



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

**ESPAÑA** 



11) Número de publicación: 2 796 401

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61K 38/08 (2009.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C07K 14/495 (2006.01)

(12)

# TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 13.02.2017 PCT/KR2017/001526

(87) Fecha y número de publicación internacional: 24.08.2017 WO17142264

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 13.02.2017 E 17753425 (2)

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 08.04.2020 EP 3418292

54 Título: Péptido que muestra actividad que promueve la generación de melanina y uso del mismo

(30) Prioridad:

18.02.2016 KR 20160019310

45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 26.11.2020

(73) Titular/es:

CAREGEN CO., LTD. (100.0%) 46-38 LS-ro 91beon-gil, Dongan-gu Anyang-si, Gyeonggi-do 14119, KR

(72) Inventor/es:

CHUNG, YONG JI; KIM, EUN MI; LEE, EUNG-JI y KIM, JAN DI

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

### **DESCRIPCIÓN**

Péptido que muestra actividad que promueve la generación de melanina y uso del mismo

#### Campo técnico

10

15

20

25

30

40

45

50

55

65

La presente invención se refiere a un péptido que tiene una actividad para estimular la melanogénesis, a una composición farmacéutica que contiene el péptido como principio activo para la prevención y/o el tratamiento de la hipomelanosis, a una composición cosmética que contiene el péptido como principio activo para la prevención y/o el alivio de la hipomelanosis, y a un uso del péptido para la prevención, la mejora y/o el tratamiento de la hipomelanosis.

#### Antecedentes de la técnica

Las células de la piel producen melanina en los melanosomas de los melanocitos que están presentes en la capa basal epidérmica, como mecanismo de defensa a la estimulación de la luz ultravioleta, la contaminación ambiental y otros factores externos. La melanina es un factor importante para determinar el color de la piel, los ojos y el pelo de animales. La hipomelanosis también se conoce como un factor de riesgo del cáncer de piel. Los asiáticos son sensibles a la sobreproducción de melanina y, por lo tanto, se han realizado muchos estudios relacionados con el blanqueamiento para la inhibición de la melanogénesis. En los últimos años, la demanda frente al vitiligo, el cual está provocado por la inhibición de la melanogénesis, también está aumentando y, por lo tanto, se están realizando estudios al respecto.

El vitiligo es una enfermedad decolorante adquirida en donde se presentan manchas lechosas de varios tamaños y formas debido a la apoptosis o necrosis de los melanocitos. El vitiligo es una enfermedad relativamente común que está presente en aproximadamente el 1 % de la población en todo el mundo, y no hay diferencia en la enfermedad por raza o zona. En cuanto a las edades de aparición, el vitiligo aparece con mayor frecuencia entre los 10 a 30 años, el 95 % manifestándose antes de los 40 años, y el 30 % de los pacientes tienen antecedentes familiares.

Las causas del vitiligo aún no se han revelado con precisión pero existen diversas teorías, tales como la hipótesis autoinmunitaria. la hipótesis neural y la hipótesis de autodestrucción de melanocitos. La hipótesis autoinmunitaria es que la destrucción o disfunción de los melanocitos es provocada por la expresión de autoanticuerpos frente a antígenos basados en melanocitos, o que los melanocitos son destruidos por las linfocinas secretadas por los linfocitos citotóxicos o linfocitos activados. La hipótesis neural es que se genera peróxido de hidrógeno asociado con el estrés debido a la biosíntesis anómala de catecolaminas y al aumento de monoamino oxidasa, dando como resultado la 35 destrucción de melanocitos, y puede aparecer vitiligo a lo largo del ganglio nervioso, o que el vitiligo puede aparecer después de daño nervioso o estrés. La hipótesis de autodestrucción de los melanocitos es que se acumulan en los melanocitos metabolitos intermedios o complejos de fenol como metabolito final del proceso melanogénico, dando como resultado la destrucción de las células. Además, se sugieren diversos factores, tales como defectos celulares inherentes, factores genéticos, apoptosis, trastornos metabólicos del calcio.

La melanina se sintetiza a partir de los melanocitos y desempeña un papel importante en la protección de la piel a la irradiación de la luz UV o la absorción de sustancias tóxicas y sustancias químicas. Por lo tanto, las personas que no presentan una síntesis normal de melanina tienen un problema estético en el sentido de que la piel se vuelve blanca en parte más que por completo, lo que provoca manchas, y tienen el grave problema de ser sensibles a estímulos externos.

La tirosinasa, la proteína relacionada con tirosinasa 1 (TRP-1, forma siglada de tyrosinase related proteín-1) y la proteína relacionada con tirosinasa 2 (TRP-2, forma siglada de tyrosinase related protein-2), que son enzimas importantes en la síntesis de melanina, actúan como catalizadores de reacciones oxidativas (Pigment Cell Res. 14 (6): 43744).

