

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 470**

51 Int. Cl.:

C07K 5/11 (2006.01)
C07K 5/103 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)
A61K 38/08 (2009.01)
A61Q 7/00 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2017 PCT/KR2017/001409**
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.08.2017 WO17142254**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2017 E 17753415 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.03.2021 EP 3418291**

54 Título: **Péptido que tiene actividad promotora del crecimiento del cabello y uso del mismo**

30 Prioridad:

18.02.2016 KR 20160019292

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.10.2021

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, MIN WOONG**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 870 470 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 actividad promotora del crecimiento del cabello y uso del mismo

5 **Campo técnico**

En el presente documento se describe un péptido que tiene actividad para estimular la producción y/o el crecimiento del cabello, una composición que contiene el péptido como principio activo para estimular la producción de cabello y un uso del péptido para estimular la producción de cabello.

10

Antecedentes de la técnica

El folículo piloso, que crece desde una parte inferior de la epidermis primitiva y se extiende a una capa de piel más profunda, es un órgano distintivo que se encuentra en la piel de los mamíferos. Existe un tapón celular conocido como folículo o célula de la papila dérmica en la base del folículo piloso (Stenn y Paus, *Physiol. Rev.*, 81: 449 (2002)), y la papila es esencial en la circulación normal del folículo piloso (Oliver, *Embryol. Exp. Morph.* 15: 3311 (1966); y Oliver, *Embryol. Exp. Morph.* 16: 231 (1966)) y el crecimiento del tallo del cabello. El tallo del cabello es una estructura en forma de hilo formada por células epiteliales compuestas por filamentos de queratina y proteínas de agregación de filamentos firmemente unidas a los mismos.

15

20

Los cabellos humanos se caen y vuelven a producir mientras se repiten cíclicamente las fases anágena, catágena y telógena. El ciclo de crecimiento en el ciclo del cabello está determinado mediante la regulación de hormonas u otros factores de crecimiento. El estrés grave o la desnutrición pueden hacer avanzar las fases catágena y telógena, dando lugar a una caída del cabello grave (*American Journal of Pathology*, 162 (3) (2003), (Arck, Petra Clara; Handjiski, Bori)).

25

En casos de calvicie de patrón masculino, los folículos pilosos de la parte frontal y superior del cuero cabelludo son sensibles a los andrógenos. Por tanto, la calvicie de patrón masculino corresponde a la minimización de los folículos pilosos más que a la destrucción de los folículos pilosos y es causada por la secreción excesiva de la hormona masculina andrógeno. La secreción excesiva de andrógenos da como resultado la activación de la 5- α reductasa, que convierte la testosterona en dihidrotestosterona (DHT). La dihidrotestosterona resultante acorta el ciclo de crecimiento del cabello y miniaturiza los folículos pilosos, disminuyendo la cantidad de pelos adultos gruesos y fuertes, que da lugar a la caída del cabello.

30

En general, la caída del cabello aumenta con el envejecimiento. Por ejemplo, diferentes condiciones de los trastornos, tal como las cicatrices asociadas con la alopecia cicatricial, quemaduras o lesiones por compresión, pueden causar una caída grave del cabello. Se han utilizado varias sustancias como medicamentos para tratar este fenómeno de caída del cabello, pero los medicamentos son costosos o causan varios efectos adversos.

35

Además, estos medicamentos tienen el inconveniente de que se requiere el uso sostenido de los mismos; la caída del cabello vuelve a producirse cuando se detiene su uso; existen diferencias individuales en la eficacia; y los efectos secundarios varían de persona a persona.

40

Asimismo, las materias primas utilizadas como cosméticos tienen la ventaja de ser económicas, pero su eficacia no es muy grande ya que contienen ingredientes procedentes de extractos vegetales. Por lo tanto, existe una necesidad creciente en la técnica de nuevos ingredientes eficaces que sean más económicos en términos de costes.

45

Dos fármacos disponibles conocidos hasta ahora (minoxidil y finasterida) podrían retrasar la caída adicional del cabello, pero no inducen la regeneración de nuevos folículos pilosos. El documento EP2740740 describe un péptido derivado del ligando EDAR y sus efectos sobre la mejora de la caída del cabello. Entre los cosméticos capilares, también se han publicado muchos productos contra la caída del cabello que utilizan extractos vegetales y similares.

50

Por ejemplo, los productos que utilizan extractos vegetales y similares que se han formulado incluyen: productos que contienen extractos de raíz de sophora, ají picante, swertia, corteza de morus, hojas de morus, ginseng, regaliz, peonía, dedalera, hinojo, fruta de cornus, ajo y similares; productos en donde se añade una composición que contiene xantinas y hormonas del crecimiento para mejorar el metabolismo celular suprimido por el exceso de dihidrotestosterona y estimular el crecimiento del cabello inducido por las hormonas del crecimiento, previniendo, de este modo, la caída del cabello y logrando la producción de cabello, que da lugar a un efecto estimulante del crecimiento del cabello; productos estimulantes de la producción de cabello que aportan nutrientes al cuero cabelludo y al cabello mediante la elaboración de productos que contienen minerales, vitaminas y extractos de té verde, romero, artemisa, o regaliz, para estimular la producción de cabello y el crecimiento del cabello, y tienen efectos en la prevención de la caída del cabello y la estimulación del crecimiento del cabello; y productos para la calvicie de patrón masculino en donde las sustancias, tal como la vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E, ácido nicotínico, ácido pantoténico, biotina y ácido fólico, se mezclan con extractos vegetales para inhibir la 5- α reductasa, evitando, de este modo, la producción de dihidrotestosterona en el metabolismo de las hormonas masculinas y ayudando al metabolismo del cabello. Sin embargo, los productos que afectan incluso a la producción de cabello nuevo son difíciles de encontrar.

55

60

65

Sumario de la invención

La invención proporciona un péptido que tiene actividad para estimular la producción de cabello, consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3.

La invención también proporciona un método no terapéutico para prevenir o mejorar la caída del cabello, que comprende administrar un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3.

La invención proporciona además un método no terapéutico para estimular la producción de cabello o el crecimiento del cabello, que comprende administrar un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3.

La presente invención proporciona adicionalmente un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3 para su uso en la prevención o mejora de una afección de caída del cabello.

Descripción detallada

Los presentes inventores se esforzaron por formular un péptido que tuviera una excelente producción de cabello y/o eficacia en el crecimiento del cabello y, como resultado, los presentes inventores seleccionaron tres tipos de péptidos que tienen una excelente eficacia de producción de cabello a partir de bibliotecas de péptidos de los presentes inventores y establecieron experimentalmente la producción de cabello y/o la eficacia de crecimiento del cabello de los mismos.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que tiene una actividad para estimular la producción de cabello, consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3.

El péptido puede contener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3 y, por ejemplo, puede estar compuesto por una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3.

Como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a una molécula lineal formada de restos de aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces peptídicos. El péptido descrito en el presente documento puede prepararse mediante métodos de síntesis química conocidos en la técnica, especialmente, técnicas de síntesis en fase sólida (solid-phase synthesis techniques; 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 descrito en el presente documento se obtiene mediante la exploración de péptidos, que tienen una excelente eficacia en la producción de cabello, de bibliotecas de péptidos que poseen los presentes inventores, a través de experimentos de proliferación celular, y un total de tres tipos de péptidos descritos en el presente documento.

El péptido descrito en el presente documento puede tener una modificación inducida en el extremo amino y/o carboxilo del mismo para seleccionar una parte de una secuencia de aminoácidos y aumentar la actividad del mismo.

Por ejemplo, la modificación carboxiterminal puede ser una modificación del extremo carboxilo del péptido en un grupo hidroxilo (-OH), un grupo amino (-NH₂), un grupo azida (-NHNH₂) o similares.

Además, la modificación aminoterminal puede ser una unión de al menos un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenilmetoxycarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y polietilenglicol (PEG) al extremo amino del péptido. El grupo protector protege el péptido descrito en el presente documento, de enzimas de escisión de proteínas *in vivo*.

La modificación aminoterminal y/o carboxiterminal del péptido mejora la estabilidad del péptido, y esta modificación permite que el péptido descrito en el presente documento tenga una semivida aumentada en el momento de la 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 en el almacenamiento (por ejemplo, estabilidad en el almacenamiento a temperatura ambiente), así como a la estabilidad *in vivo*.

Como se usa en el presente documento, el término "estimulante de la producción de cabello" se refiere a la producción de cabello y se usa en un sentido amplio para aumentar la tasa de producción de cabello y la cantidad de producción de cabello. Además, el término significa que se potencian las funciones de la raíz capilar o que aumenta el número de

pelos que crecen en los folículos pilosos debido al acortamiento del ciclo de caída y producción de cabello.

