(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 743 675**

(51) Int. Cl.:

***C07K 7/06*** (2006.01)
***A61K 38/08*** (2009.01)
***A61P 3/04*** (2006.01)
***A61P 17/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/KR2014/011273**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15174599**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14891893 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 3144316**

(54) Título: **Péptido que tiene eficacia para remediar la hipopigmentación e inhibir la adipogénesis y uso del mismo**

(30) Prioridad:

**13.05.2014 KR 20140057189**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**20.02.2020**

(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 y**
**CHO, KYOUNG MI**

(74) Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 743 675 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 que tiene eficacia para remediar la hipopigmentación e inhibir la adipogénesis y uso del mismo

### Campo técnico

Esta solicitud reivindica la prioridad para y el beneficio de la solicitud de patente coreana n.º 10-2014-0057189 presentada en la Oficina Coreana de Propiedad Intelectual el 13 de mayo de 2014.

La presente invención se refiere a un péptido que tiene eficacia para aliviar la hipomelanosis e inhibir la adipogénesis y al uso del mismo.

### Antecedentes de la técnica

La melanina se produce por la tirosinasa a partir de tirosina mediante DOPA en los melanocitos, que son células de pigmentación presentes en el estrato basal en la epidermis, y se ha sabido que la proteína relacionada con tirosinasa-1/2 (Trp-1/2), además de la tirosinasa, está involucrada en el procedimiento de biosíntesis de melanina (Korner y Pawelek, Science (1982) 217:1163-1165; Kobayashi *et al*., EMBO J (1994) 13:5818-5825; y Yokoyama *et al*., Biochim Biophys Acta (1994) 1217:317-321), y cinasas activadas por señal extracelular-1/2 (ERK1/2) y AMP cíclico (AMPc) están de ese modo involucradas de manera continua como señales superiores de expresión de tirosinasa (Marshall, Cell (1995) 80:179-185; y Busca y Ballotti, Pigment Cell (2000) 13:60-69).

Los melanocitos se ven afectados por varios factores, tales como condiciones externas (por ejemplo, radiación ultravioleta e inflamación) y hormonas (por ejemplo, hormona estimulante de la melanina (MSH) y hormona estimulante de la tiroides (TSH)).

La melanina absorbe la energía luminosa de la luz ultravioleta en la luz solar para proteger las células que están profundas en la piel frente al daño debido a la luz ultravioleta, pero la producción en exceso anómala de melanina provoca la pigmentación anómala de la piel, tal como cloasma, pecas o pigmentación, y por el contrario, la menor producción de melanina provoca hipomelanosis (leucodermia), tal como vitíligo, nevo despigmentado, pseudoleucodermia atópica, pitiriasis versicolor, morfea, alergia, despigmentación posinflamatoria, hipomelanosis en gotas (*guttata)* idiopática y albinismo parcial (Bolognia y Pawelek, J Am Acad Dermatol (1988) 19:217-255; y Pinto y Bolognia, Pediatr Clin North Am (1991) 38:991-1017).

De las enfermedades de hipomelanosis, el vitíligo resulta de la destrucción de melanocitos, y las otras enfermedades resultan de una reducción de la cantidad de melanina producida en los melanocitos.

Para el tratamiento de las enfermedades anteriores, hay métodos fotoquímicos que usan fotosensibilizadores tales como psoraleno, métodos invasivos tales como cirugía, y métodos que inducen la repigmentación de la piel a través de la administración de fármacos que tienen actividad de proliferación de melanocitos o actividad de fomento de la melanogénesis, tales como los componentes de raíz de belesa, gengibre, pimienta larga y pimienta negra (Ancient Science de Life, (1990) Vol. IV, n.º 4, 202-206).

La obesidad, que es la causa de diversas enfermedades, es responsable del 80% de los pacientes diabéticos y el 21% de los pacientes con cardiopatía, y provoca enormes pérdidas socioeconómicas. Por tanto, el desarrollo de fármacos contra la obesidad seguros y eficaces puede reducir las enormes pérdidas socioeconómicas. Sin embargo, los medicamentos capaces de resolver las situaciones de mercado se limitan a anorexígenos y a inhibidores de la captación de grasas, quedándose cortos en las expectativas, y tienen diversos efectos secundarios tal como se describe a continuación. Xenical (Roche) indujo la inhibición de lipasa secretada por el páncreas y el aparato digestivo para inhibir la absorción de grasas, acompañado de efectos secundarios, tales como un bajo efecto de pérdida de peso del 2-3% y diarrea frecuente. Reductil (Abbott) suprime el apetito a través de la inhibición la captación de serotonina y noradrenalina, lo que conduce a un efecto de pérdida de peso del 5-10%, pero tiene efectos secundarios incluyendo enfermedades cardiovasculares, tales como accidente cerebrovascular e infarto de miocardio, por lo que se retiró Reductil del mercado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA) en 2010 a través de la suspensión del uso y la prescripción y las recomendaciones de retirada voluntaria, y se retiró del mercado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Corea en octubre de 2010. Además, a un gran número de productos que se han desarrollado como fármacos contra la obesidad se les ha prohibido hasta ahora su venta debido a los graves efectos secundarios de los mismos. Por ejemplo, se ha notificado que la aminofilina tiene amplios efectos secundarios en la totalidad del sistema nervioso mental, el aparato circulatorio y el aparato digestivo a pesar de su excelente efecto de reducción de la grasa corporal. Además, se ha prohibido la comercialización de fenfluramina, dexfenfluramina, topiramato, efedrina, etc. como fármacos contra la obesidad.

### Descripción detallada de la invención

### Problema técnico

Los presentes inventores se esforzaron para desarrollar péptidos excelentes que tienen actividad biológicamente

eficaz y, como resultado, los presentes inventores establecieron que un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ó 2 tiene actividad terapéutica excelente, tal como el aumento de la melanogénesis y la inhibición de la adipogénesis y, por tanto, los presentes inventores completaron la presente invención.

Por tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar un péptido que tiene actividad terapéutica de aumento de la melanogénesis o de inhibición de la adipogénesis.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición para aliviar o tratar la hipomelanosis.

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para tratar o prevenir la obesidad.

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

**Solución técnica**

Según un aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un péptido que tiene una actividad de aumento de la melanogénesis y que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

Según otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un péptido que tiene una actividad de inhibición de de la adipogénesis y que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

Los presentes inventores se esforzaron para desarrollar péptidos excelentes que tienen actividad biológicamente eficaz y, como resultado, los presentes inventores establecieron que un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 tiene excelente actividad terapéutica, tal como el aumento de la melanogénesis y la inhibición de la adipogénesis.

Según una realización de la presente invención, el péptido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 presenta actividad terapéutica para aumentar la melanogénesis e inhibir la adipogénesis.

Según otra realización de la presente invención, el péptido de la presente invención aumenta la fosforilación del factor de transcripción asociado a microftalmía (MITF), que es un factor de transcripción para aumentar la expresión de una enzima melanogénica (tirosinasa), y de proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc (CREB), que aumenta la expresión de MITF, aumentando de ese modo de manera resultante la expresión de tirosinasa, y en última instancia aumentando la melanogénesis.

Según otra realización de la presente invención, el péptido de la presente invención reduce la cantidad de grasa acumulada en células y reduce la expresión de perilipina y receptor gamma activado por el proliferador del peroxisoma (PPAR$\gamma$) involucrados en el mecanismo de adipogénesis, inhibiendo de ese modo en última instancia la adipogénesis.

Tal como se usa en el presente documento, el término “péptido” se refiere a una molécula lineal en la que se unen entre sí residuos de aminoácido mediante un enlace peptídico. El péptido de la presente invención puede prepararse mediante un método de síntesis química, especialmente técnicas de síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, *et al.*, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) o técnicas de síntesis en fase líquida (patente estadounidense n.º 5.516.891).

Según una realización de la presente invención, un grupo protector, que se selecciona del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenilmetoxicarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoílo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y polietilenglicol (PEG), puede unirse al extremo N o C- terminal del péptido.

La modificación de aminoácidos anterior mejora significativamente la estabilidad del péptido de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, el término “estabilidad” se refiere a la estabilidad en almacenamiento (por ejemplo, estabilidad en almacenamiento a temperatura ambiente) así como a la estabilidad “*in vivo*”. El grupo protector anterior protege a los péptidos de la presente invención frente al ataque de enzimas de escisión de proteínas *in vivo*.

Según otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona una composición para aliviar o tratar la hipomelanosis, que contiene como principio activo, el péptido anterior que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

Dado que la composición de la presente invención contiene, como principio activo, el péptido anterior que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, se omitirá la descripción de contenidos solapantes entre sí para evitar la complicación en exceso de la presente memoria descriptiva.

Tal como se valida en los siguientes ejemplos, el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 1 o SEQ ID NO: 2 aumenta la expresión de tirosinasa para fomentar la melanogénesis y, por tanto, la eficacia es muy eficaz en el tratamiento o la prevención de hipomelanosis.

La composición para aliviar o tratar enfermedad de hipomelanosis puede usarse para todas las enfermedades provocadas dado que la melanogénesis no llega al nivel normal debido a la pérdida de melanocitos o la inhibición de la melanogénesis y puede usarse para, por ejemplo, vitíligo, albinismo, nevo despigmentado, pseudoleucodermia atópica, pitiriasis versicolor, despigmentación posinflamatoria, morfea, albinismo parcial, hipomelanosis en gotas idiopática o leucodermia punteada (*punctatum*).

