

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 886 965**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| C07K 7/06 | (2006.01) |
| C07K 7/08 | (2006.01) |
| A61K 38/08 | (2009.01) |
| A61K 38/10 | (2006.01) |
| A61Q 7/00 | (2006.01) |
| A61Q 19/00 | (2006.01) |
| A61P 17/14 | (2006.01) |
| A61P 17/00 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2017 PCT/KR2017/002047**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.09.2017 WO17155232**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2017 E 17763494 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.07.2021 EP 3428177**

54 Título: **Péptidos que presentan una actividad promotora del crecimiento del cabello y/o una actividad promotora de la producción de melanina y su uso**

30 Prioridad:

09.03.2016 KR 20160028412

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2021

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 y
LEE, EUNG JI**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 886 965 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

Péptidos que presentan una actividad promotora del crecimiento del cabello y/o una actividad promotora de la producción de melanina y su uso

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un péptido que tiene una actividad para estimular la producción de cabello y/o la melanogénesis, una composición que contiene el péptido como ingrediente activo para prevenir y/o mejorar la pérdida de cabello, una composición que contiene el péptido como ingrediente activo para estimular la producción de cabello y/o el crecimiento del cabello, un uso del péptido para prevenir y/o mejorar la pérdida de cabello, un uso del péptido para estimular la producción y/o el crecimiento del cabello, una composición farmacéutica que contiene el péptido
10 como ingrediente activo para prevenir y/o tratar la hipomelanosis, una composición cosmética que contiene el péptido como ingrediente activo para prevenir y/o mejorar la hipomelanosis, y un uso del péptido para prevenir, mejorar y/o tratar la hipomelanosis.

Técnica antecedente

15 El folículo piloso, que nace de una parte inferior de la epidermis primitiva y se extiende a una capa cutánea más profunda, es un órgano característico encontrado en la piel de los mamíferos. En la base del folículo piloso existe un tapón celular conocido como folículo o célula de la papila dérmica (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 agregadoras de
20 filamentos fuertemente adheridas a ellos.

Los cabellos humanos se caen y vuelven a producirse repitiendo cíclicamente las fases anágena, catágena y telógena. El ciclo de crecimiento del cabello está determinado por la regulación de las hormonas u otros factores de crecimiento. El estrés severo o la malnutrición pueden adelantar las fases catágena y telógena, provocando una pérdida de cabello severa (*American Journal of Pathology*, 162(3)(2003), (Arck, Petra Clara; Handjiski, Bori)).

25 En los casos de calvicie de patrón masculino, los folículos pilosos de la parte delantera y superior del cuero cabelludo son sensibles a los andrógenos. Así pues, la calvicie de patrón masculino corresponde a la minimización de los folículos pilosos y no a la destrucción de folículos pilosos, y está 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, convirtiendo la testosterona en dihidrotestosterona (DHT). La dihidrotestosterona resultante acorta el ciclo de crecimiento del cabello y miniaturiza los folículos pilosos, disminuyendo el número de cabellos adultos gruesos y fuertes, lo que provoca la caída del cabello.

30 En general, la pérdida de cabello aumenta con el envejecimiento. Por ejemplo, diferentes trastornos, tales como la alopecia cicatricial o las afecciones cicatriciales asociadas a quemaduras o lesiones por compresión, pueden provocar una pérdida de cabello severa. Se han utilizado varias sustancias como medicamentos para tratar este fenómeno de pérdida de cabello, pero los medicamentos son caros o causan varios efectos adversos.

35 Además, estos medicamentos tienen inconvenientes en el sentido de que se requiere el uso sostenido de los mismos; la pérdida de cabello vuelve a producirse cuando se interrumpe su uso; hay diferencias individuales en la eficacia; y los efectos secundarios varían de una persona a otra.

40 Además, las materias primas utilizadas como cosméticos tienen la ventaja de ser poco costosas, pero su eficacia no es grande ya que contienen ingredientes derivados de extractos de plantas. Por lo tanto, hay una necesidad creciente en la técnica de los nuevos ingredientes eficaces que son más económicos en términos de costes.

