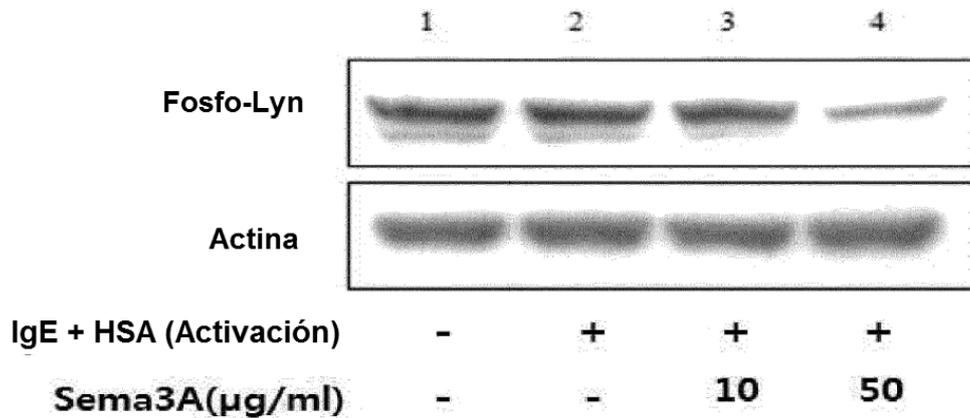
**Fig. 3b**



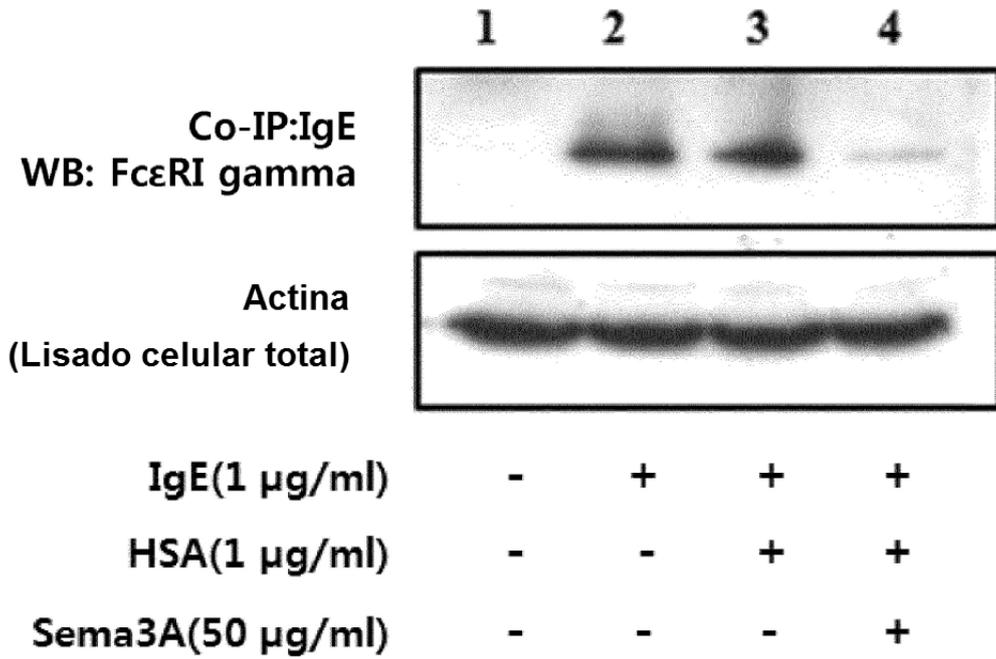
**Fig. 4a**



**Fig. 4b**



**Fig. 4c**



**Fig. 5**