Según una realización de la presente invención, la composición de la presente invención contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido descrito anteriormente de la presente invención; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad farmacéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad suficiente para lograr eficacia o actividad del péptido anterior.

El portador farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente invención se usa habitualmente en el momento de la formulación, y ejemplos del mismo pueden incluir, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, almíbar, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener adicionalmente, además de los componentes anteriores, un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante, y similares. Se describen en detalle portadores y agentes farmacéuticamente aceptables adecuados en Remington’s Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por vía oral o por vía parenteral, y ejemplos de la administración parenteral pueden incluir inyecciones intravenosas, subcutáneas, intramusculares, intraperitoneales, locales y transdérmicas.

Una dosis adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo de diversos factores, tales como el método de formulación, modo de administración, la edad, el peso corporal, sexo y la morbilidad del paciente, la dieta, el momento de administración, la vía de administración, tasa de excreción y sensibilidad de respuesta. Mientras tanto, la dosis de la composición farmacéutica de la presente invención es de 0,0001-200 μg al día.

La composición farmacéutica de la presente invención se formula en una forma de dosificación unitaria o un envase multidosis usando un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptables según el método llevado a cabo fácilmente por un experto habitual de la técnica a la que la pertenece presente invención. En el presente documento, la forma de dosificación puede ser una disolución en un medio oleoso o acuoso, una suspensión, una emulsión, un extracto, un polvo, gránulos, un comprimido, una cápsula o un gel (por ejemplo, un hidrogel) y puede incluir además un dispersante o un estabilizante.

La composición de la presente invención puede formularse en cualquier forma de dosificación que se prepare de manera convencional, y ejemplos de la misma pueden incluir una disolución, una suspensión, una emulsión, una pasta, un gel, una crema, una loción, un polvo, un jabón, un limpiador que contiene tensioactivo, un aceite, una base de maquillaje en polvo, una base de maquillaje en emulsión, una base de maquillaje en cera y una pulverización, pero no se limita a estos. Más específicamente, la composición de la presente invención puede prepararse en una forma de dosificación de loción emoliente, loción nutritiva, crema nutritiva, crema para masaje, esencia, crema para los ojos, crema limpiadora, jabón limpiador, agua limpiadora, paquete, pulverización o polvo.

En casos en que la forma de dosificación de la presente invención es una pasta, una crema o un gel, el componente de portador de la misma puede incluir fibras animales, fibras vegetales, cera, parafina, almidón, goma tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicol, silicona, bentonita, sílice, talco y óxido de zinc.

En casos en que la dosificación de la presente invención es un polvo o una pulverización, los ejemplos del componente de portador pueden incluir lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio o un polvo de poliamida. Especialmente, en casos en que la forma de dosificación de la presente invención es una pulverización, la forma de dosificación puede incluir adicionalmente un propelente, tal como clorofluorohidrocarbono, propano/butano o dimetil éter.

En casos en que la forma de dosificación de la presente invención es una disolución o una emulsión, el componente de portador de la misma puede incluir un disolvente, un solubilizante o un emulsionante, por ejemplo agua, etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, aceite de 1,3-butil-glicol, ésteres grasos de glicerol, polietilenglicol o ésteres de ácidos grasos de sorbitano.

En casos en que la forma de dosificación de la presente invención es una suspensión, los ejemplos del componente de portador pueden incluir: diluyentes líquidos, tales como agua, etanol y propilenglicol; agentes de suspensión,

tales como alcohol isoestearílico etoxilado, éster de sorbitol y polioxietileno, y éster de sorbitano y polioxietileno; celulosa microcristalina; metahidróxido de aluminio; bentonita; agar; y goma tragacanto.

En casos en que la forma de dosificación de la presente invención es un limpiador que contiene tensioactivo, los ejemplos del componente de portador pueden incluir sulfato de alcohol alifático, éter-sulfato de alcohol alifático, monoéster de sulfosuccinato, isetionato, derivados de imidazol, taurato de metilo, sarcosinato, éter-sulfato de amida de ácidos grasos, alquilamidobetaína, alcohol alifático, glicérido de ácidos grasos, dietanolamida de ácidos grasos, aceite vegetal, derivados de lanolina y éster de ácidos grasos de glicerol etoxilado.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir la obesidad que contiene, como principio activo, el péptido anterior que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

Dado que la composición de la presente invención contiene el péptido anterior de la presente invención como principio activo, se omitirá la descripción de contenidos solapantes entre sí para evitar la complicación en exceso de la presente memoria descriptiva.

Tal como se usa en el presente documento, el término “obesidad” se refiere a una acumulación en exceso de grasa corporal en el cuerpo.

Tal como se valida en los siguientes ejemplos, el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 de la presente invención reduce la grasa acumulada en células y reduce la expresión de genes (por ejemplo, perilipina y PPARγ) involucrados en la adipogénesis. Por tanto, la composición de la presente invención puede suprimir de manera eficaz la obesidad.

Según una determinada realización, la composición de la presente invención reduce la grasa acumulada en células y reduce la expresión de genes (por ejemplo, perilipina y PPARγ) involucrados en la adipogénesis. Por tanto, la composición de la presente invención es muy eficaz en el tratamiento o la prevención de la obesidad.

Según otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un método para aliviar o tratar la hipomelanosis, comprendiendo el método administrar, a un sujeto, la composición que contiene, como principio activo, el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Según otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un método para aliviar o tratar la obesidad, comprendiendo el método administrar, a un sujeto, la composición que contiene, como principio activo, el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Dado que el método para aliviar o tratar la hipomelanosis y el método para prevenir o tratar la obesidad de la presente invención emplea la composición anterior, se omitirá los contenidos solapantes entre sí para evitar la complicación en exceso de la presente memoria descriptiva.

**Efectos ventajosos**

Se resumen las características y ventajas de la presente invención tal como sigue:

(i) El péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 de la presente invención presenta actividad de aumento de la melanogénesis y actividad de inhibición de de la adipogénesis.

(ii) El péptido de la presente invención aumenta la fosforilación de MITF, que es un factor de transcripción para aumentar la expresión de tirosinasa, y CREB, que aumenta la expresión de MITF, aumentando de ese modo de manera resultante la expresión de tirosinasa, aumentando en última instancia la melanogénesis.

(iii) El péptido de la presente invención reduce la cantidad de grasa acumulada en células y reduce la expresión de perilipina y PPARγ involucrados en el mecanismo de adipogénesis, inhibiendo de ese modo en última instancia la adipogénesis.

(iv) La presente invención proporciona una composición para aliviar o tratar la hipomelanosis y una composición farmacéutica para tratar o prevenir la obesidad.

**Breve descripción de los dibujos**

Las figuras 1a y 1b son gráficas obtenidas mediante la medición del cambio en la producción de melanina en los melanocitos por el péptido de la presente invención.

Las figuras 2a y 2b muestran los resultados obtenidos mediante la medición de los cambios en la expresión de moléculas de señalización de melanogénesis por el péptido de la presente invención a través de un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western.

Las figuras 3a y 3b muestran los resultados obtenidos mediante la medición de los cambios en la expresión de

moléculas de señalización de melanogénesis por el péptido de la presente invención a través de RT-PCR.

Las figuras 4a y 4b muestran los resultados obtenidos mediante la medición del nivel de expresión de proteínas de tirosinasa por el péptido de la presente invención a través de un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western.

Las figuras 5a y 5b muestran los resultados obtenidos mediante la medición del cambio en la cantidad de triglicéridos en los adipocitos por el péptido de la presente invención.

Las figuras 6a y 6b muestran los resultados obtenidos mediante la medición de la expresión de genes relacionados con la adipogénesis por el péptido de la presente invención a través de RT-PCR.

**Modo para llevar a cabo la invención**

A continuación en el presente documento, se describirá en detalle la presente invención con referencia a los ejemplos. Estos ejemplos son sólo para ilustrar la presente invención más específicamente y resultará evidente para los expertos en la técnica que el alcance de la presente invención no está limitado por estos ejemplos.