Como se usa en el presente documento, la expresión "crecimiento del cabello" se refiere a aumentar el grosor del cabello generado o influir en la tasa de aumento de la longitud.

Los péptidos descritos en el presente documento pueden estimular el crecimiento de las células de los folículos pilosos, aumentar la expresión de β -catenina como factor relacionado con el crecimiento del cabello, aumentar la expresión del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como factores de crecimiento relacionados con el crecimiento del cabello, aumentar la expresión de fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K) como molécula de señalización del crecimiento del cabello, aumentar la fosforilación de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), aumentar la expresión de MSX2 y queratina-14 como factores relacionados con el crecimiento del cabello, inhibir la expresión de TGF- β 1 como retraso en el crecimiento del cabello, aumentar la expresión de Bcl-2 como proteína inhibidora de la apoptosis e inducir la reducción de la expresión de Bax como proteína relacionada con la apoptosis.

Estos resultados indican que los péptidos de la presente invención tienen un excelente efecto en la producción y/o crecimiento del cabello. Por lo tanto, los péptidos de la presente invención pueden usarse para la prevención y/o alivio de la caída del cabello y la estimulación de la producción de cabello y/o crecimiento del cabello.

También se describe en el presente documento una composición para prevenir o mejorar la caída del cabello, conteniendo la composición un péptido como se describe en el presente documento como principio activo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "prevenir la caída del cabello" se refiere a bloquear o reducir la caída del cabello de los folículos pilosos o del cuero cabelludo.

Los péptidos descritos en el presente documento inducen la proliferación de células presentes en los folículos pilosos del tejido de la piel para producir raíces capilares, que da lugar a la producción de nuevos folículos pilosos. Asimismo, el péptido descrito en el presente documento activa las señales de β -catenina para expresar genes estimulantes de la producción de cabello y aumentar la expresión de factores de crecimiento.

El péptido descrito en el presente documento promueve la fase anágena durante la cual se produce y crece el cabello, muestra un efecto inhibitorio de la caída del cabello al mantener el ciclo del cabello, que pasa de la fase catágena debido a varios factores ambientales, a la fase anágena, y mantiene el cabello sano proporcionando nutrientes al cabello normal. Por lo tanto, la composición descrita en el presente documento es muy eficaz en la prevención y/o alivio de la caída del cabello.

Debido a que la composición descrita en el presente documento contiene el péptido anterior como principio activo, se omitirán las descripciones del contenido superpuesto entre las mismas para evitar una complejidad excesiva de la presente memoria descriptiva.

También se describe en el presente documento una composición para estimular la producción de cabello y/o el crecimiento del cabello, comprendiendo la composición, como principio activo, al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3.

La composición se puede preparar en una composición cosmética.

La composición cosmética descrita en el presente documento puede contener una cantidad cosméticamente eficaz del péptido descrito en el presente documento.

Además, la composición cosmética puede contener además un transportador cosméticamente aceptable.

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

La composición cosmética descrita en el presente documento puede formularse en cualquier forma de dosificación que se prepare convencionalmente, 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 tensioactivos, un aceite, una base en polvo, una base en emulsión, una base de cera y un aerosol. Por ejemplo, la composición cosmética descrita en el presente documento puede prepararse en una forma de dosificación de loción emoliente, loción nutritiva, crema nutritiva, crema para masaje, esencia, crema para los ojos, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, masa, aerosol y/o polvo.

En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética sea una pasta, crema o gel, ejemplos útiles del ingrediente transportador pueden incluir un aceite animal, un aceite vegetal, cera, parafina, almidón, tragacanto, un derivado de celulosa, polietilenglicol, silicona, bentonita, sílice, talco u óxido de zinc.

En los casos en los que la forma de dosificación de la composición cosmética sea un polvo o un aerosol, se puede utilizar lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio o un polvo de poliamida como ingrediente transportador. Especialmente, en los casos en que la forma de dosificación sea un aerosol, el aerosol puede incluir además un propulsor, tal como clorofluorohidrocarburo, propano/butano o dimetiléter.

En los casos en los que la forma de dosificación de la composición cosmética sea una solución o una emulsión, se puede utilizar un disolvente, solubilizante o emulsionante como un componente transportador, y 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 ésteres de ácidos grasos de sorbitán.

En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética sea una suspensión, ejemplos útiles del ingrediente transportador pueden incluir un diluyente líquido (tal como agua, etanol o propilenglicol), un agente de suspensión (tal como alcohol isoestearílico etoxilado, éster de polioxietilensorbitol o éster de polioxietilen sorbitán), celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar o tragacanto.

En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética sea un limpiador que contenga tensioactivos, ejemplos útiles del ingrediente transportador 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, alquil amido betaina, alcohol alifático, glicéridos de ácidos grasos, dietanolamida de ácidos grasos, aceite vegetal, derivados de lanolina o éster de ácidos grasos con glicerol etoxilado.

Los ingredientes que se encuentran en la composición cosmética descrita en el presente documento pueden incluir, además de los péptidos y los ingredientes transportadores como principios activos, ingredientes normalmente utilizados en composiciones cosméticas, por ejemplo, suplementos ordinarios, tal como un antioxidante, un purificador, un solubilizante, vitaminas, un pigmento y/o un aromatizante.

También se describe en el presente documento un uso de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3 para prevenir y/o aliviar la caída del cabello.

Debido a que el péptido es el mismo que el péptido anterior, se omitirán las descripciones del contenido superpuesto entre las mismas para evitar una complejidad excesiva de la presente memoria descriptiva.

También se describe en el presente documento un uso de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3 para estimular la producción de cabello y/o el crecimiento del cabello.

Debido a que el péptido es el mismo que el péptido anterior, se omitirán las descripciones del contenido superpuesto entre las mismas para evitar una complejidad excesiva de la presente memoria descriptiva.

Efectos ventajosos

La presente divulgación se refiere a un péptido que tiene una actividad para estimular la producción de cabello y/o el crecimiento del cabello, a una composición que contiene el péptido como principio activo para prevenir y/o mejorar la caída del cabello, a una composición que contiene el péptido como principio activo para estimular la producción de cabello y/o el crecimiento del cabello, al uso del péptido para prevenir y/o mejorar la caída del cabello y al uso del péptido para estimular la producción de cabello y/o el crecimiento del cabello. El péptido estimula el crecimiento de las células del folículo piloso y aumenta la expresión de factores de crecimiento relacionados con la producción de cabello y los factores relacionados con la producción de cabello, teniendo, de este modo, excelentes efectos sobre la producción de cabello y/o el crecimiento del cabello y por lo tanto el péptido puede aplicarse de manera ventajosa a productos cosméticos por una excelente actividad y seguridad del mismo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1a es un gráfico que muestra un efecto estimulante del crecimiento de células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos (HHFDPC, por sus siglas en inglés) de un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

La figura 1b es un gráfico que muestra un efecto estimulante del crecimiento de células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos (HHFDPC, por sus siglas en inglés) de un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

La figura 1c es un gráfico que muestra un efecto estimulante del crecimiento de células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos (HHFDPC, por sus siglas en inglés) de un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

La figura 2a es un diagrama que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de β -

catenina mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

La figura 2b es un diagrama que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de β -catenina mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

La figura 2c es un diagrama que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de β -catenina mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

La figura 3a es una imagen que muestra los resultados de la confirmación de los aumentos de la expresión de KGF y bFGF mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

La figura 3b es un diagrama que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de VEGF mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

La figura 3c es un diagrama que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de VEGF y bFGF mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

La figura 4a es una imagen que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de PI3K y el aumento de la fosforilación de ERK mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

La figura 4b es una imagen que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de PI3K y el aumento de la fosforilación de ERK mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

La figura 4c es una imagen que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de PI3K y el aumento de la fosforilación de ERK mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

La figura 5a es una imagen que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de MSX2 mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

La figura 5b es una imagen que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de MSX2 mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

La figura 6a es una imagen que muestra los resultados de la confirmación de la inhibición de la expresión de TGF- β 1 mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

La figura 6b es una imagen que muestra los resultados de la confirmación de la inhibición de la expresión de TGF- β 1 mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

La figura 7a es una imagen que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de Bcl-2 y el aumento de la expresión de Bax mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

La figura 7b es una imagen que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de Bcl-2 y el aumento de la expresión de Bax mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

La figura 8 es una imagen que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de queratina-14 mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Mejor modo

La presente invención se refiere a un péptido que tiene una actividad para estimular la producción de cabello, consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3.