En este caso, la tirosinasa actúa oxidando la tirosina en L-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y la DOPA en DOPA quinina, y la TRP-1 es la ácido dihidroxiindol carboxílico oxidasa y está implicada en la conversión del ácido 5.6dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA) en ácido indol-5,6-quinona-2-carboxílico. La TRP-1 también actúa estabilizando la tirosinasa y regulando su actividad. La TRP-2, que es la DOPA cromo tautomerasa, convierte DOPA cromo en DHICA para formar eumelanina y feomelanina, que constituyen los melanocitos, y la relación de los mismos determina los colores de la piel, el pelo, los ojos, y otros.

La síntesis de melanina se activa por irradiación UV y hormona estimulante de melanocitos α (MSH, forma siglada de 60  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone). En este caso, se sabe que la  $\alpha$ -MSH, que es una hormona peptídica, se produce mediante la luz ultravioleta y se produce a partir de varias células, incluidas las de la hipófisis y la piel.

En este caso, la α-MSH actúa sobre los receptores de melanocortina (MCR, forma siglada de *melanocortin receptors*) de los melanocitos de forma paracrina, para regular la actividad del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF, forma siglada de transcription factor microphthalmia-associated transcription factor), regulando de este modo la actividad de la tirosinasa, la DHICA oxidasa (TRP-1), la DOPAcromotautomerasa (TRP-2), y otras, que desempeñan papeles importantes en la síntesis de melanina (THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 273, N.º 31, publicación del 31 de julio, pág. 195609565, 1998).

Se ha informado que la estimulación de los melanocitos por UV o α-MSH conduce a la activación de la tirosinasa por p38 o por proteína quinasa A (PKA), respectivamente. En estas dos rutas, en especial, la ruta α-MSH -> cAMP-> PKA desempeña un papel importante en la síntesis de melanina. El aumento de AMPc estimula la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB, forma siglada de *cAMP-responsive element binding protein*), lo que aumenta la expresión del factor de transcripción MITF, que potencia la actividad de la tirosinasa y aumenta la expresión de ARNm de tirosinasa (Nucleic Acids Res. 30 (14): 3096106, Pigment Cell Melanoma Res 21 (6): 66576).

10

15

30

Los asiáticos, incluidos los coreanos, quieren tener colores de piel claros y, por lo tanto, han realizado muchos estudios sobre componentes blanqueadores que inhiben la melanogénesis. Sin embargo, la melanina se sintetiza a partir de los melanocitos de la piel y desempeña un papel importante en la protección de la piel a la irradiación UV o la absorción de sustancias tóxicas y sustancias químicas. Dado que la ausencia de síntesis normal de melanina hace que la piel sea sensible a estímulos externos y presenta un aspecto externo anómalo, se necesita el tratamiento para una síntesis normal de melanina, y también se han realizado estudios para ello. Hasta el momento, no se ha llevado a cabo suficientemente el desarrollo de técnicas para la estimulación de la síntesis de melanina.

El documento WO 2015/174599 divulga péptidos (QCRFFRSAC o YCRFFNAFC) que presentan actividad de incremento de la melanogénesis y actividad inhibidora de la adipogénesis útiles para la mejora o el tratamiento de la hipopigmentación de melanina.

### Descripción detallada de la invención

#### 25 Problema técnico

Los inventores de la presente invención se esforzaron por desarrollar péptidos capaces de estimular la melanogénesis y, como resultado, los presentes inventores confirmaron que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 tiene una excelente actividad estimulante de la melanogénesis, y establecieron que estos péptidos pueden utilizarse de manera favorable en la prevención y el tratamiento de la hipomelanosis, y así los inventores de la presente invención completaron la presente invención.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar un péptido que presente actividad estimulante de la melanogénesis, estando compuesto el péptido por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la hipomelanosis, conteniendo la composición farmacéutica, como principio activo, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición cosmética para la prevención o el alivio de la hipomelanosis, conteniendo la composición cosmética, como principio activo, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

45

55

65

40

#### Solución técnica

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

50 En conformidad con un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que tiene una actividad para estimular la melanogénesis, consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Los inventores de la presente invención se esforzaron por desarrollar péptidos capaces de estimular la melanogénesis y, como resultado, los inventores de la presente invención confirmaron que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 tiene una excelente actividad estimulante de la melanogénesis, y establecieron que estos péptidos pueden utilizarse de manera favorable en la prevención y el tratamiento de la hipomelanosis.

El péptido de la presente invención puede incluir la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y, por ejemplo, puede estar compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

El péptido de la presente invención se obtiene cribando péptidos, que tengan excelentes efectos estimulantes de la melanogénesis, a partir de bibliotecas de péptidos en posesión de los inventores de la presente invención, a través de experimentos sobre cambios en la expresión génica y de proteínas o similares, y se proporcionan un total de dos tipos de péptidos como péptido de la presente descripción.