**Ejemplos**

Ejemplo de 1: Síntesis de péptidos

Se pusieron 700 mg de resina de cloruro de clorotritilo (resina CTL, n.º de cat. Nova Biochem 01-64-0021) en un recipiente de reacción y se añadieron 10 ml de cloruro de metileno (MC), seguido por agitación durante 3 minutos. Después de que se retirara la disolución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF), seguido por agitación durante 3 minutos, y luego se eliminó de nuevo el disolvente. Se pusieron en un recipiente de reacción 10 ml de una disolución de diclorometano y se añadieron 200 mmol de Fmoc-Cys-OH (Bachem, Suiza) y 400 mmol de diisopropiletilamina (DIEA). Se disolvió bien la mezcla con agitación y se llevó a cabo la reacción con agitación durante 1 hora. Después de la reacción, se lavó el material resultante y se disolvieron metanol y DIEA (2:1) en DCM, seguido por reacción durante 10 minutos y luego se lavó el material resultante con DCM/DMF (1:1) en exceso. Después de que se retirara la disolución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF), seguido por agitación durante 3 minutos, y luego se eliminó de nuevo el disolvente. Se pusieron en un recipiente de reacción 10 ml de una disolución de desprotección (piperidina al 20%/DMF), seguido por agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos, y luego se retiró la disolución. Se añadió una cantidad igual de una disolución de desprotección, y luego se mantuvo de nuevo la reacción durante 10 minutos, seguido por la retirada de la disolución. Se lavó el material resultante dos veces con DMF, una vez con MC y una vez con DMF, durante 3 minutos cada una, preparando de ese modo resina Cys-CTL. Se pusieron en un nuevo recipiente de reacción 10 ml de una disolución de DMF y se añadieron 200 mmol de Fmoc-Ala (Bachem, Suiza), 200 mmol de HoBt y 200 mmol de Bop, y se disolvió bien la mezcla con agitación. Se añadieron de forma dividida dos veces en el recipiente de reacción 400 mmol de DIEA, y luego se llevó a cabo la agitación durante al menos 5 minutos hasta que se disolvieron todos los sólidos. Se puso en un recipiente de reacción que contenía resina desprotegida la disolución mixta de aminoácidos disueltos, y se llevó a cabo la reacción con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de que se retirara el líquido de reacción, se llevó a cabo la agitación usando una disolución de DMF tres veces durante 5 minutos cada una, seguido por la retirada. Se tomó una pequeña cantidad de la resina de reacción para comprobar el grado de reacción mediante la prueba de Kaiser (prueba de ninhidrina). Usando la disolución de desprotección, se llevó a cabo la reacción de desprotección dos veces de la misma manera tal como se describió anteriormente, para preparar resina de Ala-Cys-CTL. Después de un lavado suficiente con DMF y MC, se llevó a cabo de nuevo la prueba de Kaiser, y luego se llevó a cabo la siguiente prueba de unión de aminoácidos de la misma manera tal como se describió anteriormente. Se llevó a cabo la reacción en cadena en el orden de Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Arg(pbf), Fmoc-Phe, Fmoc-Phe, Fmoc-Arg(pbf), Fmoc-Cys(Trt) y Fmoc-Gln(Trt), basándose en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Se eliminó el grupo protector Fmoc mediante reacción dos veces con la disolución de desprotección durante 10 min y luego un buen lavado. Se añadieron anhídrido acético, DIEA y HoBt para realizar la acetilación durante 1 hora y luego se lavó la resina de peptidilo preparada tres veces con DMF, MC y metanol, se secó bajo el flujo de gas nitrógeno y se secó completamente mediante secado a vacío bajo $P_2O_5$. Se añadieron 30 ml de una disolución que faltaba [el 81,5% de ácido trifluoroacético (TFA), el 5% de agua destilada, el 5% de tioanisol, el 5% de fenol, el 2,5% de EDT y el 1% de TIS] y se mantuvo la reacción durante 2 horas mientras se agitaba la mezcla intermitentemente a temperatura ambiente. Se filtró la resina, se lavó con una pequeña cantidad de una disolución y luego se mezcló con la disolución madre. Se llevó a cabo la destilación a presión reducida para reducir el volumen total a la mitad y luego se añadieron 50 ml de éter frío para inducir precipitación. Después de eso, se recogieron los precipitados mediante centrifugación, seguido por lavado dos veces con éter frío. Se retiró la disolución madre, y luego se secó suficientemente con nitrógeno, para sintetizar 0,75 g de péptido de SEQ ID NO: 1, $NH_2$-Gln-Cys-Arg-Phe-Phe-Arg-Ser-Ala-Cys-COOH (rendimiento: 86,5%). Después de eso, se sintetizaron 0,70 g de péptido de SEQ ID NO: 2, $NH_2$-Tyr-Cys-Arg-Phe-Phe-Asn-Ala-Phe-Cys-COOH (rendimiento: 80,7%) mediante el mismo método. Según la medición usando un instrumento de medición de peso molecular, el peso molecular fue de 1117,0 (valor teórico: 1117,3) para el péptido de SEQ ID NO: 1, y de 1168,1 (valor teórico: 1168,3) para el péptido de SEQ ID NO: 2.

[Tabla 1]

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | Valor de análisis (espectrómetro de masas) | |
|---|---|---|---|
| | | Valor de análisis | Valor teórico |
| SEQ ID NO: 1 | QCRFFRSAC | 1117,0 | 1117,3 |
| SEQ ID NO: 2 | YCRFFNAFC (forma de oxidación) | 1168,1 | 1168,3 |

Ejemplo 1: Medición de la producción de melanina

Se incubaron melanocitos (línea celular B16F10) en placas de cultivo de 6 pocillos en un incubador a 37ºC durante 24 horas, y se retiró el medio de cada placa, y se cambió por un medio nuevo. Luego, se trataron las células con el péptido de la presente invención que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 con diferentes concentraciones. Después de la incubación durante 72 horas, se retiró el medio de cultivo y se extrajeron las células y luego se transfirieron a un tubo de 1,5 ml, seguido por centrifugación a 13.000 rpm durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante y se recogieron los sedimentos celulares para medir la producción de melanina. Se añadieron 150 μl de NaOH 2 M a los sedimentos celulares para disolver la melanina intracelular a 60ºC durante 30 minutos. Se pusieron 100 μl del sobrenadante, que se obtuvo mediante disolución, en cada pocillo de una placa 96 pocillos y se midió la absorbancia a 490 nm.

Cuando se trataron los melanocitos de ratón B16F10 con los péptidos de la presente invención con diferentes concentraciones y luego se incubaron durante 72 horas, se observó el aumento de la melanogénesis en una manera dependiente de la concentración (figuras 1a y 1b).

Ejemplo 2: Observación de moléculas de señalización de melanogénesis

Se incubaron melanocitos (línea celular B16F10) en placas de cultivo de 6 pocillos en un incubador durante 24 horas y se trataron con el péptido de la presente invención con diferentes concentraciones. Después de que se incubaron las células durante desde 6 hasta 24 horas, se disolvieron las células, y luego se observaron la fosforilación de CREB y la expresión de MITF, que son moléculas de señalización involucradas en la melanogénesis, mediante un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos específicos para ello. Se llevó a cabo la prueba usando el anticuerpo anti-pCREB (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU) y el anticuerpo anti-MITF (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU).

Cuando se trataron los melanocitos de ratón B16F10 con el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y luego se observaron los cambios en la expresión de las moléculas de señalización de melanina a lo largo del tiempo, se aumentaron los niveles de fosforilación de MITF, que es un factor de transcripción para aumentar la expresión de una enzima melanogénica, y CREB, lo que aumenta la expresión de MITF (figuras 2a y 2b).

Ejemplo 3: Observación de cambios en los niveles de genes de enzima melanogénica

Se incubaron melanocitos (línea celular B16F10) en placas de cultivo de 6 pocillos en un incubador durante 24 horas y se trataron con los péptidos de la presente invención con diferentes concentraciones. Después de la incubación durante 24 horas, se extrajeron las células, y luego se observaron el aumento en la expresión de tirosinasa y TRP1, que son enzimas involucradas en la melanogénesis, mediante RT-PCR usando cebadores específicos para ello.

Las secuencias de cebador específicas de diana usadas en PCR para las enzimas involucradas en la melanogénesis fueron tal como sigue: secuencia de cebador directo de tirosinasa, 5'-GGCCAGCTTTCAGGCAGAGG-3' y secuencia de cebador inverso de tirosinasa, 5'- TGGTGCTTCATGGGCAAAAT-3' (temperatura de apareamiento, 51ºC); secuencia de cebador directo de TRP1, 5'- CCGAAACACAGTGGAAGGTT-3' y secuencia de cebador inverso de TRP1, 5'-TCTGTGAAGGTGTGCAGGAG-3' (temperatura de apareamiento, 60ºC).

Cuando se trataron los melanocitos B16F10 con el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y se observaron los aspectos de expresión de los genes de tirosinasa y TRP1, que son enzimas involucradas en la melanogénesis, a lo largo del tiempo, se verificó que la expresión de los genes estaba aumentada en comparación con un control en el tratamiento de 6 horas y el tratamiento de 24 horas (figuras 3a y 3b).

Ejemplo 4: Observación del cambio en el nivel de proteína de enzima melanogénica

Se incubaron melanocitos (línea celular B16F10) en placas de cultivo de 6 pocillos en un incubador durante 24 horas y se trataron con el péptido de la presente invención con diferentes concentraciones. Después de la incubación durante 24 horas, se disolvieron las células, y se observó la expresión de tirosinasa, que es una enzima esencial

involucrada en la melanogénesis, mediante un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo específico. Se llevó a cabo la prueba usando un anticuerpo anti-tirosinasa (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU).

Cuando se trataron los melanocitos B16F10 con el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y se observó el aspecto de expresión de la proteína tirosinasa involucrada en la melanogénesis a lo largo del tiempo, se verificó que la expresión de la proteína estaba aumentada en comparación con un control con respecto al tratamiento de 6 horas y el tratamiento de 24 horas (figuras 4a y 4b).

Ejemplo 5: Medición de la cantidad de triglicéridos

Se incubaron preadipocitos (línea celular 3T3-L1) en placas de 24 pocillos durante 48 horas y luego se trataron con el péptido de la presente invención con diferentes concentraciones junto con una composición de diferenciación (IBMX 0,5 mM, dexametasona 0,25 mM, insulina 10 mg/ml), seguido por incubación durante 7 días.

Se extrajeron las células y luego se pusieron en un tampón de disolución (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, inhibidor de enzima proteolítica), y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Después de centrifugación a 14.000 g durante 10 minutos, se recogió el sobrenadante que contenía una fase oleosa y se añadió un reactivo de triglicéridos al mismo, seguido por reacción en un incubador a 37ºC durante 5 minutos. Se midió la absorbancia a 540 nm para determinar la cantidad de triglicéridos.