Modo para llevar a cabo la invención

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los ejemplos. Estos ejemplos son solamente para ilustrar la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo sintético 1: Síntesis de péptidos

Se añadieron 700 mg de resina de cloruro de cloro tritilo (resina CTL, Nova Biochem Cat. N.º 01-64-0021) en un recipiente de reacción y se añadieron 10 ml de cloruro de metileno (MC, por sus siglas en inglés), seguido de agitación durante 3 minutos. Después de eliminar la solución, se añadieron 10 ml de amida en forma de dimetilo (DMF), seguido de agitación durante 3 minutos, y a continuación se eliminó de nuevo el disolvente.

Se añadieron 10 ml de una solución de diclorometano a un reactor y se añadieron 200 mmol de Fmoc-Ile-OH (Bachem, Suiza) y 400 mmol de diisopropiletilamina (DIEA). Posteriormente, la mezcla se disolvió bien con agitación y la reacción se realizó con agitación durante 1 hora.

Después de la reacción, se realizó un lavado y a continuación se disolvieron metanol y DIEA (2:1) en diclorometano (DCM), seguido de reacción durante 10 minutos, y a continuación el material resultante se lavó con exceso de DCM/DMF (1:1). Después de eliminar la solución, se añadieron 10 ml de amida en forma de dimetilo (DMF), seguido de agitación durante 3 minutos, y a continuación se eliminó de nuevo 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 a continuación se eliminó la solución. Se añadió la misma cantidad de una solución de desprotección y a continuación la reacción se mantuvo de nuevo durante 10 minutos y posteriormente, se eliminó la solución, seguido de lavado dos veces con DMF, una vez con MC y una vez con DMF, durante 3 minutos cada vez, preparando, de este modo, la resina Ile-CTL.

Se añadieron 10 ml de una solución de DMF a un nuevo reactor y se añadieron 200 mmol de Fmoc-Lys(Boc)-OH (Bachem, Suiza), 200 mmol de HoBt y 200 mmol de Bop y la mezcla se disolvió bien con agitación. Se añadieron 400 mmol de DIEA a un reactor en dos porciones divididas y a continuación se realizó agitación durante al menos 5 minutos hasta que se disolvieron todos los sólidos.

La solución mixta de aminoácidos disueltos se añadió en el recipiente de reacción que contenía la resina desprotegida y la reacción se realizó con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de eliminar la solución de reacción, la agitación se realizó usando una solución de DMF tres veces durante 5 minutos cada vez, seguido de la eliminación.

Se tomó una pequeña cantidad de la resina de reacción para comprobar el grado de reacción usando la prueba de Kaiser (prueba de ninhidrina). La reacción de desprotección se realizó dos veces usando una solución de desprotección de la misma manera como se describe anteriormente, preparando, de este modo, la resina Lys(Boc)-Ile-CTL.

Después de un lavado suficiente con DMF y MC, se realizó de nuevo la prueba de Kaiser, y a continuación se realizó la siguiente prueba de unión de aminoácidos de la misma manera como se describe anteriormente.

Se realizó una reacción en cadena en el orden de Fmoc-Arg(Pbf)-OH y 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 para cada uno y a continuación con lavado favorable.

Se añadieron anhídrido acético, DIEA y HoBt para realizar la acetilación durante 1 hora, y a continuación la resina de peptidilo preparada se lavó con DMF, MC y metanol tres veces para cada uno, se secó bajo el flujo de nitrógeno gaseoso y se secó por completo por descompresión al vacío en P₂O₅.

Posteriormente, se añadieron 30 ml de una solución de partida (ácido trifluoroacético (TFA) al 95 %, agua destilada 2 al 5 % y tioanisol 2 al 5 %), y la reacción se mantuvo durante 2 horas mientras la mezcla se agitó de manera intermitente a temperatura ambiente.

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

Posteriormente, los precipitados se recogieron por centrifugación, seguida de lavado dos veces con éter frío. La solución madre se eliminó, seguido de un secado suficiente en una atmósfera de nitrógeno, sintetizando, de este modo, 0,7 g de péptido 1 sin purificar, Arg-Arg-Lys-Ile (rendimiento: 90,0 %).

El peso molecular se determinó como 571,7 (valor teórico: 571.72) utilizando un sistema de análisis de peso molecular.

Los otros péptidos, el péptido 2 compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y el péptido 3 compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 también se sintetizaron mediante el mismo método que se describe anteriormente.

[Tabla 1]

SEQ ID NO	Secuencia (5'→ 3')	Valor de análisis de peso molecular (espectrómetro de masas)	
		Valor analítico	Valor teórico
1	Arg-Arg-Lys-Ile	571,7	571,72
2	Ile-Tyr-Phe-Tyr	604	604,7
3	Lys-Lys-Phe-Ile-Gln-Gln-Val-Tyr-Leu-Ala-Ile	1350,6	1350,65

Para conseguir péptidos que muestren una eficacia estimuladora del crecimiento del cabello, se realizó una exploración de las bibliotecas de péptidos del solicitante mediante experimentos de proliferación celular y se seleccionaron, de este modo, tres tipos de péptidos. Posteriormente, se observó la eficacia estimulante del crecimiento del cabello de los tres tipos de péptidos a través de los cambios de expresión de diversos genes y proteínas y se investigó la excelente eficacia de los mismos.

Ejemplo 1: Ensayo de proliferación de DPC

Se sembraron células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos a una densidad de 2×10^3 células/pocillo en

placas de 96 pocillos, seguido de la incubación durante la noche. Después de cambiar a medio sin suero, las células se trataron con los péptidos, seguido de incubación durante 3 días y a continuación los pocillos se trataron con una solución de MTT de 4 mg/ml, seguido de reacción durante 4 horas. El formazán resultante se solubilizó con DNSO y a continuación se midió la absorbancia a 550 nm usando un lector de microplacas. Los resultados se muestran en las figuras 1a a 1c.

Como se puede confirmar a partir de las figuras 1a a 1c, el crecimiento de las células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos se estimuló de una manera dependiente de la dosis mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respectivamente.

Ejemplo 2: Prueba de activación de β -catenina

Se sembraron células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos a una densidad de 4×10^3 células/pocillo en placas de 6 pocillos, seguido de la incubación durante la noche. Después de cambiar a medio sin suero, las células se trataron con los péptidos, seguido de incubación durante 15 y 30 minutos, y a continuación se recogieron los pocillos para aislar proteínas nucleares y citoplasmáticas. La transferencia Western se llevó a cabo utilizando β -catenina (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos.) para comparar los patrones de expresión de β -catenina en los núcleos. Los resultados se muestran en las figuras 2a a 2c.

Como se puede confirmar a partir de las figuras 2a a 2c, se observó que la translocación nuclear debido al aumento de la actividad de la β -catenina, que es un factor relacionado con el crecimiento del cabello, se estimuló mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Ejemplo 3: RT-PCR de KGF bFGF, VEGF

Se sembraron células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos a una densidad de 4×10^3 células/pocillo en placas de 6 pocillos, seguido de la incubación durante la noche. Después de cambiar a medio sin suero, las células se trataron con los péptidos, seguido de incubación durante 24 hora, y a continuación se recogieron los pocillos para aislar el ARN. Después de la cuantificación de ARN, se realizó la síntesis de ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc (Intron, Corea), seguido de PCR usando una premezcla de PCR (Intron, Corea) y el los correspondientes cebadores de KGF, bFGF y VEGF, y a continuación se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa al 5 % para comparar los niveles de expresión de ARNm de los factores de crecimiento para cada condición de tratamiento de la muestra. Los resultados se muestran en las figuras 3a a 3c.

[Tabla 2]

SEQ ID NO	Nomenclatura del cebador	Secuencia (5'-3')
4	KGF_F	TCTGTGGAACACAGTGGTACCT
5	KGF_R	GTGTGTCCATTAGCTGATGCAT
6	bFGF_F	TGCTGGTGATGGGAGTTGTA
7	bFGF_R	CCTCCAAGTAGCAGCCAAAG
8	VEGF_F	CCATGAACTTTCTGCTGTCTT
9	VEGF_R	TCGATCGTTCTGTATCAGTCT

Como puede confirmarse a partir de la figura 3a, la expresión del ARNm de KGF y bFGF, que son factores de crecimiento implicados en el crecimiento del cabello en las células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos, se aumentó mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Como puede confirmarse a partir de la figura 3b, la expresión del ARNm de VEGF, que es un factor que influye en el crecimiento del cabello en las células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos, se aumentó mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Como puede confirmarse a partir de la figura 3c, la expresión del ARNm de VEGF y bFGF aumentó mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

Ejemplo 4: TW de PI3K y p-ERK

Se sembraron células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos a una densidad de 4×10^3 células/pocillo en placas de 6 pocillos, seguido de la incubación durante la noche. Después de cambiar a medio sin suero, las células se trataron con los péptidos, seguido de incubación durante 15 y 30 minutos, y a continuación se recogieron los pocillos para preparar lisados celulares. La transferencia Western se realizó utilizando anticuerpos contra PI3K (Santa Cruz

Biotechnology, Estados Unidos.) y anticuerpo contra fosfo-ERK (Cell Signaling Technology, Estados Unidos.) para comparar patrones de expresión de proteínas. Los resultados se muestran en las figuras 4a y 4b.