# ES 2 796 401 T3

Como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a una molécula lineal formada por restos de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. El péptido de la presente invención puede prepararse mediante métodos de síntesis química conocidos, en especial, técnicas de síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) o técnicas de síntesis en fase líquida (Patente de Estados Unidos N.º 5.516.891).

El péptido de la presente invención puede tener una modificación inducida en el extremo N o en el extremo C del mismo, para seleccionar una parte de una secuencia de aminoácidos y aumentar la actividad de la misma.

Por ejemplo, la modificación del extremo C puede ser una modificación del extremo C del péptido en un grupo hidroxi (-OH), un grupo amino (-NH<sub>2</sub>), un grupo azida (-NHNH<sub>2</sub>), o similar, pero sin limitación a estos.

15

20

40

45

60

Además, la modificación del extremo N puede ser la unión de al menos un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenil metoxicarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoílo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y polietilenglicol (PEG) en el extremo N del péptido, pero sin limitación a estos. El grupo protector protege al péptido de la presente invención de enzimas de escisión de proteínas *in vivo*.

La modificación del extremo N o del extremo C del péptido mejora la estabilidad del péptido, y esta modificación permite que el péptido de la presente invención tenga una semivida aumentada en el momento de administración *in vivo*, teniendo de este modo una semivida alta.

Como se usa en el presente documento, el término "estabilidad" se refiere a la estabilidad de almacenamiento (por ejemplo, estabilidad a temperatura ambiente) así como a estabilidad *in vivo*.

- De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el péptido de la presente invención aumenta la producción de melanina en los melanocitos, aumenta la actividad y la expresión de la tirosinasa, que es una enzima para la regulación de la síntesis de melanina, aumenta la expresión de MITF y TRP1, y aumenta la fosforilación de CREB, siendo estos factores implicados en la melanogénesis.
- 30 Estos resultados indican que el péptido de la presente invención tiene un efecto de alivio de la leucoplasia mediante el aumento de la melanogénesis. Por lo tanto, el péptido de la presente invención puede utilizarse para la prevención, la mejora, y/o el tratamiento de la hipomelanosis.
- En la presente invención, la hipomelanosis puede ser vitiligo, albinismo, nevo despigmentado, pitiriasis alba, pitiriasis versicolor, despigmentación posinflamatoria, morfea, albinismo localizado, hipomelanosis en gotas idiopática y/o leucodermia punctata, pero sin limitación a estos.
  - En conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de cánceres, conteniendo la composición farmacéutica, como principio activo, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Dado que la composición de la presente invención contiene el péptido anterior de la presente invención como principio activo, las descripciones de contenidos en común entre ellas se omitirán para evitar una complejidad excesiva de la presente memoria descriptiva.

La composición de la presente invención, cuando se prepara como una composición farmacéutica, puede contener una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido anterior de la presente invención.

Además, la composición farmacéutica puede contener además un transportador farmacéuticamente aceptable, pero sin limitación a esto.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para lograr la eficacia o actividad del péptido anterior.

El vehículo farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente invención normalmente se utiliza en el momento de la formulación, y los ejemplos de los mismos pueden incluir, pero sin limitación, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y/o aceite mineral.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener además un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante, y similares, además de los ingredientes anteriores.

La composición farmacéutica de la presente invención se administra preferentemente por vía parenteral y, por ejemplo, puede administrarse por administración tópica en la piel.

La dosis apropiada de la composición farmacéutica de la presente invención varía dependiendo de factores tales como un método de formulación, una manera de administración, la edad del paciente, el peso corporal, el sexo, la morbilidad, la alimentación, un momento de administración, una vía de administración, una tasa de excreción y de la sensibilidad como respuesta. Los expertos en la materia pueden determinar y prescribir fácilmente la dosis que sea eficaz para el tratamiento o prevención deseados. En conformidad con una realización preferente de la presente invención, la dosis diaria de la composición farmacéutica de la presente invención es de 0,001-1000 mg/kg.

La composición farmacéutica de la presente invención se formula utilizando un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con un método que realiza fácilmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención, y la composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse en una forma de dosificación unitaria o puede insertarse en un envase multidosis. En este caso, la forma de dosificación puede ser una solución en un medio aceitoso o acuoso, una suspensión, una emulsión, un extracto, un polvo, gránulos, un comprimido, una cápsula o un gel (por ejemplo, un hidrogel), y puede contener además un agente de dispersión o un estabilizante.

En conformidad con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona una composición cosmética para la prevención o el alivio de la hipomelanosis, conteniendo la composición cosmética, como principio activo, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Cuando la composición de la presente invención se prepara como una composición cosmética, la composición puede contener una cantidad cosméticamente eficaz del péptido anterior de la presente invención.

Además, la composición cosmética puede contener además un transportador cosméticamente aceptable, pero sin limitación a esto.

20

40

45

50

55

60

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad cosméticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para lograr la eficacia de la composición anterior de la presente invención.