Cuando se trataron los preadipocitos 3T3-L1 con un material de inducción de diferenciación y el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, seguido por incubación durante 7 días, se verificó que, debido a la inhibición del mecanismo de adipogénesis, se redujo el nivel de triglicéridos como la grasa acumulada en células en una manera dependiente de la concentración, en comparación con un control (figuras 5a y 5b).

Ejemplo 6: Observación de cambios de genes relacionados con la adipogénesis

Se incubaron preadipocitos (línea celular 3T3-L1) en placas de 6 pocillos durante 48 horas y luego se trataron con el presente péptido con diferentes concentraciones junto con una composición de diferenciación(IBMX 0,5 mM, dexametasona 0,25 mM, insulina 10 mg/ml), seguido por incubación durante 7 días. Después de la incubación, se llevó a cabo PT-PCR usando cebadores específicos para perilipina y PPARγ, que son genes involucrados en el mecanismo de adipogénesis. Se investigó si se inhibían los valores de ARNm de perilipina y PPARγ.

Las secuencias de cebador específicas de diana usadas en PCR para enzimas involucradas en la adipogénesis fueron tal como sigue: secuencia de cebador directo de perilipina, 5'-AAGGATCCTGCACCTCACAC-3' y secuencia de cebador inverso de perilipina, 5'-CCTCTGCTGAAGGGTTATCG- 3' (temperatura de apareamiento, 60ºC); secuencia de cebador directo de PPARγ, 5'-TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC-3' y secuencia de cebador inverso de PPARγ, 5'-AATCCTTGGCCCTCTGAGAT-3' (temperatura de apareamiento, 60ºC).

Cuando se trataron los preadipocitos 3T3-L1 con un material de inducción de diferenciación y el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, seguido por incubación durante 7 días, se verificó que se reducía la expresión génica de perilipina y PPARγ, que son moléculas involucradas en el mecanismo de adipogénesis, en comparación con un control (figuras 6a y 6b).

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a las características específicas, resultará evidente para los expertos en la técnica que esta descripción es sólo para una realización y no limita el alcance de la presente invención. Por tanto, el alcance sustancial de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

**Lista de secuencias**

<110> Caregen Co. Ltd.

<120> Péptidos que tienen actividad para aumentar la síntesis de melanina e inhibir la síntesis de grasas y usos de los mismos

<130> PP140060

<140> 14 891 893.1

<141> 28-10-2016

<150> Documento KR 2014/0057189

<151> 13-05-2014

<160> 10

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 1

<400> 1

```
Gln Cys Arg Phe Phe Arg Ser Ala Cys
  1               5
```

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 2

<400> 2

```
Tyr Cys Arg Phe Phe Asn Ala Phe Cys
  1               5
```

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de tirosinasa

<400> 3

```
ggccagcttt caggcagagg                                                20
```

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de tirosinasa

<400> 4

tggtgcttca tgggcaaaat 20

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de TRP1

<400> 5

ccgaaacaca gtggaaggtt 20

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de TRP1

<400> 6

tctgtgaagg tgtgcaggag 20

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de perilipina

<400> 7

aaggatcctg cacctcacac 20

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de perilipina

<400> 8

cctctgctga agggttatcg 20

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de PPAR gamma

<400> 9

ttttcaaggg tgccagtttc 20

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de PPAR gamma

<400> 10

aatccttggc cctctgagat 20

**REIVINDICACIONES**

1. Péptido que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 para su uso en el aumento terapéuticamente de la actividad de melanogénesis.

2. Péptido para su uso según la reivindicación 1, en el que el péptido tiene actividad para aumentar la expresión de factor de transcripción asociado a microftalmía (MITF) y aumentar la fosforilación de proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB).

3. Péptido para su uso según la reivindicación 1, en el que el péptido tiene actividad para aumentar la expresión de tirosinasa.

4. Péptido que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 para su uso en la inhibición terapéuticamente de la actividad de adipogénesis.

5. Péptido para su uso según la reivindicación 4, en el que el péptido tiene actividad para reducir la grasa acumulada en células.

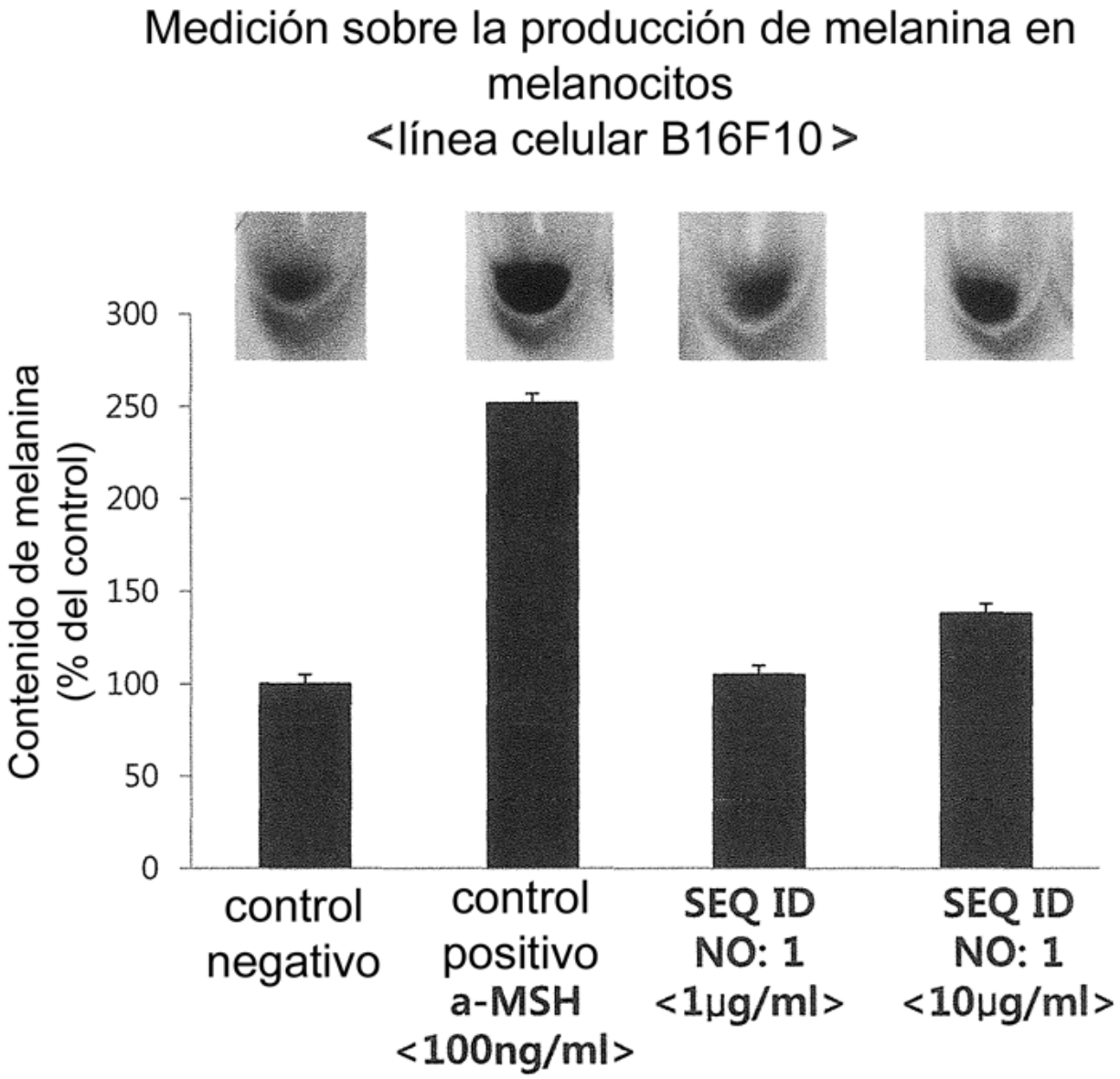
6. Péptido para su uso según la reivindicación 4, en el que el péptido tiene actividad para reducir la expresión de perilipina y receptor gamma activado por el proliferador del peroxisoma (PPARg).

7. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 para su uso en el alivio o tratamiento de hipomelanosis.