45 Los dos fármacos disponibles conocidos hasta ahora (minoxidil y finasteride) podrían retrasar la pérdida adicional de cabello, pero no inducen la regeneración de nuevos folículos pilosos. Entre los cosméticos capilares, también se han lanzado muchos productos anticaída que utilizan extractos de plantas y similares. Por ejemplo, los productos que utilizan extractos de plantas y similares que se han desarrollado incluyen: productos que contienen extractos de raíz de sophora, pimienta de chile, swertia, corteza de morus, hojas de morus, ginseng, regaliz, peonía, dedalera, hinojo, fruto de cornus, ajo y similares; productos en los que se añade una composición que contiene xantinas y hormonas de crecimiento para mejorar el metabolismo celular suprimido por el exceso de dihidrotestosterona y estimular el crecimiento del cabello inducido por las hormonas de crecimiento, evitando así la caída del cabello y alcanzando la
50 producción de cabello, lo que conduce a un efecto estimulante del crecimiento del cabello; productos estimulantes de la producción capilar que suministran 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, con el fin de estimular la producción capilar y el crecimiento del cabello, y que tienen efectos en la prevención de la caída del cabello y en la estimulación del crecimiento del cabello; y productos para la calvicie de patrón masculino en los que las sustancias, tales como la vitamina B, la vitamina C, la vitamina D, la vitamina E, el ácido nicotínico, el ácido pantoténico, la biotina y el ácido fólico, se mezclan con extractos de plantas para inhibir la 5- α reductasa, evitando así la producción de
55

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 nuevos cabellos son difíciles de encontrar.

5 Las células de la piel producen melanina en los melanosomas de los melanocitos que están presentes en la capa epidérmica basal, como mecanismo de defensa ante 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 los animales. La hipomelanosis también es conocida como un factor de riesgo de cáncer de piel.

10 Los asiáticos son sensibles a la sobreproducción de melanina, por lo que se han realizado muchos estudios relacionados con el blanqueamiento para la inhibición de la melanogénesis. En los últimos años, también está aumentando la demanda contra el vitíligo, que es causado por la inhibición de la melanogénesis, por lo que se están realizando estudios al respecto.

15 El vitíligo es una enfermedad decolorante adquirida en la que aparecen manchas lechosas de varios tamaños y formas debido a la apoptosis o necrosis de los melanocitos. El vitíligo es una enfermedad relativamente común que se da en alrededor del 1% de la población en todo el mundo, y no hay diferencias en la enfermedad por raza o zona. En cuanto a las edades de aparición, el vitíligo se presenta con mayor frecuencia entre los 10 y los 30 años, con un 95% antes de los 40 años, y el 30% de los pacientes tienen antecedentes familiares.

20 Las causas del vitíligo aún no se han revelado con exactitud, pero existen diversas teorías, tales como la hipótesis autoinmune, la hipótesis neural y la hipótesis de la autodestrucción de los melanocitos. La hipótesis autoinmune es que la destrucción o disfunción de los melanocitos está causada por la expresión de autoanticuerpos contra antígenos basados en los melanocitos, o que los melanocitos son destruidos por linfocinas secretadas por linfocitos citotóxicos o linfocitos activados. La hipótesis neural es que el peróxido de hidrógeno asociado al estrés se genera debido a una biosíntesis anormal de catecolaminas y a un aumento de la monoamino oxidasa, lo que provoca la destrucción de los melanocitos, y el vitíligo puede producirse a lo largo del ganglio o el vitíligo puede producirse después de un daño nervioso o del estrés. La hipótesis de la autodestrucción de los melanocitos es que los metabolitos intermedios o los complejos fenólicos como metabolito final del proceso melanogénico se acumulan en los melanocitos, lo que provoca la destrucción de la célula. Además, se sugieren diversos factores, tales como defectos celulares inherentes, factores genéticos, apoptosis, trastornos metabólicos del calcio.

30 La melanina se sintetiza a partir de los melanocitos y desempeña un papel importante en la protección de la piel mediante la irradiación de la luz UV o la absorción de sustancias tóxicas y químicas. Por lo tanto, las personas que no tienen una síntesis normal de melanina tienen un problema de apariencia, ya que la piel se vuelve blanca en parte y no en su totalidad, provocando manchas, y tienen un grave problema de sensibilidad a los estímulos externos. La tirosinasa, la proteína relacionada con la tirosinasa-1 (TRP-1) y la proteína relacionada con la tirosinasa-2 (TRP-2), que son enzimas importantes en la síntesis de la melanina, actúan como catalizadores de las reacciones oxidativas (Pigment Cell Res. 14 (6): 43744).

35 En el presente documento, la tirosinasa actúa para oxidar la tirosina en L-3,4-dihidroxiifenilalanina (DOPA) y la DOPA en DOPA quinina, y la TRP-1 es una oxidasa del ácido dihidroxiindol carboxílico y participa en la conversión del ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA) en ácido indol-5,6-quinona-2-carboxílico.

40 El TRP-1 también sirve para estabilizar la tirosinasa y regular su actividad. La TRP-2, que es la tautomerasa del cromo DOPA, convierte el cromo DOPA en DHICA para formar el eumelanon y el feomelanon, constituyendo los melanocitos, y la relación de los mismos determina los colores de la piel, el cabello, los ojos y similares.

La síntesis de melanina es activada por la irradiación UV y la hormona estimulante de α -melanocitos (MSH). En este caso, se sabe que la α -MSH, que es una hormona peptídica, es producida por la luz ultravioleta y elaborada por varias células, incluidas las de la glándula pituitaria y la piel.