Como se puede confirmar a partir de las figuras 4a y 4b, el aumento de la expresión de PI3K y el aumento de la fosforilación de ERK, que son moléculas de señalización del crecimiento del cabello en las células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos, se observaron mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.

Ejemplo 5: RT-PCR de MSX2

Se sembraron células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos a una densidad de 4×10^3 células/pocillo en placas de 6 pocillos, seguido de la incubación durante la noche. Después de cambiar a medio sin suero, las células se trataron con los péptidos, seguido de incubación durante 24 hora, y a continuación se recogieron los pocillos para aislar el ARN. Después de la cuantificación de ARN, se realizó la síntesis de ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc (Intron, Corea), seguido de PCR usando una premezcla de PCR (Intron, Corea) y cebadores de MSX2, y a continuación se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 5 % para comparar los niveles de expresión de ARNm para cada condición de tratamiento de muestras. Los resultados se muestran en las figuras 5a y 5b.

[Tabla 3]

SEQ ID NO	Nomenclatura del cebador	Secuencia (5'-3')
10	MSX2_F	AACACAAGACCAACCGGAAG
11	MSX2_R	GCAGCCATTTTCAGCTTTTC

Como se puede observar en las figuras 5a y 5b, la expresión del ARNm de MSX2, que es un factor relacionado con el crecimiento del cabello en las células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos, se estimuló mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3.

Ejemplo 6: RT-PCR de TGF- β 1

Se sembraron células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos a una densidad de 4×10^3 células/pocillo en placas de 6 pocillos, seguido de la incubación durante la noche. Después de cambiar a medio sin suero, las células se trataron con los péptidos, seguido de incubación durante 24 horas y a continuación se recogieron los pocillos para separar el ARN. Después de la cuantificación de ARN, se realizó la síntesis de ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc (Intron, Corea), seguido de PCR usando una premezcla de PCR (Intron, Corea) y cebadores de TGF- β 1 y a continuación se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 5 % para comparar los niveles de expresión de ARNm para cada condición de tratamiento de muestras. Los resultados se muestran en las figuras 6a y 6b.

[Tabla 4]

SEQ ID NO	Nomenclatura del cebador	Secuencia (5'-3')
12	TGF- β 1_F	GCCCTGGATACCAACTATTGC
13	TGF- β 1_R	TCAGCACTTGCAGGAGTAGCG

Como se puede observar en las figuras 6a y 6b, la expresión del ARNm de TGF- β 1, que es un factor relacionado con el retraso del crecimiento del cabello en las células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos, se inhibió mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 7: TW de Bcl-2/Bax

Se sembraron células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos a una densidad de 4×10^3 células/pocillo en placas de 6 pocillos, seguido de la incubación durante la noche. Después de cambiar a medio sin suero, las células se trataron con los péptidos, seguido de incubación durante 24 horas y a continuación se recogieron los pocillos para preparar lisados celulares. La transferencia Western se llevó a cabo utilizando anticuerpos contra Bcl-2 y Bax (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos.) para comparar los patrones de expresión de proteínas. Los resultados se muestran en las figuras 7a y 7b.

Como se puede confirmar a partir de las figuras 7a y 7b, el aumento de la expresión de la proteína Bcl-2 inhibidora de la apoptosis y la disminución de la expresión de la proteína Bax relacionada con la apoptosis en células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos se observaron mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.

Ejemplo 8: RT-PCR de queratina-14

Se sembraron células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos, seguido de la incubación durante la noche. Después de cambiar a medio sin suero, las células se trataron con los péptidos, seguido de incubación durante 24 hora, y a continuación se recogieron los pocillos para aislar el ARN. Después de la cuantificación de ARN, se realizó la síntesis de ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc (Intron, Corea), seguido de PCR usando una premezcla de PCR (Intron, Corea) y cebadores de queratina y a continuación se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 5 % para comparar los niveles de expresión de ARNm para las condiciones de tratamiento de muestras correspondientes. Los resultados se muestran en la figura 8.

[Tabla 5]

SEQ ID NO	Nomenclatura del cebador	Secuencia (5'-3')
14	Queratina-14_F	CCACCTTTCATCTTCCCAATTCTC
15	Queratina-14_R	GTGCGGATCTGGCGGTTG

Como puede confirmarse a partir de la figura 8, la expresión del ARNm de queratina-14, que es un factor relacionado con el crecimiento del cabello en las células humanas de papilas dérmicas de folículos pilosos, se aumentó mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Aplicabilidad industrial

La presente invención se refiere a un péptido que tiene una actividad para estimular la producción y/o el crecimiento del cabello, una composición que contiene el péptido como principio activo para estimular la producción de cabello y un uso del péptido para estimular la producción de cabello.

<110> CAREGEN CO., LTD.

<120> Péptidos que tienen actividad de crecimiento del cabello y usos de los mismos

<130> PP170015

<160> 15

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 1

<400> 1

Arg Arg Lys Ile
1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 2

<400> 2

Ile Tyr Phe Tyr
1

5 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido 3

10 <400> 3

Lys Lys Phe Ile Gln Gln Val Tyr Leu Ala Ile
1 5 10

15 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Cebador directo de KGF

20 <400> 4
tctgtcgaac acagtggtag ct 22

25

- <210> 5
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Cebador inverso de KGF

<400> 5
gtgtgtccat ttagctgatg cat 23

30 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Cebador directo de bFGF

35 <400> 6
tgctggtgat gggagttgta 20

40

- <210> 7
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Cebador inverso de bFGF

<400> 7
cctccaagta gcagccaaag 20

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Cebador directo de VEGF

<400> 8
ccatgaactt tctgctgtct t 21

55 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Cebador inverso de VEGF

60 <400> 9
tcgatcgttc tgtatcagtc t 21

<210> 10
<211> 20
<212> DNA

<213> Cebador directo de MSX2
 <400> 10
 aacacaagac caaccggaag 20
 5
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Cebador inverso de MSX2
 10
 <400> 11
 gcagccattt tcagctttc 20
 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Cebador directo de TGF-betal
 15
 <400> 12
 gccctggata ccaactattg c 21
 20
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Cebador inverso de TGF-betal
 25
 <400> 13
 tcagcacttg caggagtagc g 21
 30
 <210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Cebador directo de queratina-14
 35
 <400> 14
 ccaccttca tctccaat tctc 24
 <210> 15
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Cebador inverso de queratina-14
 40
 <400> 15
 gtgcggatct ggcggttg 18
 45

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que tiene una actividad para estimular la producción de cabello, consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3.
2. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido estimula el crecimiento de las células de los folículos pilosos.
3. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido aumenta la expresión de β -catenina.
4. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido aumenta la expresión de un factor de crecimiento relacionado con la producción de cabello seleccionado del grupo que consiste en factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
5. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido aumenta la expresión de un factor relacionado con la producción de cabello seleccionado del grupo que consiste en caja homeostática de Msh 2 (MSX2) y queratina-14.
6. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido aumenta la expresión de fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K) y la fosforilación de cinasa regulada por señales extracelulares (ERK).
7. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido inhibe la expresión del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1).
8. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido aumenta la expresión del linfoma 2 de linfocitos B (Bcl-2) y disminuye la expresión de la proteína X asociada a BCL2 (Bax).
9. Un método no terapéutico para prevenir o mejorar la caída del cabello, que comprende administrar un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3.
10. Un método no terapéutico para estimular la producción de cabello o el crecimiento del cabello, que comprende administrar un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3.
11. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 3 para su uso en la prevención o mejora de una afección de caída del cabello.