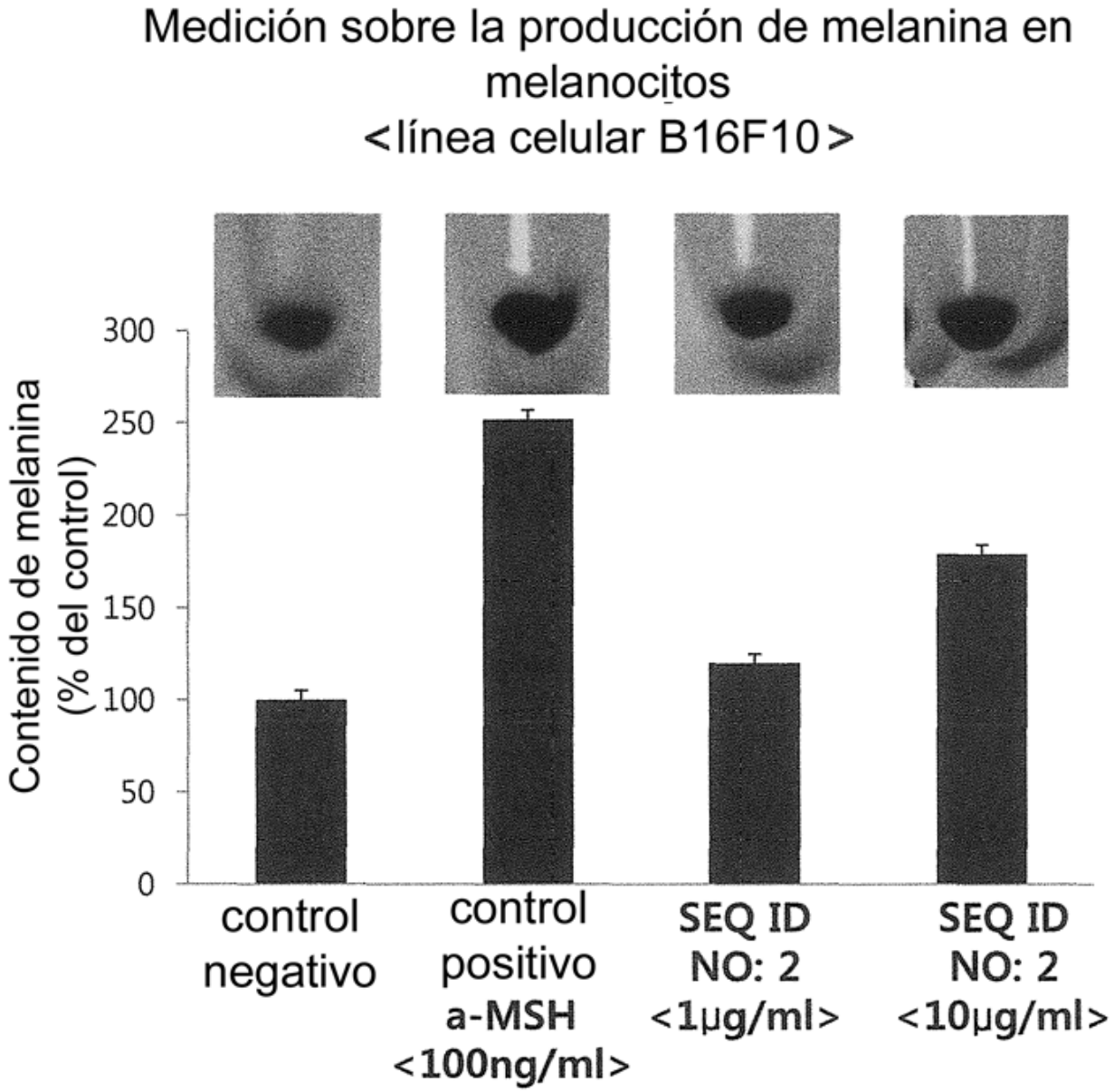
8. Péptido para su uso según la reivindicación 7, en el que la hipomelanosis es vitíligo albinismo, nevo despigmentado, pseudoleucodermia atópica, pitiriasis versicolor, despigmentación posinflamatoria, morfea, albinismo parcial, hipomelanosis en gotas idiopática o leucodermia punteada.

9. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 para su uso en la prevención o el tratamiento de obesidad.

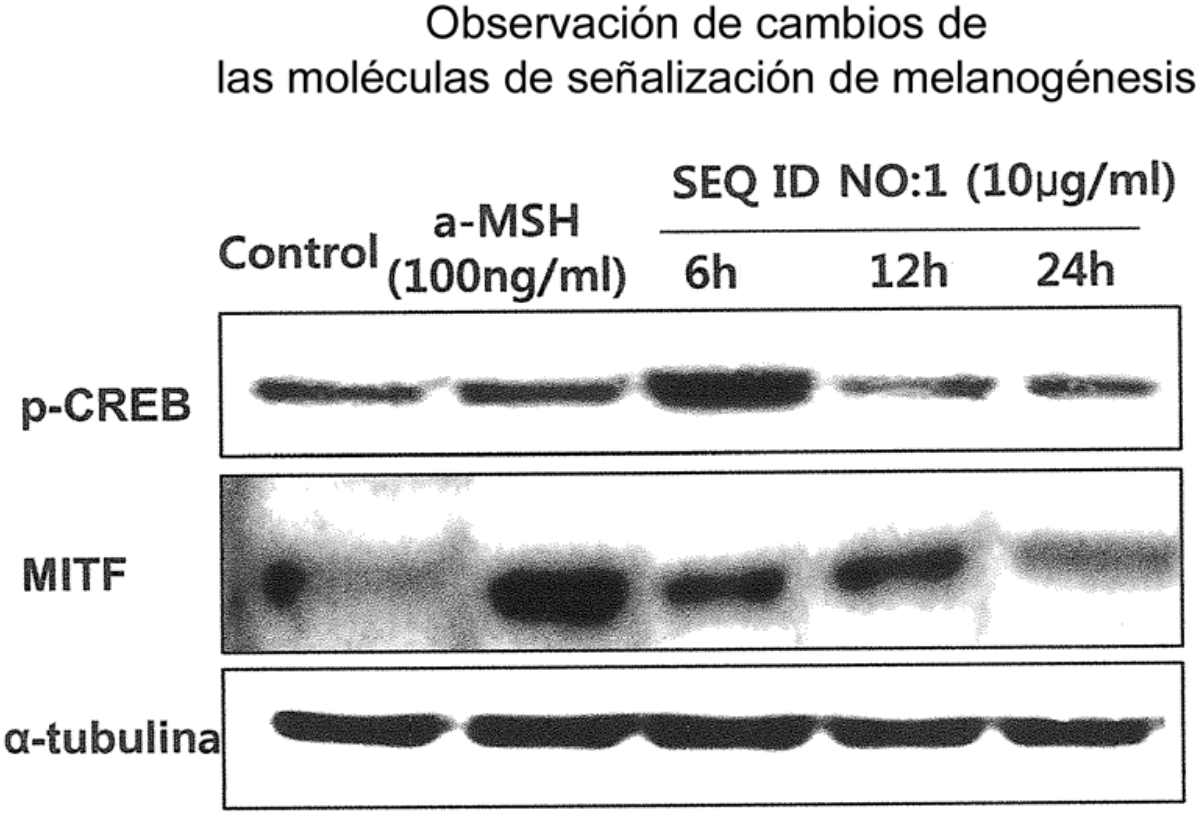
# Fig. 1a


Medición sobre la producción de melanina en melanocitos
<línea celular B16F10>
Contenido de melanina (% del control)
300
250
200
150
100
50
0
control negativo
control positivo a-MSH <100ng/ml>
SEQ ID NO: 1 <1μg/ml>
SEQ ID NO: 1 <10μg/ml>

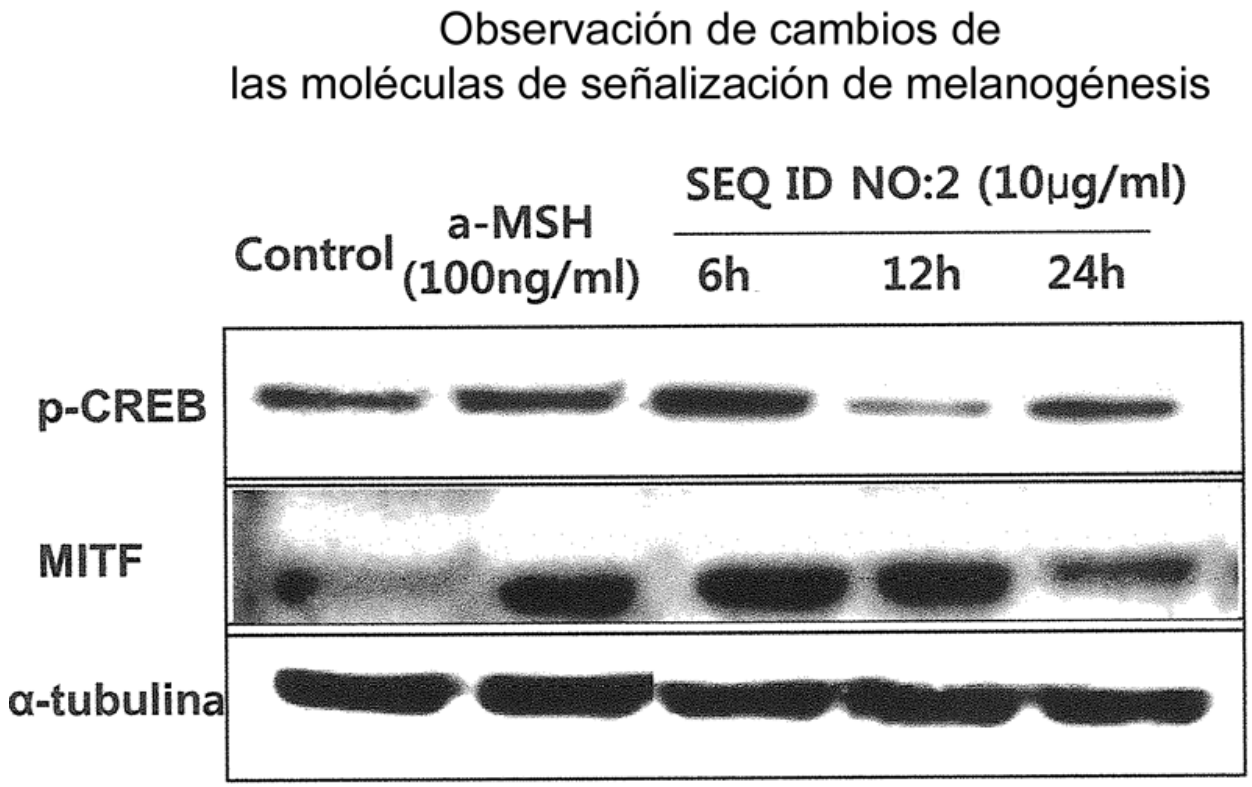
# Fig. 1b


Medición sobre la producción de melanina en melanocitos
<línea celular B16F10>
Contenido de melanina (% del control)
300
250
200
150
100
50
0
control negativo
control positivo a-MSH <100ng/ml>
SEQ ID NO: 2 <1μg/ml>
SEQ ID NO: 2 <10μg/ml>