La composición cosmética de la presente invención puede formularse en cualquier forma de dosificación que se prepare de manera convencional, y los ejemplos de la misma pueden incluir una solución, 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 en polvo, una base en emulsión, una base de cera y un aerosol, pero no se limita a estos. Más específicamente, la composición cosmética de la presente invención puede prepararse en una forma de dosificación de loción emoliente, loción nutritiva, crema nutritiva, crema para masajes, esencia, crema de ojos, una crema limpiadora, espuma limpiadora, aqua limpiadora, paquete, aerosol y/o polvo.

En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética es una pasta, crema o gel, los ejemplos útiles del ingrediente vehículo pueden incluir un aceite animal, un aceite vegetal, cera, parafina, almidón, tragacanto, un derivado de celulosa, polietilenglicol, silicona, bentonita, sílice, talco y/u óxido de zinc, pero sin limitación a estos.

En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética es un polvo o aerosol, puede usarse lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio o un polvo de poliamida como ingrediente transportador, pero sin limitación a estos. En especial, en los casos en que la forma de dosificación de la presente invención es un aerosol, el aerosol puede incluir además un propulsor, tal como un clorofluorohidrocarburo, propano/butano o dimetiléter, pero sin limitación a estos.

En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética es una solución o emulsión, se puede usar un disolvente, solubilizante o emulsionante como componente transportador, y los ejemplos de los mismos incluyen agua, etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, aceite de 1,3-butilglicol, ésteres alifáticos de glicerol, polietilenglicol y/o ésteres de ácidos grasos de sorbitán.

En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética es una suspensión, los ejemplos útiles del ingrediente vehículo pueden incluir un diluyente líquido (tal como agua, etanol y/o propilenglicol), un agente de suspensión (tal como alcohol isoestearílico etoxilado, éster de polioxietilensorbitol y/o éster de polioxietilensorbitán), celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar y/o tragacanto, pero no se limita a estos.

En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética es un limpiador que contiene tensioactivo, los ejemplos útiles del ingrediente vehículo pueden ser sulfato de alcohol alifático, éter sulfato de alcohol alifático, monoéster de sulfosuccinato, isetionato, derivados de imidazolio, 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/o éster de ácido graso de glicerol etoxilado, pero no se limita a estos.

Los ingredientes contenidos en la composición cosmética de la presente invención pueden incluir, además de los ingredientes peptídicos y de vehículo como principios activos, los ingredientes utilizados habitualmente en composiciones cosméticas, por ejemplo, los complementos habituales, tales como un antioxidante, un purificador, un

solubilizante, vitaminas, un pigmento y/o un agente aromatizante, pero no se limita a estos.

### Efectos ventajosos

La presente invención se dirige a un péptido que tiene una actividad para estimular la melanogénesis, a una composición farmacéutica que contiene el péptido como principio activo para la prevención y/o el tratamiento de la hipomelanosis, a una composición cosmética del péptido como principio activo para la prevención y/o la mejora de la hipomelanosis, y a un uso del péptido para la prevención, la mejora y/o el tratamiento de la hipomelanosis. El péptido de la presente invención aumenta la actividad y la expresión de la tirosinasa, y aumenta la expresión de los factores implicados en la melanogénesis, presentando de este modo excelentes efectos en la melanogénesis, y puede aplicarse de forma muy ventajosa a medicamentos, producto parafarmacéutico y cosméticos a través de una excelente actividad y seguridad de los mismos.

## Breve descripción de los dibujos

15

30

35

- La FIG. 1a muestra los resultados de la confirmación de un efecto de aumento de la melanogénesis mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.
- La FIG. 1b muestra los resultados de la confirmación de un efecto de aumento de la melanogénesis mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación.
  - La FIG. 2a muestra los resultados de la confirmación de un efecto de aumento de la actividad de tirosinasa mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.
- La FIG. 2b muestra los resultados de la confirmación de un efecto de aumento de la actividad de tirosinasa mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación.
  - La FIG. 3a muestra los resultados de la confirmación de los aumentos de expresión de ARNm de MITF, tirosinasa y TRP1 mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.
  - La FIG. 3b muestra los resultados de la confirmación de los aumentos de expresión de ARNm de MITF, tirosinasa y TRP1 mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación.
  - La FIG. 4a muestra los resultados de la confirmación de los aumentos de expresión proteica de MITF y tirosinasa mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.
    - La FIG. 4b muestra los resultados de la confirmación de un aumento de la expresión proteica de la tirosinasa mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación.
- La FIG. 5 muestra los resultados de la confirmación de un aumento de la fosforilación de CREB mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

#### Mejor modo para llevar a cabo la invención

45

Se proporciona un péptido que tiene una actividad para estimular la melanogénesis, consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

# Modo para llevar a cabo la invención

50

En los sucesivo en el presente documento, se describirá la presente invención en detalle con referencia a ejemplos. Estos ejemplos son solo para ilustrar la presente invención de forma más específica, y será evidente para los expertos en la materia que estos ejemplos no limitan el alcance de la presente invención.