Fig. 1a

Célula: HHFDPC
 Concentración de péptido: 0,5, 5, 50 uM
 Control positivo: IGF-1 65 nM
 Tratamiento: 3 días
 Ensayo: Ensayo MTT

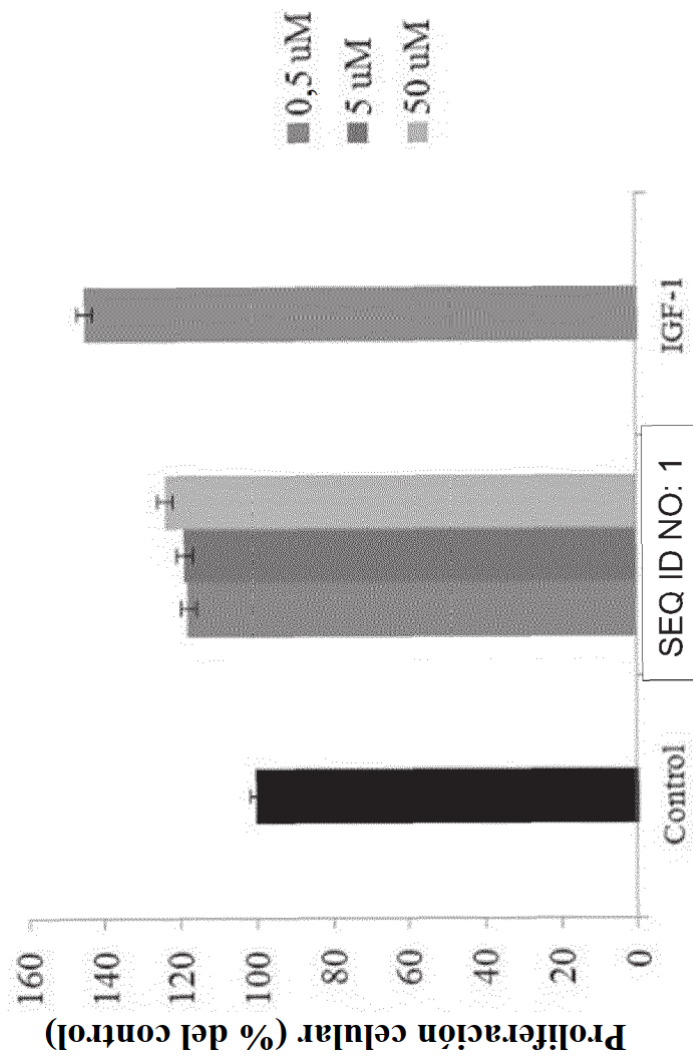


Fig. 1b

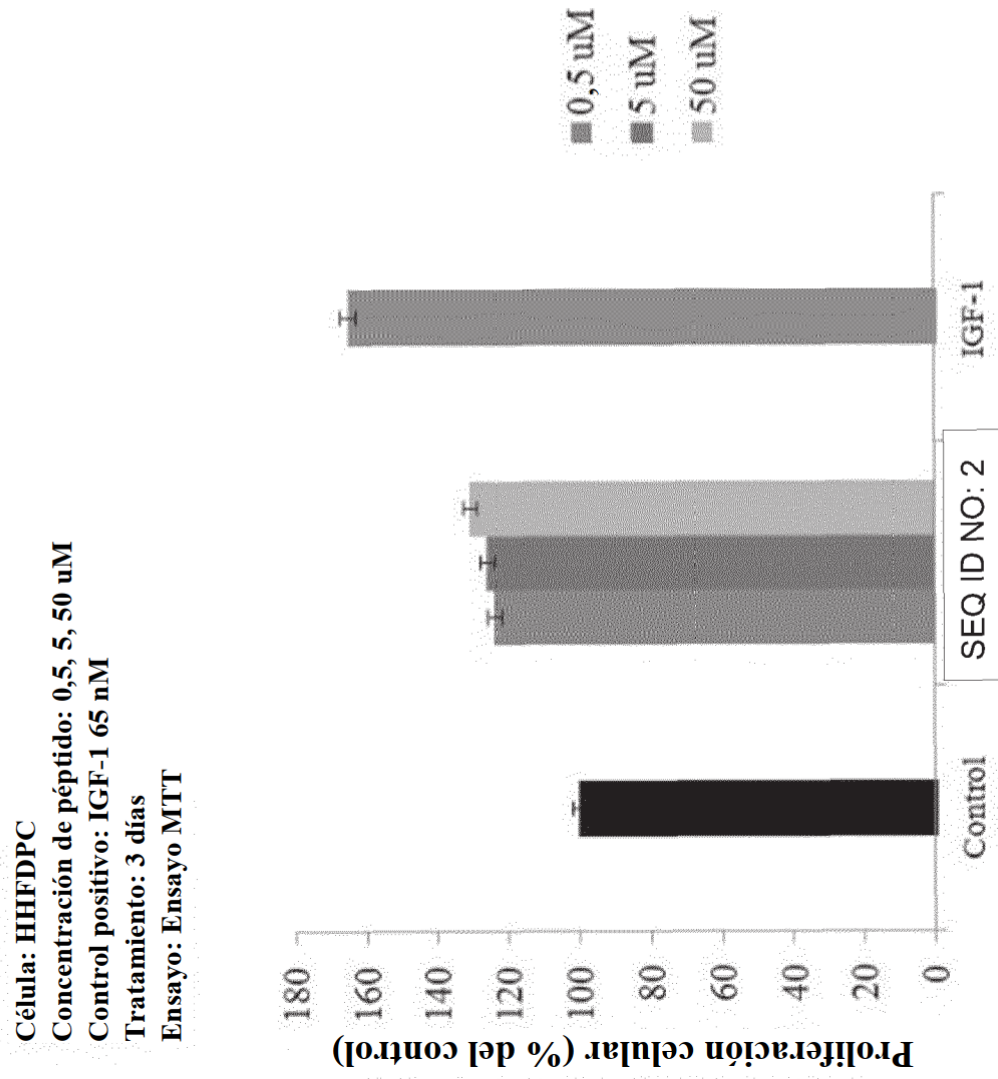


Fig. 1c