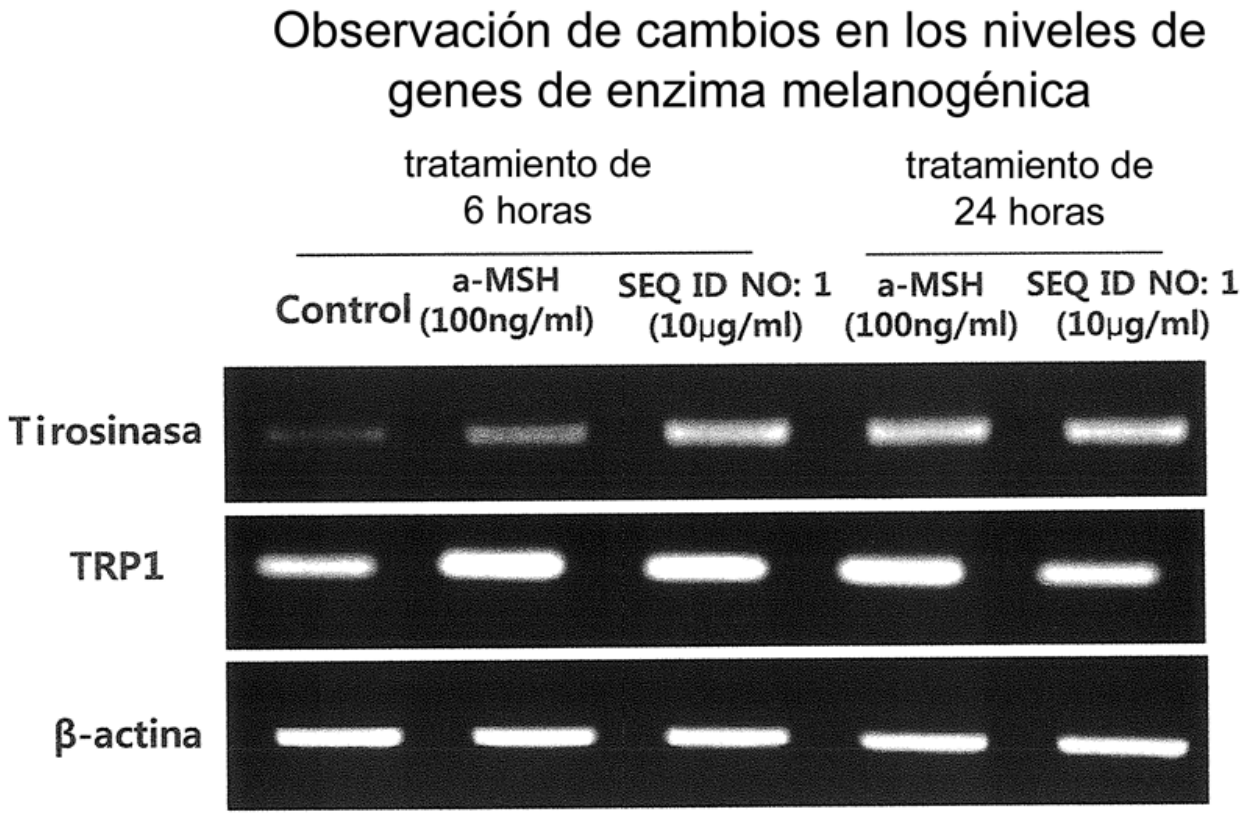
# Fig. 2a


Observación de cambios de
las moléculas de señalización de melanogénesis
SEQ ID NO:1 (10μg/ml)
Control
a-MSH
(100ng/ml)
6h
12h
24h
p-CREB
MITF
α-tubulina

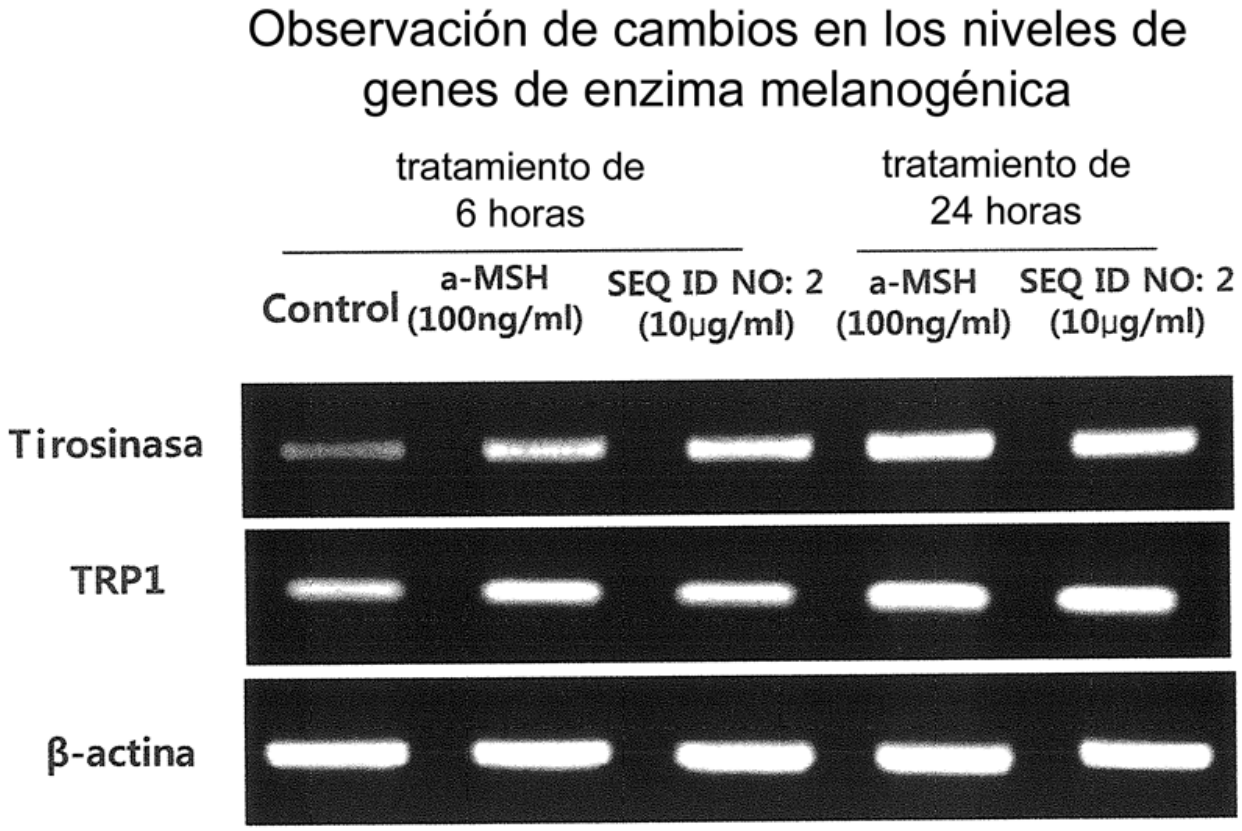
# Fig. 2b


Observación de cambios de
las moléculas de señalización de melanogénesis
SEQ ID NO:2 (10μg/ml)
Control
a-MSH
(100ng/ml)
6h
12h
24h
p-CREB
MITF
α-tubulina

# Fig. 3a

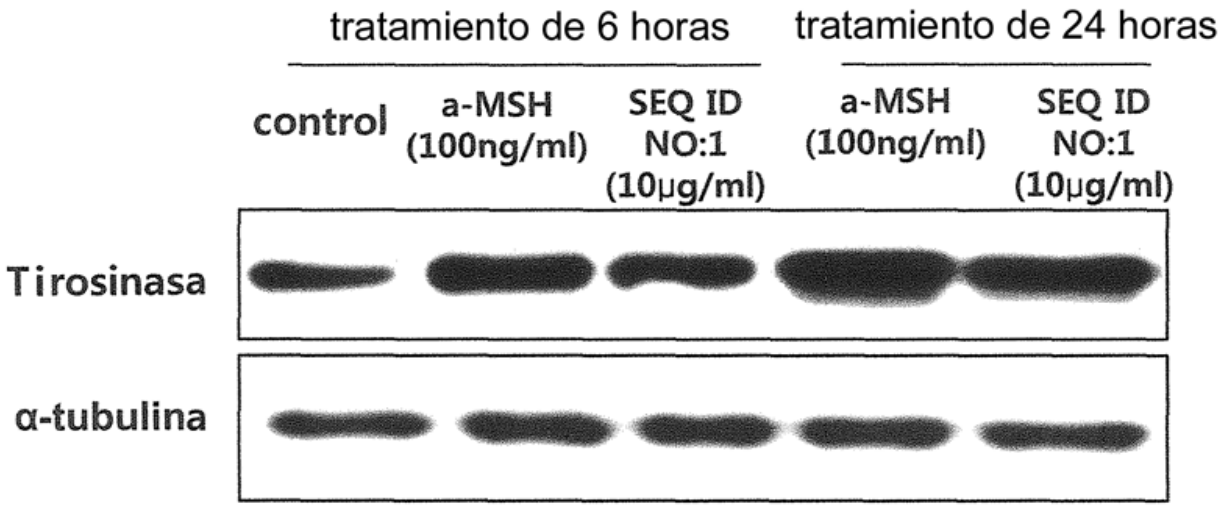

Observación de cambios en los niveles de genes de enzima melanogénica
tratamiento de 6 horas
tratamiento de 24 horas
Control
a-MSH (100ng/ml)
SEQ ID NO: 1 (10μg/ml)
a-MSH (100ng/ml)
SEQ ID NO: 1 (10μg/ml)
Tirosinasa
TRP1
β-actina