45 En el presente documento, la α -MSH actúa sobre los receptores de melanocortina (MCR) de los melanocitos por vía paracrina para regular la actividad del factor de transcripción asociado a la microftalmia (MITF), regulando así la actividad de la tirosinasa, de la DHICA oxidasa (TRP-1), de la DOPA-crometautomerasa (TRP-2), y similares, que desempeñan papeles importantes en la síntesis de melanina (THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 273, No. 31, edición del 31 de julio, pp. 195609565, 1998).

50 Se ha informado que la estimulación de los melanocitos por UV o α -MSH conduce a la activación de la tirosinasa por p38 o proteína quinasa A (PKA), respectivamente. En estas dos vías, especialmente, la vía α -MSH \rightarrow AMPc \rightarrow PKA desempeña un papel importante en la síntesis de melanina. El aumento del AMPc estimula la fosforilación de la proteína de unión al elemento sensible al AMPc (CREB), aumentando la expresión del factor de transcripción MITF, que potencia la actividad de la tirosinasa y aumenta la expresión del ARNm de la misma (Nucleic Acids Res. 30 (14): 3096106, Pigment Cell Melanoma Res 21 (6): 66576).

55 Los asiáticos, incluidos los coreanos, quieren tener un color de piel claro, y por ello 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 por la irradiación de los rayos UV o la absorción de sustancias tóxicas y químicas. Dado que la ausencia de la síntesis normal de melanina hace que

la piel sea sensible a la estimulación externa y muestre un aspecto externo anormal, es necesario el tratamiento para la síntesis normal de melanina y también se han realizado estudios al respecto. Hasta ahora, el desarrollo de técnicas para estimular la síntesis de melanina no se ha llevado a cabo suficientemente.

5 El documento WO 2015/174599 describe péptidos que pueden ser útiles para remediar o tratar la hipopigmentación por melanina, y para tratar o prevenir la obesidad.

El documento WO 2007/049905 describe un péptido que puede mejorar los trastornos o afecciones relacionados con la timosina ss-4.

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

10 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Los presentes inventores se esforzaron por desarrollar péptidos que tuvieran una actividad biológicamente eficaz, y como resultado, los presentes inventores confirmaron que un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 mostraron una excelente eficacia productora de cabello y/o actividad estimuladora de la melanogénesis y establecieron que estos péptidos pueden ser utilizados favorablemente en el procedimiento cosmético para la prevención o mejora de la pérdida de cabello y la prevención terapéutica y/o el tratamiento de la hipomelanosis, por lo que los presentes inventores completaron la presente invención.

15

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar un péptido que muestre una actividad cosmética de estimulación de la producción de cabello, consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

20 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición para prevenir y/o mejorar cosméticamente la caída del cabello, conteniendo la composición, como ingrediente activo, al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición para estimular cosméticamente la producción de cabello y/o el crecimiento del mismo, conteniendo la composición, como ingrediente activo, al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos formados por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

25

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar un péptido que muestre actividad terapéutica de estimulación de la melanogénesis, consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

30 Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la hipomelanosis, conteniendo la composición farmacéutica, como ingrediente activo, al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

Solución técnica

35 Los presentes inventores se esforzaron por desarrollar péptidos que tuvieran una actividad biológicamente eficaz, y como resultado, los presentes inventores confirmaron que un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 tiene una excelente eficacia productora de cabello y/o actividad estimuladora de la melanogénesis y establecieron que estos péptidos pueden ser utilizados favorablemente en la prevención cosmética o la mejora de la pérdida de cabello y la prevención terapéutica y/o el tratamiento de la hipomelanosis.

40 El péptido de la presente invención se obtiene mediante el cribado de péptidos, que tienen excelentes efectos estimulantes de la melanogénesis, a partir de las bibliotecas de péptidos que poseen los presentes inventores, a través de experimentos sobre cambios de expresión de genes y proteínas o similares, y se proporciona un total de dos tipos de péptidos como péptido de la presente invención.

45 Un aspecto de la presente invención se dirige a un péptido que tiene una actividad para estimular la producción de cabello, comprendiendo el péptido una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

El péptido puede contener una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, y por ejemplo, puede ser un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

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

50 Por ejemplo, la modificación C-terminal puede ser una modificación del C-terminal del péptido en un grupo hidroxilo (-OH), un grupo amino (-NH₂), un grupo azida (-NHNH₂), o similares, pero no se limita a ello.

Además, la modificación N-terminal puede ser una 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 palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y polietilenglicol (PEG) al N-terminal del péptido, pero no se limita a ello. El grupo protector protege al péptido de la presente invención de las enzimas de escisión de proteínas *in vivo*.