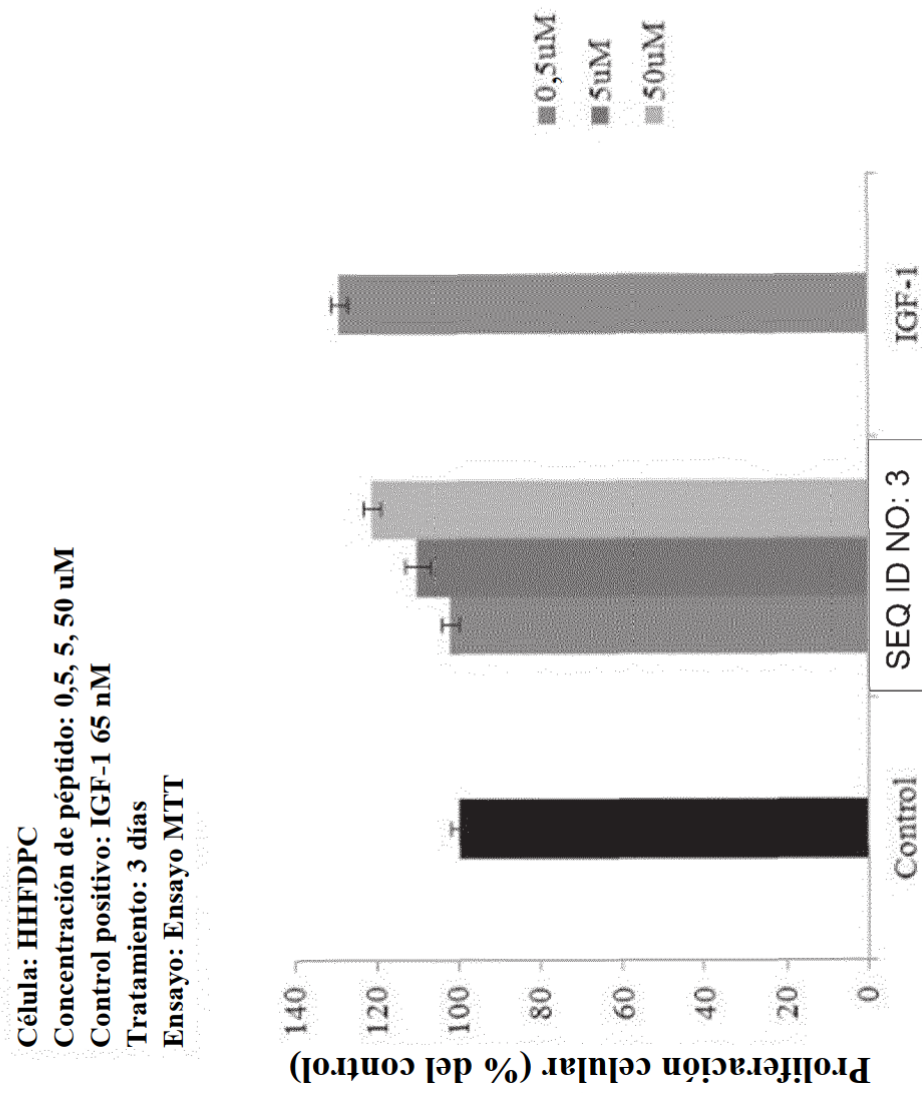


Fig. 2a

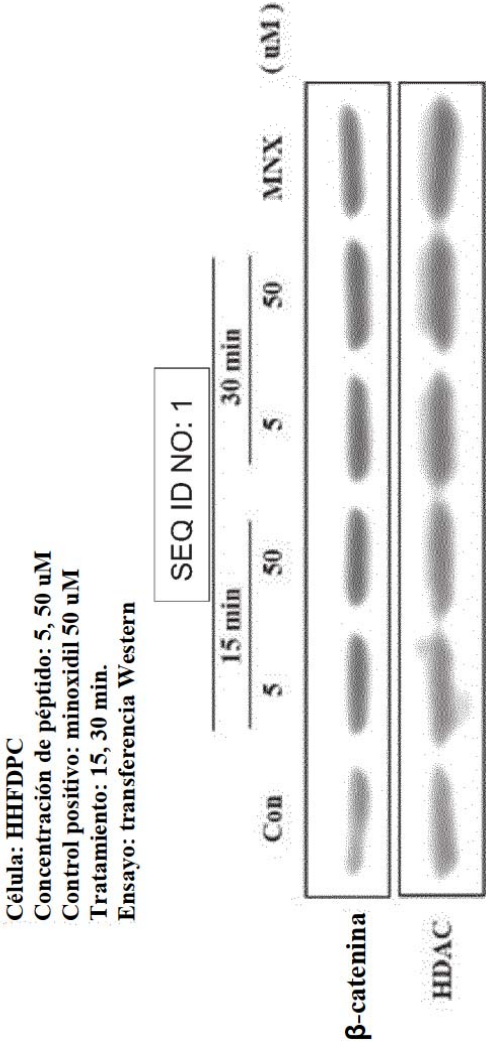


Fig. 2b

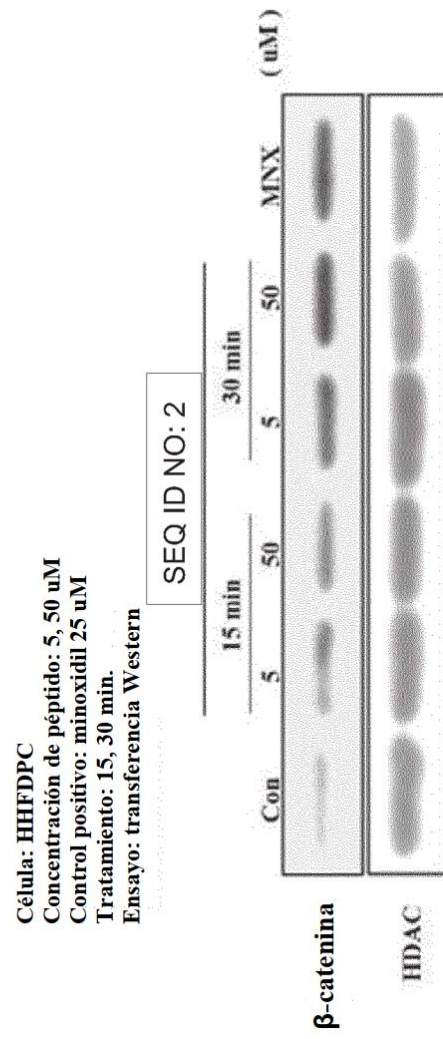


Fig. 2c

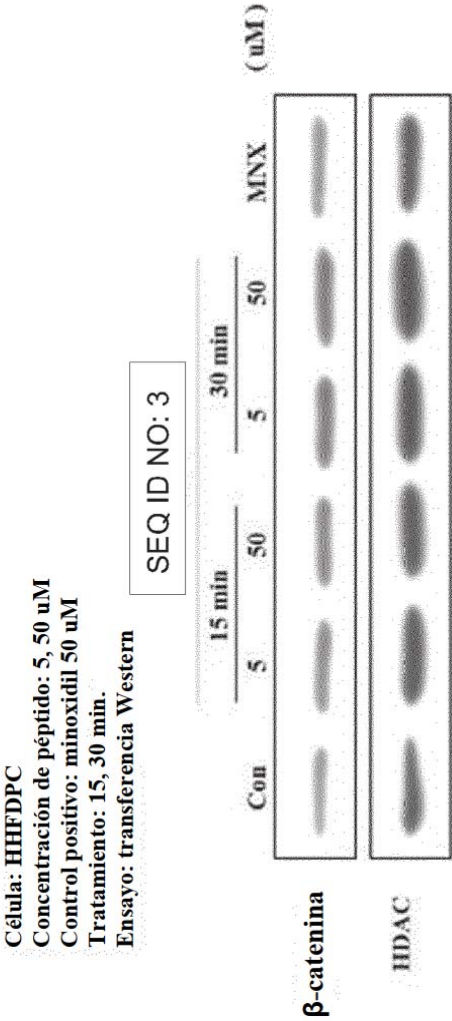


Fig. 3a

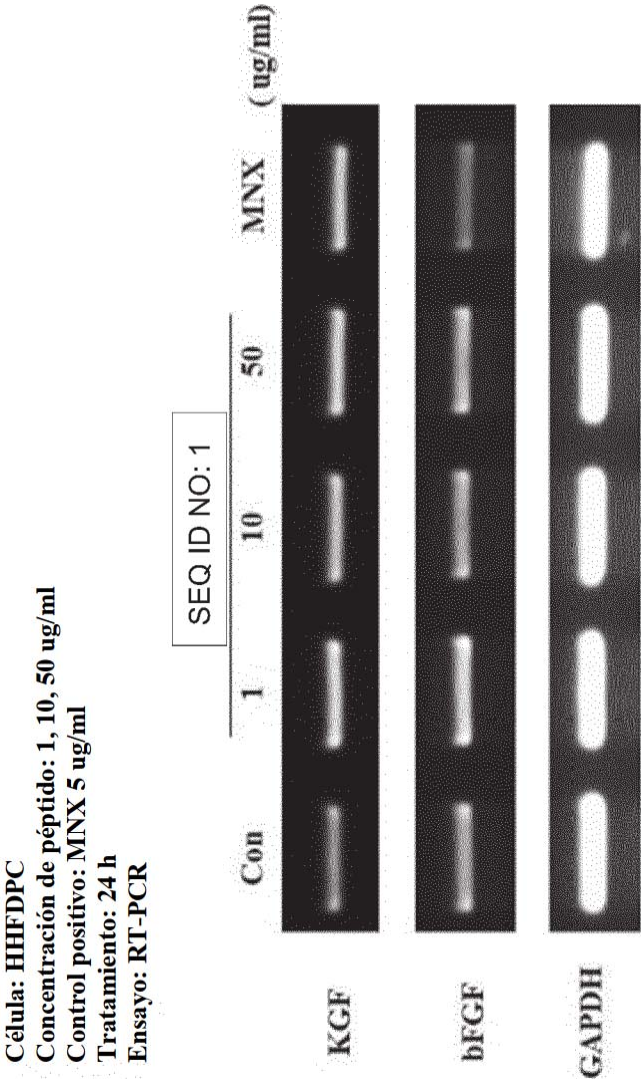


Fig. 3b