# 55 Ejemplos

### Ejemplo sintético 1: Síntesis de péptidos

- Se añadieron 700 mg de resina de cloruro de clorotritilo (resina CTL, Nova Biochem N.º de Cat 01-64-0021) en un recipiente de reacción, y se añadieron 10 ml de cloruro de metileno (CM), seguido de agitación durante 3 minutos. Después de retirar la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF), seguido de agitación durante 3 minutos, y luego se retiró nuevamente el disolvente.
- Se añadieron 10 ml de una solución de diclorometano a un reactor, y se añadieron 200 mmoles de Fmoc-Asp(OtBu)-OH (Bachem, Swiss) y 400 mmoles de diisopropiletilamina (DIEA). Después de eso, la mezcla se disolvió bien con agitación, y después se llevó a cabo la reacción con agitación durante 1 hora.

Después de la reacción, se realizó un lavado y luego se disolvieron metanol y DIEA (2:1) en diclorometano (DCM), seguido de reacción durante 10 minutos, y luego el material resultante se lavó con un exceso de DCM/DMF (1:1). Después de retirar la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF), seguido de agitación durante 3 minutos, y luego se retiró nuevamente el disolvente.

Se añadieron 10 ml de una solución de desprotección (piperidina al 20 %/DMF) a un recipiente de reacción, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos, y luego se retiró la solución. Se añadió una cantidad igual de una solución de desprotección, y luego la reacción se mantuvo nuevamente durante 10 minutos, y luego se retiró la solución, seguido de dos lavados con DMF, una vez con MC y otra con DMF, durante 3 minutos cada uno, preparando de este modo la resina de Ser(tBu)-CTL.

Se añadieron 10 ml de una solución de DMF a un nuevo reactor, y se añadieron 200 mmol de Fmoc-Thr(tBu)-OH (Bachem, Swiss), 200 mmol de HoBt y 200 mmoles de Bop, y la mezcla se disolvió bien con agitación. Se añadieron 400 mmoles de DIEA a un reactor en dos portes divididas, y luego se agitó durante al menos 5 minutos hasta que se disolvieron todos los sólidos.

La solución mezclada de aminoácidos disueltos se añadió al recipiente de reacción que contenía la resina desprotegida, y se realizó la reacción con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de retirar la solución de reacción, se realizó la agitación utilizando una solución de DMF tres veces durante 5 minutos cada una, seguido de la retirada.

Se tomó una pequeña cantidad de la resina de reacción para comprobar el alcance de la reacción utilizando la prueba de Kaiser (prueba de ninhidrina). La reacción de desprotección se realizó dos veces, utilizando una solución de desprotección, de la misma manera que se describe anteriormente, preparando de este modo la resina Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-CTL.

Después de un lavado suficiente con DMF y MC, se realizó nuevamente la prueba de Kaiser, y luego se realizó la siguiente prueba de unión de aminoácidos de la misma manera que se describe anteriormente.

Se realizó una reacción en cadena en el orden de Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, basándose en la secuencia de aminoácidos seleccionada. El grupo protector Fmoc se eliminó mediante reacción dos veces con la solución de desprotección durante 10 minutos cada vez, y luego el lavado apropiado.

Se añadieron anhídrido acético, DIEA y HoBt para realizar acetilación durante 1 hora, y luego la resina de peptidilo preparada se lavó con DMF, MC y metanol tres veces para cada uno, se secó bajo flujo de gas nitrógeno y secó por completo mediante descompresión al vacío en P<sub>2</sub>0<sub>5</sub>.

Después de eso, se añadieron 30 ml de una solución de salida [ácido trifluoroacético (TFA) al 95 %, agua destilada al 5 % 2 y tioanisol al 5 % 2], y la reacción se mantuvo durante 2 horas mientras la mezcla se agitaba intermitentemente a temperatura ambiente.

La resina se obtuvo mediante filtración, se lavó con una pequeña cantidad de una solución de TFA y luego se mezcló con la solución madre. La destilación se realizó a presión reducida para reducir el volumen total a la mitad, y luego se añadieron 50 ml de éter frío para inducir la precipitación.

Después de eso, se recogió el precipitado mediante centrifugación, seguido de dos lavados con éter frío. Se retiró la solución madre, seguido de un secado suficiente en atmósfera de nitrógeno, sintetizando de este modo 0,65 g de péptido 1 no purificado, Arg-Trp-Arg-Lys-lle-Glu-Asn (rendimiento: 92,0 %).

El peso molecular se determinó como de 1157,3 (valor teórico: 1157,33) mediante el uso de un sistema de análisis de peso molecular. Además, se sintetizó el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 mediante el método descrito anteriormente.