# Fig. 3b


Observación de cambios en los niveles de genes de enzima melanogénica
tratamiento de 6 horas
tratamiento de 24 horas
Control
a-MSH (100ng/ml)
SEQ ID NO: 2 (10μg/ml)
a-MSH (100ng/ml)
SEQ ID NO: 2 (10μg/ml)
Tirosinasa
TRP1
β-actina

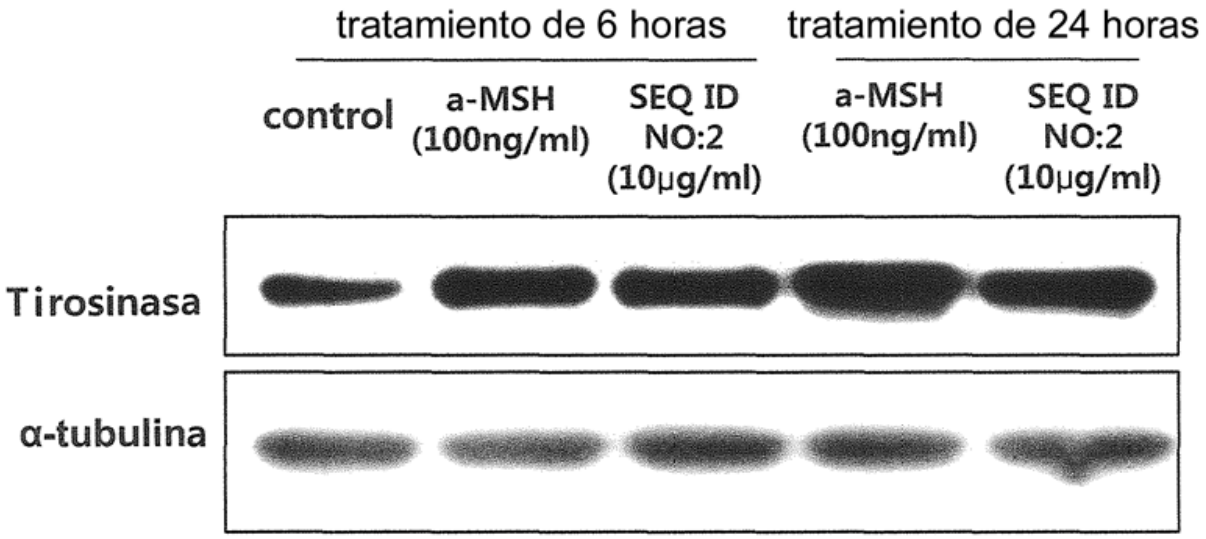
# Fig. 4a

Observación de cambio
en el nivel de enzima melanogénica (tirosinasa)

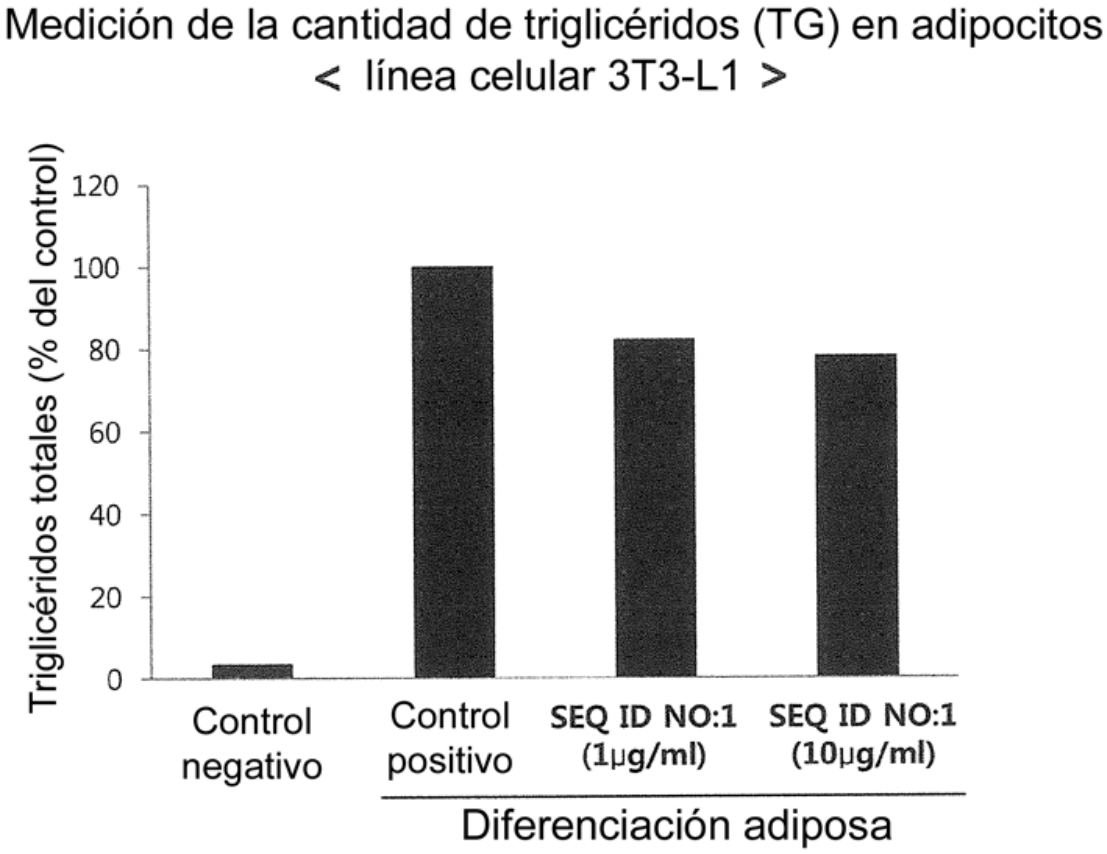


# Fig. 4b

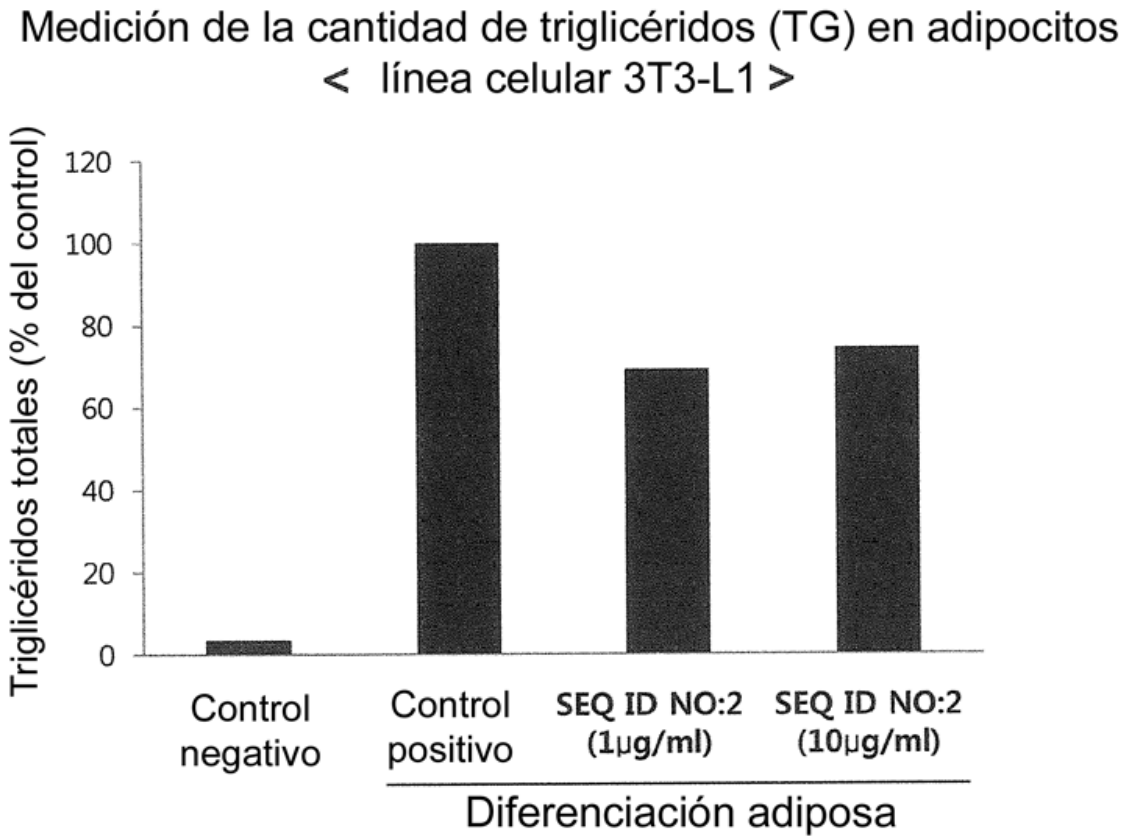
Observación de cambio
en el nivel de enzima melanogénica (tirosinasa)