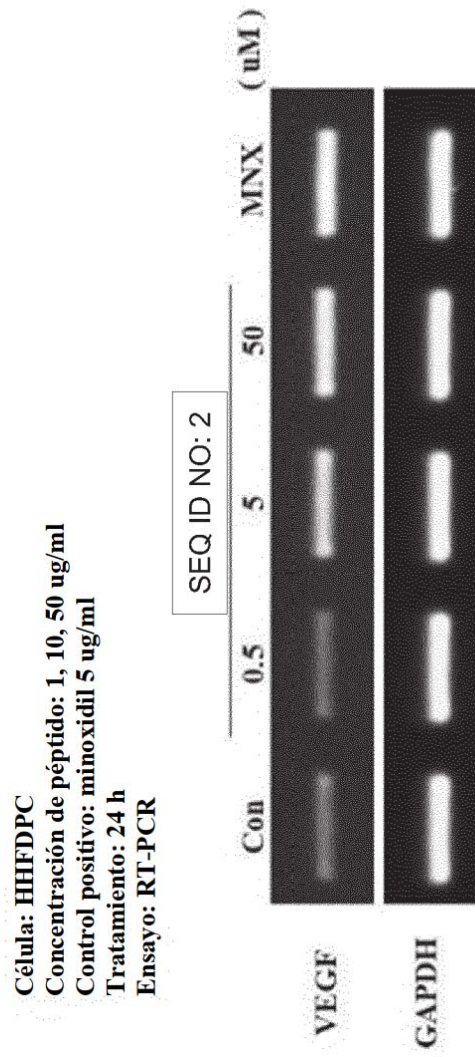


Fig. 3c

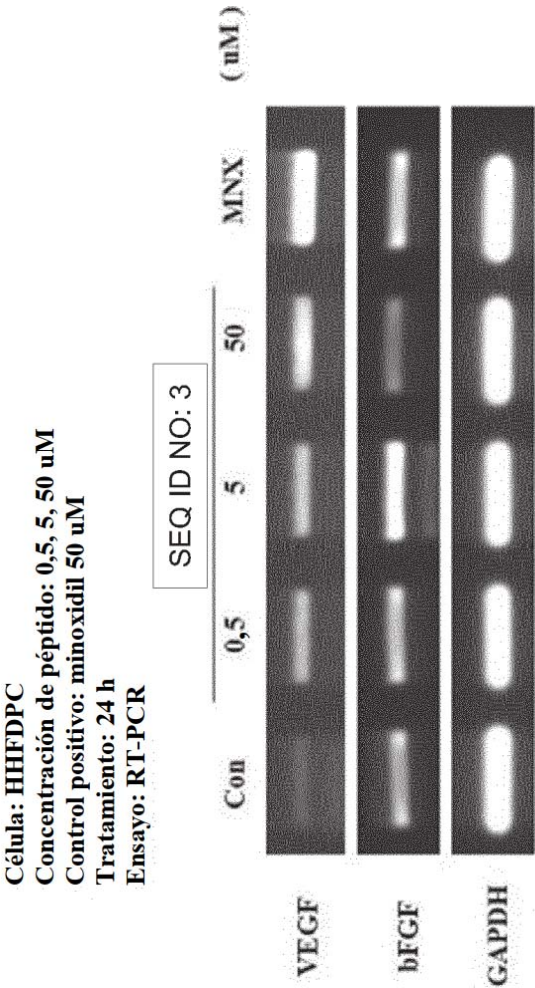


Fig. 4a

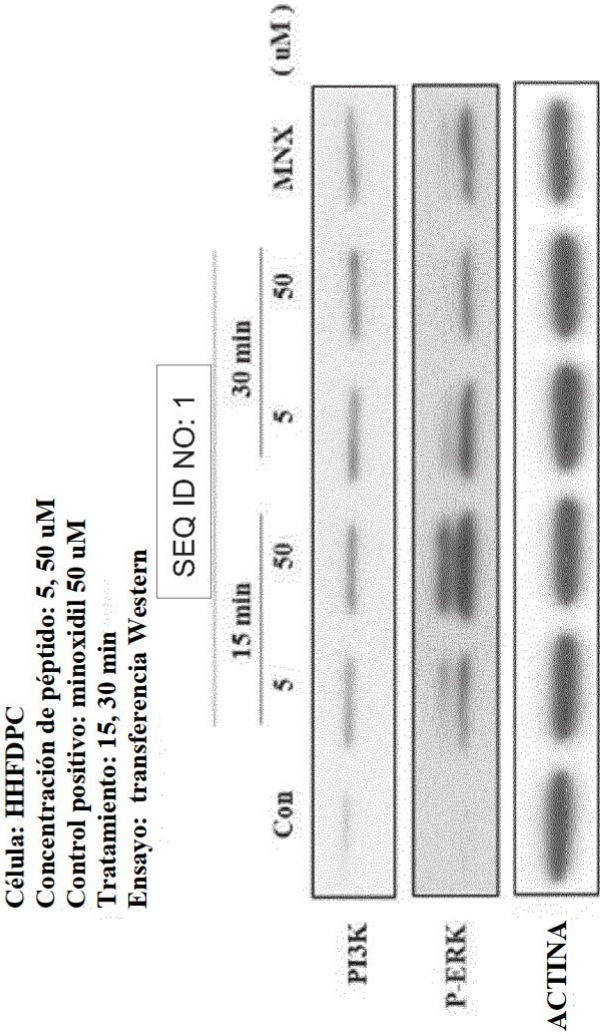


Fig. 4b

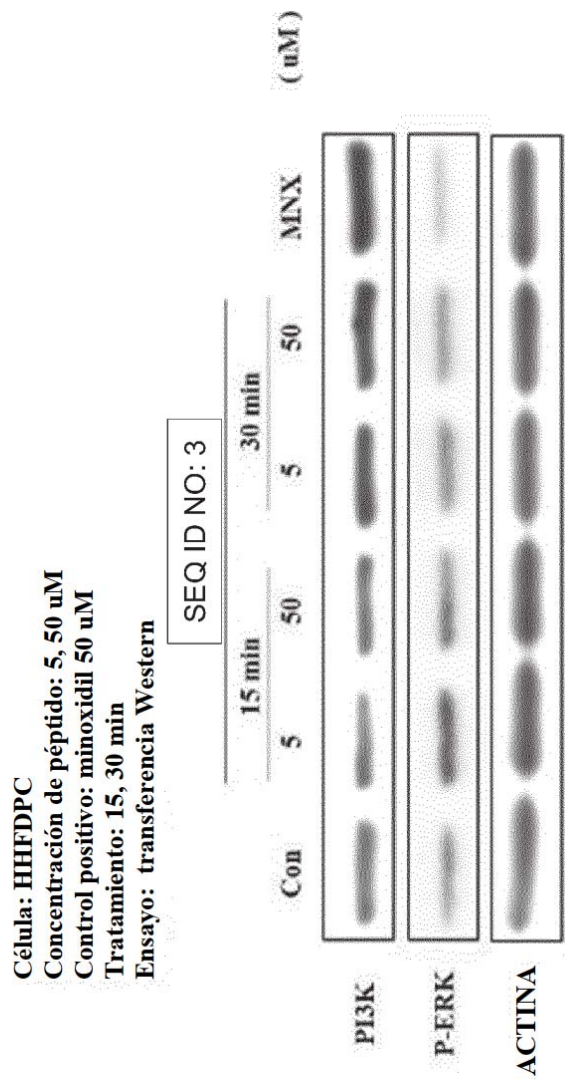


Fig. 5a

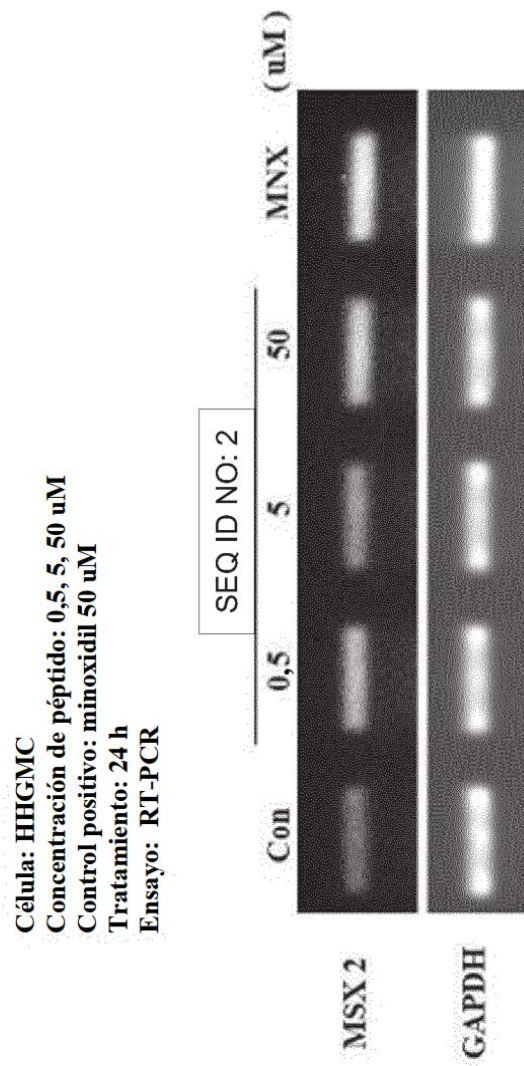


Fig. 5b