[Tabla 1]

		['asa']		
	SEQ ID NO	Secuencia (5'-> 3')	Valor del análisis (espectrómetro de masas)	
			Valor analítico	Valor teórico
	1	Arg-Trp-Arg-Arg-Lys-lle-Glu-Asn	1157,3	1157,33
ĺ	2	Phe-Cys-Leu-Gly-Pro-Cys-Pro-Tyr-lle-Trp-Ser-Leu	1398,7	1398,7

Ejemplo 1: Ensayo de melanogénesis

10

25

30

35

50

55

60

Después de cultivar melanocitos (línea celular B16F10) en placas de 6 pocillos en una incubadora a 37 °C durante 24 horas, se retiró el medio de cada placa y se cambió por medio recién preparado, seguido de tratamiento con el péptido

de la presente invención a distintas concentraciones. Después de la incubación durante 72 horas, se retiró el medio de cultivo y se recolectaron las células, y luego se transfirieron a tubos de 5 ml, seguido de centrifugación a 13.000 rpm durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante y se recogieron los sobrenadantes de células para observar la melanina. A continuación, se añadieron 150 m² de NaOH 2 M a los sedimentos celulares para la lisar melanina intracelular a 60 °C durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 100 m² del sobrenadante obtenido de la lisis en cada pocillo de placas de 96 pocillos, y se midió la absorbancia a 490 nm. Los resultados se muestran en las FIG. 1a y 1b.

Como se puede confirmar en las FIG. 1a y 1b, la melanogénesis aumentó cuando la línea celular B16F10 de melanina de ratón se trató con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2.

#### Ejemplo 2: Ensayo de actividad de tirosinasa

Se cultivaron células de una línea celular de melanoma (B16F10) en placas de cultivo de 6 pocillos durante 24 horas, y se trataron con el péptido a distintas concentraciones, seguido de cultivo durante 72 horas. Las placas de cultivo de 6 pocillos se cargaron sobre hielo y se lavaron con PBS frío, y luego se añadieron 300 m² de tampón de fosfato de sodio 0,1 M (tampón de lisis de pH 6) que contenía Triton X-100 al 1 %. Las células se recogieron en tubos de 1,5 ml, y luego se rompieron las membranas celulares repitiendo cinco veces congelación rápida a -270 °C y descongelación. Después de centrifugar a 13.000 rpm durante 20 minutos, se recogió el sobrenadante en otros tubos de 1,5 ml y se cuantificó la proteína de las muestras. Las muestras se diluyeron para tener la misma concentración de proteína y luego se dispensaron cada tres pocillos en placas de cultivo de 96 pocillos, y luego se añadieron 20 m² de L-dopa 10 mM, seguido de incubación a 37 °C durante 1 hora. Se midió la absorbancia a 475 nm.

Como se puede confirmar a partir de las FIG. 2a y 2b, la actividad de tirosinasa aumentó cuando la línea celular B16F10 de melanina de ratón se trató con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2

### Ejemplo 3: RT-PCR de genes relacionados con la melanogénesis

Se incubaron melanocitos (línea celular B16F10) en placas de cultivo de 6 pocillos en una incubadora durante 24 horas, y se trataron con los péptidos de la presente divulgación a distintas concentraciones. Después de extraer el ARN de las células incubadas durante 72 horas, se preparó ADNc. La PCR se realizó utilizando los cebadores respectivos específicos para MITF y tirosinasa, que son los factores implicados en la melanogénesis, y se observaron los cambios de expresión de los genes respectivos. Los resultados se muestran en las FIG. 3a y 3b.

[Tabla 2]					
SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')			
3	MITF_F	CCAGCCTGGCGATCATGTCAT			
4	MITF_R	GGTCTGGACAGGAGTTGCTG			
5	tyrosinase_F	GGCCAGCTTTCAGGCAGAGG			
6	tyrosinase_R	TGGTGCTTCATGGGCAAAAT			
7	TRP1_F	TCTGTGAAGGTGTGCAGGAG			
8	TRP1_R	CCGAAACAGAGTGGAAGGTT			

Como se puede confirmar en las FIG. 3a y 3b, la expresión de ARNm de MITF, tirosinasa y TRP1, que son factores transcripcionales implicados en la melanogénesis, aumentó cuando la línea celular B16F10 de melanina de ratón se trató con el péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

# Ejemplo 4: Transferencia de Western de proteínas relacionadas con la melanogénesis

Se incubaron melanocitos (línea celular B16F10) en placas de cultivo de 6 pocillos en una incubadora durante 24 horas, y se trataron con los péptidos de la presente divulgación a distintas concentraciones. Después de 72 horas de incubación, las células se lisaron y se sometieron a transferencia de Western utilizando anticuerpos específicos (dos tipos, ambos de Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) para investigar la expresión de MITF y tirosinasa, que son los factores implicados en la melanogénesis. Los resultados se muestran en las FIG. 4a y 4b.