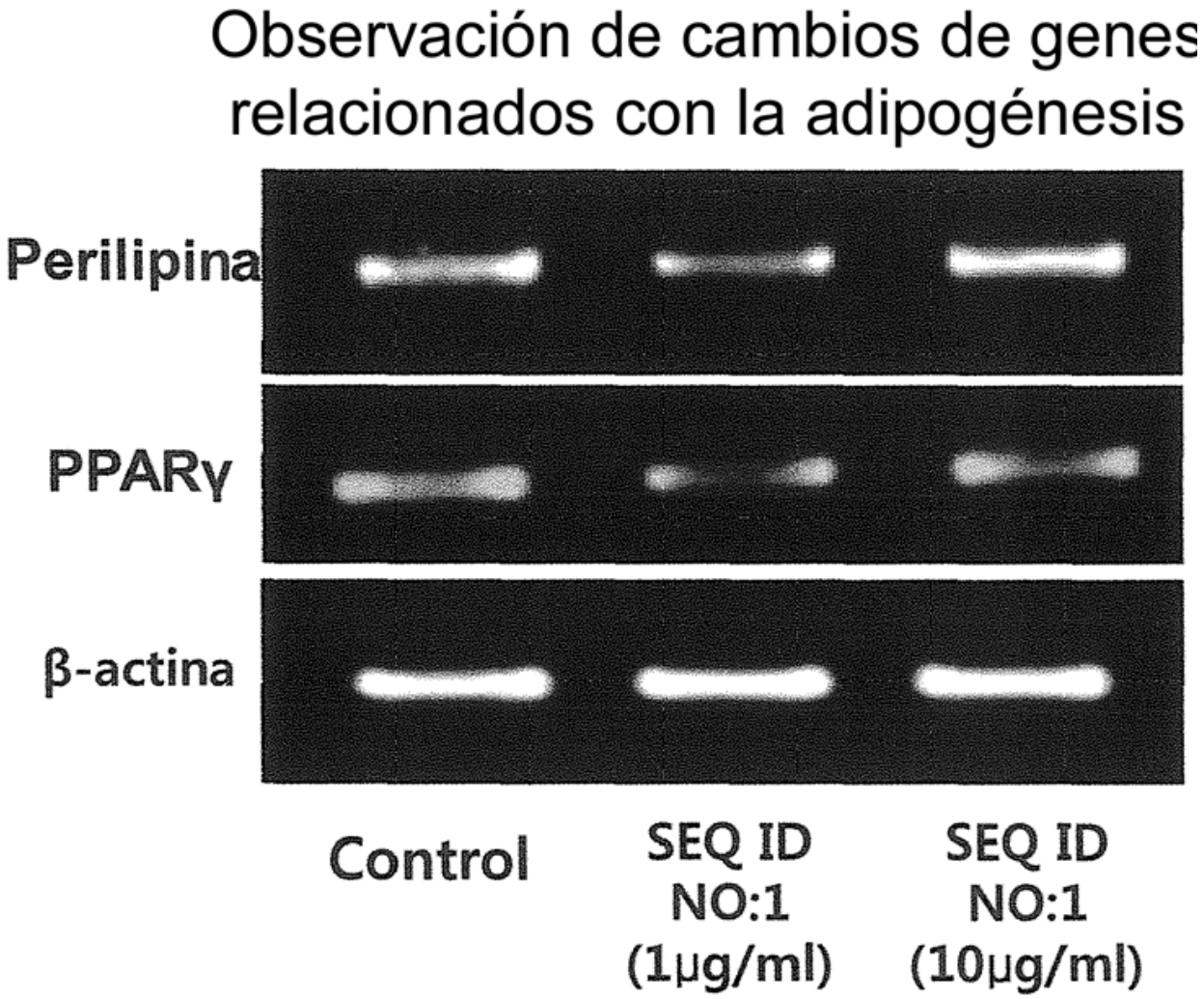
# Fig. 5a


Medición de la cantidad de triglicéridos (TG) en adipocitos
< línea celular 3T3-L1 >
Triglicéridos totales (% del control)
120
100
80
60
40
20
0
Control negativo
Control positivo
SEQ ID NO:1 (1μg/ml)
SEQ ID NO:1 (10μg/ml)
Diferenciación adiposa

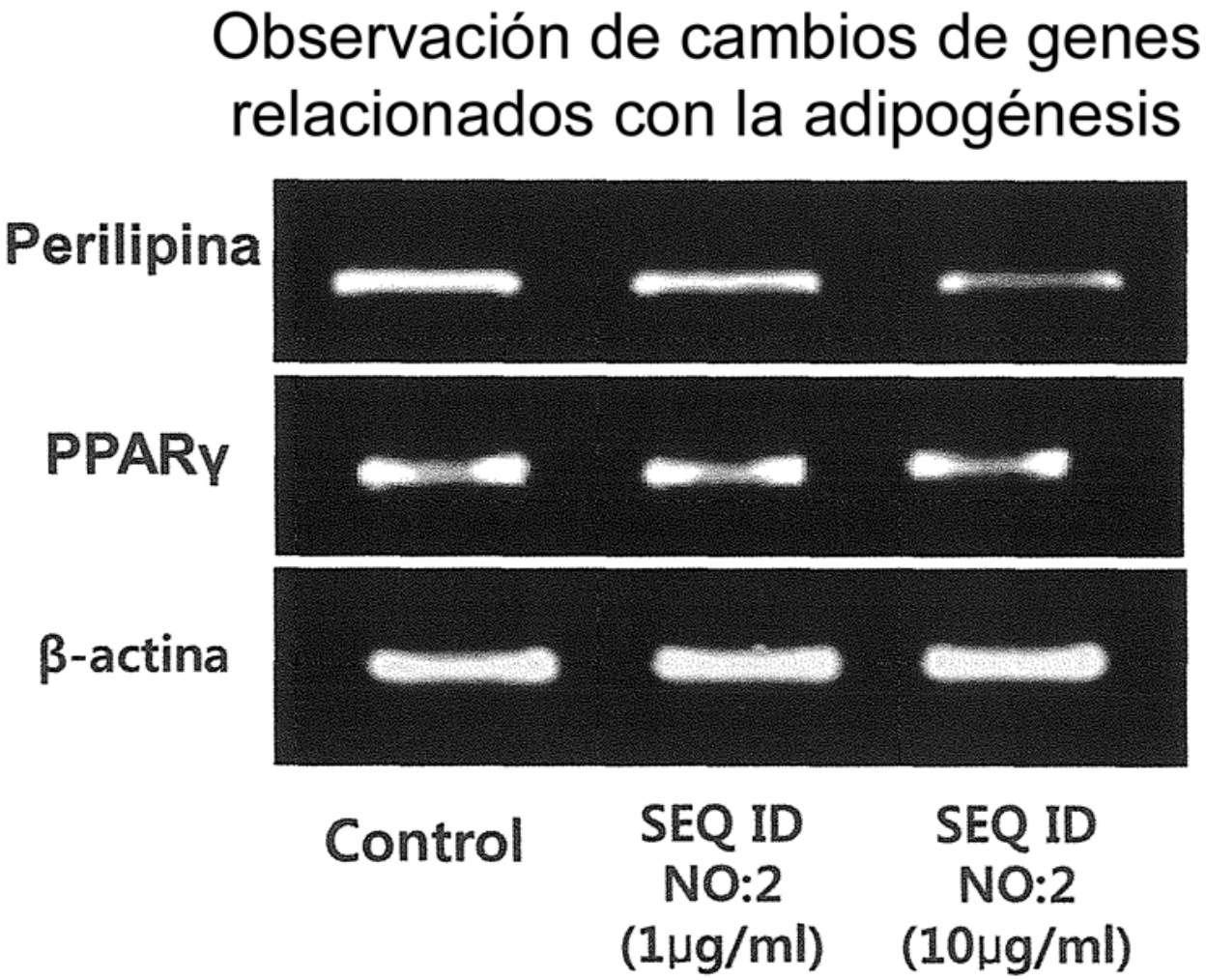
# Fig. 5b


Medición de la cantidad de triglicéridos (TG) en adipocitos
< línea celular 3T3-L1 >
Triglicéridos totales (% del control)
120
100
80
60
40
20
0
Control negativo
Control positivo
SEQ ID NO:2 (1μg/ml)
SEQ ID NO:2 (10μg/ml)
Diferenciación adiposa

# Fig. 6a


Observación de cambios de genes
relacionados con la adipogénesis
Perilipina
PPARγ
β-actina
Control
SEQ ID
NO:1
(1μg/ml)
SEQ ID
NO:1
(10μg/ml)

# Fig. 6b


Observación de cambios de genes relacionados con la adipogénesis
Perilipina
PPARγ
β-actina
Control
SEQ ID NO:2 (1μg/ml)
SEQ ID NO:2 (10μg/ml)