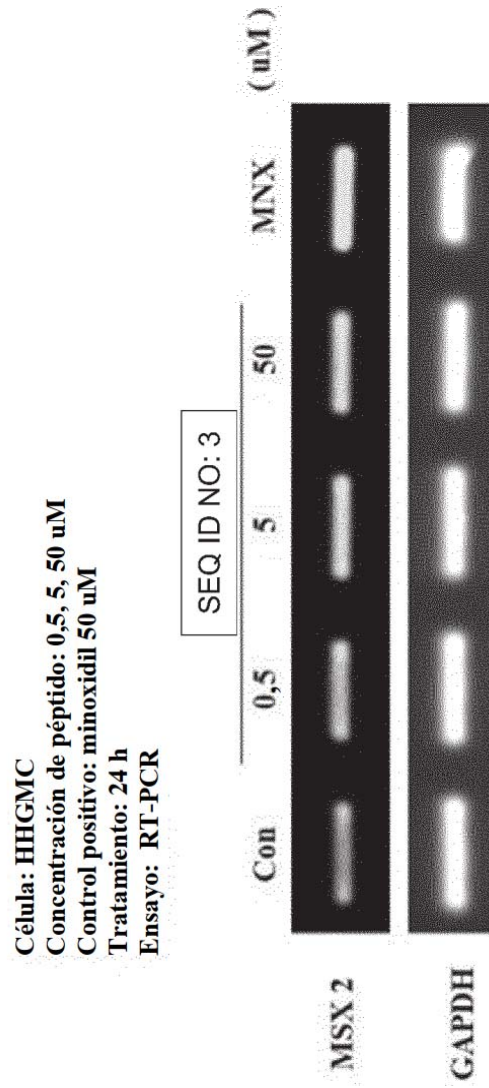


Fig. 6a

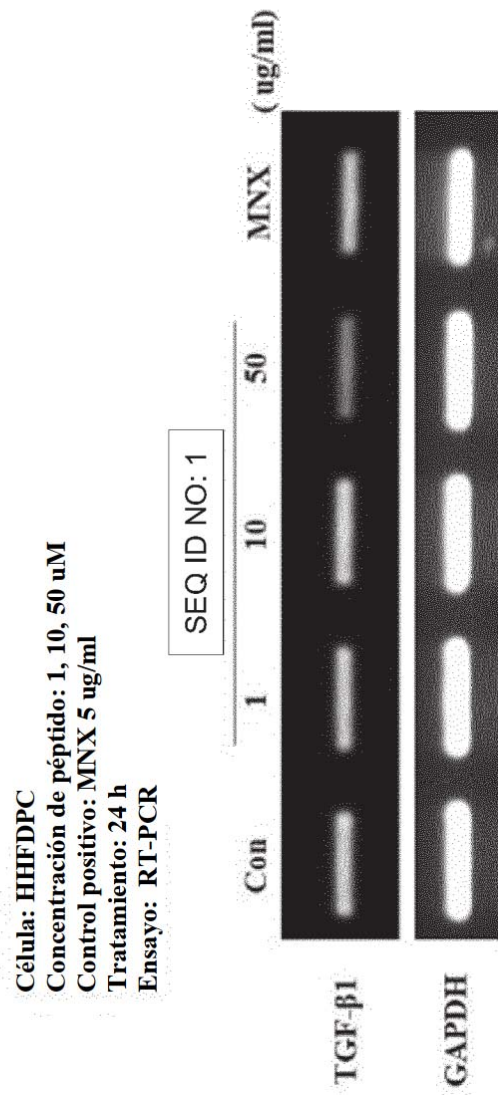


Fig. 6b

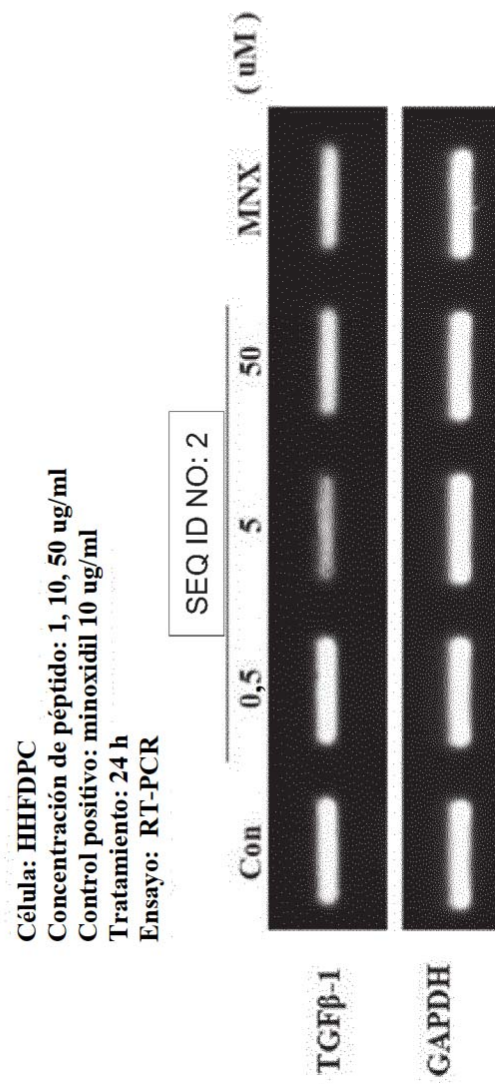


Fig. 7a

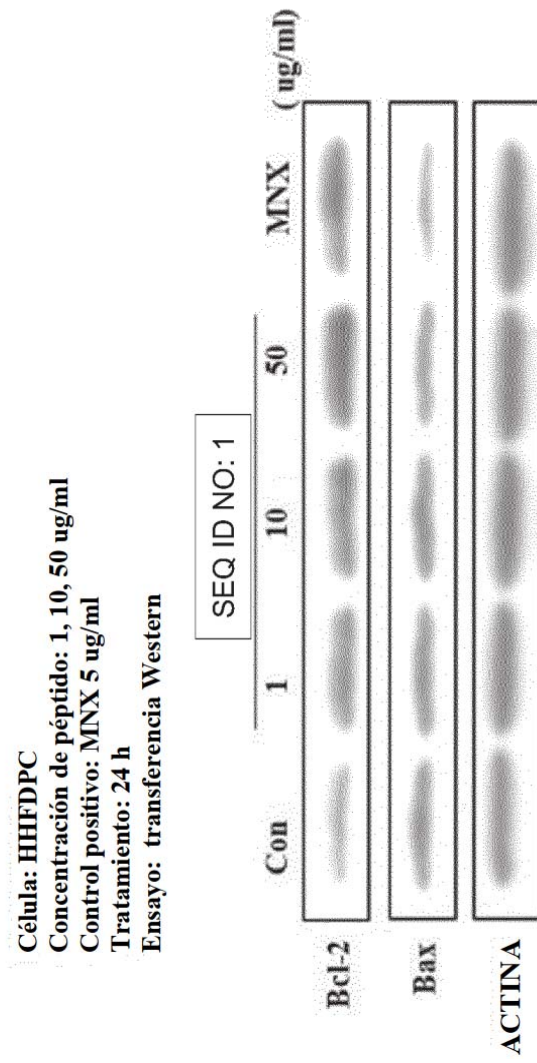


Fig. 7b

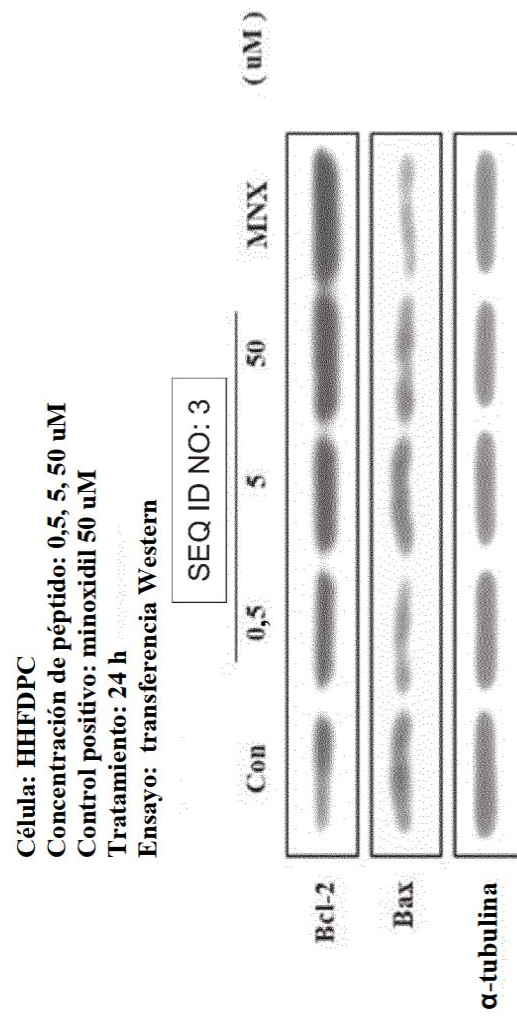


Fig. 8