Como se puede confirmar a partir de la FIG. 4a, la expresión proteica del factor transcripcional MITF y de la enzima tirosinasa, que están implicados en la melanogénesis, aumentó cuando la línea celular B16F10 de melanina de ratón se trató con el péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Como se también se puede confirmar a partir de la FIG. 4b, la expresión proteica de la tirosinasa, que está implicada en la melanogénesis, aumentó cuando la línea celular B16F10 de melanina de ratón se trató con el péptido compuesto

8

10

15

20

25

30

35

40

45

50

por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

### Ejemplo 5: Ensayo de actividad proteica relacionada con la melanogénesis

Se incubaron melanocitos (línea celular B16F10) en placas de cultivo de 6 pocillos en una incubadora durante 24 horas, y se trataron con el péptido de la presente divulgación a distintas concentraciones. Después de 72 horas de incubación, las células se lisaron y se sometieron a transferencia de Western utilizando anticuerpos específicos (Cell Signaling Technology, EE. UU.) para investigar los niveles de fosforilación de CREB, que es una sustancia de señalización implicada en la melanogénesis. Los resultados se muestran en la FIG. 5.

Como se puede confirmar a partir de la FIG. 5, el nivel de fosforilación de CREB, que es un factor implicado en la melanogénesis, aumentó cuando la línea celular B16F10 de melanina de ratón se trató con el péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

#### 15 Aplicabilidad industrial

ccagcctggc gatcatgtca t 21

20

La presente invención se refiere a un péptido que muestra actividad estimulante de la melanogénesis, a una composición farmacéutica que contiene el péptido como principio activo para la prevención y/o el tratamiento de la hipomelanosis, a una composición cosmética que contiene el péptido como principio activo para la prevención y/o el alivio de la hipomelanosis, y a un uso del péptido para la prevención, el alivio y/o el tratamiento de la hipomelanosis.

```
<110> CAREGEN CO., LTD.
        <120> Péptidos que tienen actividad para promover la síntesis de melanina y usos de los mismos
25
        <130> PP170016
        <160>8
30
        <170> KopatentIn 2.0
        <210> 1
        <211>8
        <212> PRT
35
        <213> Secuencia artificial
        <220>
        <223> Péptido 1
40
        <400> 1
                                    Arg Trp Arg Arg Lys Ile Glu Asn
                                                            5
        <210> 2
45
        <211> 12
        <212> PRT
        <213> Secuencia artificial
        <220>
50
        <223> Péptido 2
        <400> 2
                         Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu
                                                 5
55
        <210> 3
        <211> 21
        <212> ADN
        <213> Cebador directo de MITF
60
```

# ES 2 796 401 T3

5	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> Cebador inverso de M	ITF	
5	<400> 4 ggtctggaca ggagttgctg 20		
10	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Cebador directo de tiro	211> 20	
15	<400> 5 ggccagcttt caggcagagg 20		
20	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Cebador inverso de tiro	osinasa	
	<400> 6 tggtgcttca tgggcaaaat 20		
25	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Cebador directo de TR	RP1	
30	<400> 7 tctgtgaagg tgtgcaggag 20		
35	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Cebador inverso de TF	RP1	
	<400> 8 ccgaaacaga gtggaaggtt	20	

# ES 2 796 401 T3

### **REIVINDICACIONES**

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

15

20

25

- 5 2. Un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, teniendo el péptido una actividad para estimular la melanogénesis.
  - 3. El péptido de la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido aumenta la actividad de la tirosinasa.
- 4. El péptido de la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido aumenta la expresión de un factor relacionado con la síntesis de melanina seleccionado del grupo que consiste en factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) y proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TRP1).
  - 5. El péptido de la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido aumenta la expresión de la tirosinasa.
  - 6. El péptido de la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido aumenta la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB).
  - 7. Una composición farmacéutica que comprende un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
  - 8. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en medicina.
  - 9. Una composición farmacéutica que comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 para su uso en la prevención o el tratamiento de la hipomelanosis.
  - 10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la hipomelanosis es vitiligo, albinismo, nevo despigmentado, pitiriasis alba, pitiriasis versicolor, despigmentación posinflamatoria, morfea, albinismo localizado, hipomelanosis en gotas idiopática o leucodermia punctata.
- 30 11. Una composición cosmética que comprende un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 para su uso en la prevención o la mejora de la hipomelanosis.
- 12. La composición cosmética para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la hipomelanosis es vitiligo, albinismo, nevo despigmentado, pitiriasis alba, pitiriasis versicolor, despigmentación posinflamatoria, morfea,
   35 albinismo localizado, hipomelanosis en gotas idiopática o leucodermia punctata.

11

Fig. 1a

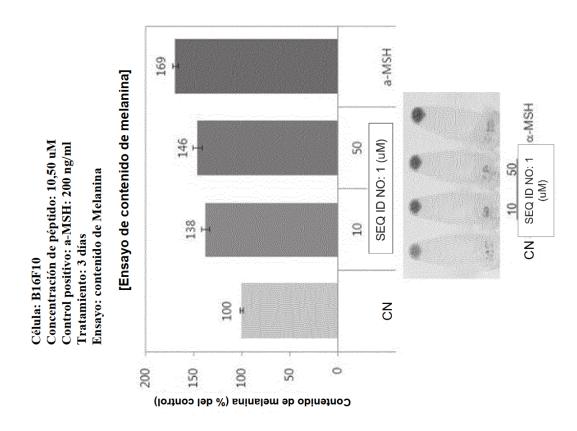


Fig. 1b

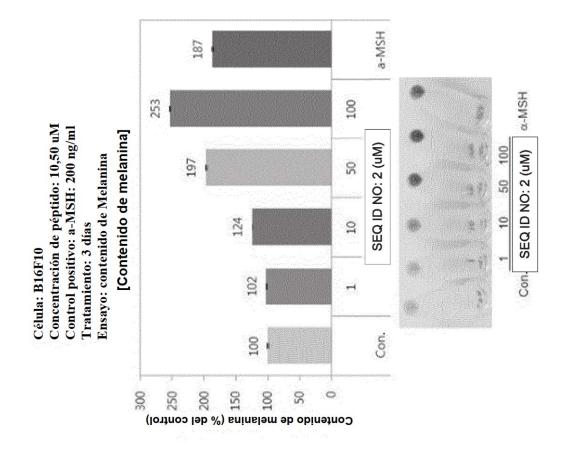


Fig. 2a

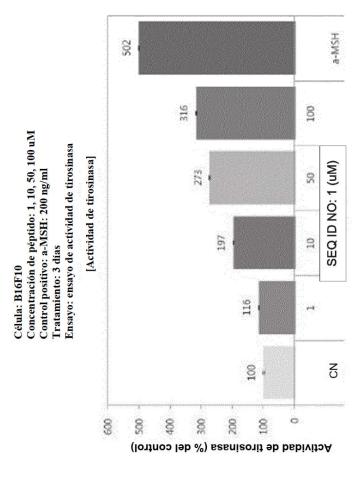
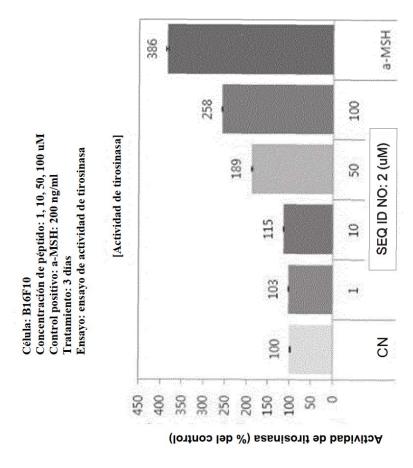


Fig. 2b



Tirosinasa GAPDH TRP1 Ħ (Mu) Célula: B16F10 Concentración de péptido: 10,50 uM Control positivo: a-MSH: 200 ng/ml Tratamiento: 3 días Ensayo: RT-PCR a-MSH 8 SEQ ID NO: 1 S

Fig. 3b

Célula: B16F10 Concentración de péptido: 10,50 uM Control positivo: a-MSH: 200 ng/ml Tratamiento: 3 días Ensayo: RT-PCR

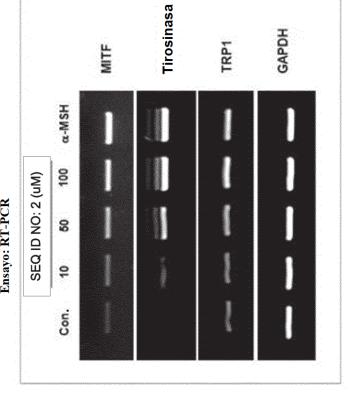


Fig. 4a

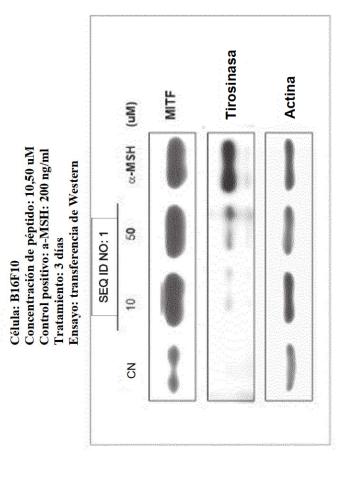


Fig. 4b

Célula: B16F10
Concentración de péptido: 10,50 uM
Control positivo: a-MSH: 200 ng/ml
Tratamiento: 3 días
Ensayo: transferencia de Western
SEQ ID NO: 2 (uM)

Con, 10 50 100 α-MSH

Tirosinasa

Actina

Fig. 5