- 5 La modificación N-terminal y/o C-terminal del péptido mejora la estabilidad del péptido, y esta modificación permite que el péptido de la presente invención tenga una mayor semivida en el momento de la administración *in vivo*, teniendo así una alta semivida.

10 El péptido de la presente invención estimula el crecimiento de las células del folículo piloso, aumenta la expresión de β -catenina como factor relacionado con el crecimiento del cabello, aumenta la expresión de KGF, bFGF y VEGF como factores de crecimiento relacionados con el crecimiento del cabello, aumenta la expresión de PI3K como molécula de señalización del crecimiento del cabello, aumenta la fosforilación de ERK, aumenta la expresión de MSX2 y queratina-14 como factores relacionados con el crecimiento del cabello, disminuye la expresión de TGF- β 1 asociada al retraso del crecimiento del cabello, e induce un aumento de la expresión de Bcl-2 como proteína inhibidora de la apoptosis y una disminución de la expresión de Bax como proteína relacionada con la apoptosis.

- 15 Estos resultados indican que el péptido de la presente invención tiene un excelente efecto en la producción de cabello. Por lo tanto, el péptido de la presente invención puede utilizarse en un procedimiento cosmético para la prevención y/o mejora de la caída del cabello y la estimulación de la producción de cabello y/o el crecimiento de cabello

20 Otro aspecto de la presente invención se dirige a una composición para prevenir y/o mejorar cosméticamente la pérdida de cabello, conteniendo la composición, como ingrediente activo, al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

25 El péptido de la presente invención induce la proliferación de las células presentes en los folículos pilosos del tejido de la piel para producir raíces de cabello, lo que lleva a la producción de nuevos folículos pilosos. Además, el péptido de la presente invención activa las señales de β -catenina para expresar los genes que estimulan la producción de cabello y aumentar la expresión de los factores de crecimiento. El péptido de la presente invención promueve la fase anágena durante la cual se produce y crece el cabello, muestra un efecto inhibidor de la caída del cabello al mantener el ciclo del cabello, que pasa a la fase catágena debido a varios factores ambientales, en la fase anágena, y mantiene el cabello sano al proporcionar nutrientes al cabello normal. Por lo tanto, la composición de la presente invención es muy eficaz en la prevención cosmética y/o la mejora de la pérdida de cabello.

30 Dado que la composición de la presente invención contiene el péptido anterior de la presente invención como ingrediente activo, se omitirán las descripciones de los contenidos superpuestos entre sí para evitar una complejidad excesiva de la presente especificación. Todavía otro aspecto de la presente invención está dirigido al uso de una composición en un procedimiento cosmético para estimular la producción de cabello y/o el crecimiento del cabello, conteniendo la composición, como ingrediente activo, al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

- 35 La composición de la presente invención puede prepararse en una composición cosmética, pero no está limitada a ello.

La composición cosmética de la presente invención puede contener una cantidad cosméticamente eficaz del péptido de la presente invención.

40 Además, la composición cosmética puede contener además un portador cosméticamente aceptable, pero no se limita a ello.

45 La composición cosmética de la presente invención 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 contenga tensioactivos, un aceite, una base de polvo, una base de emulsión, una base de cera y un aerosol, pero no se limitan a ellos. Por ejemplo, la composición cosmética de la presente invención puede prepararse en forma de loción emoliente, loción nutritiva, crema nutritiva, crema de masaje, esencia, crema para los ojos, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, envase, aerosol y/o polvo.

50 En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética es una pasta, una crema o un gel, ejemplos útiles del ingrediente portador pueden incluir un aceite animal, un aceite vegetal, cera, parafina, almidón, tragacanto, un derivado de la celulosa, polietilenglicol, silicona, bentonita, sílice, talco u óxido de zinc, pero no se limita a ellos.

En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética es un polvo o un aerosol, se puede utilizar lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio o un polvo de poliamida como ingrediente portador, pero no está limitado a ello.

En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética es un aerosol, el aerosol puede contener además un propulsor, como el clorofluorohidrocarburo, el propano/butano y/o el éter dimetílico, pero no está limitado a ello.

5 En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética es una solución o emulsión, se puede utilizar un disolvente, un solubilizante o un emulsionante como componente portador, y algunos ejemplos de ello son 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 o los ésteres de ácidos grasos de sorbitán, pero sin limitarse a ellos.

10 En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética es una suspensión, ejemplos útiles del ingrediente portador pueden incluir un diluyente líquido (tal como agua, etanol o propilenglicol), un agente de suspensión (tal como alcohol isostearílico etoxilado, éster de sorbitol polioxilado o éster de sorbitán polioxilado), celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar o tragacanto, pero no se limitan a ellos.

15 En los casos en que la forma de dosificación de la composición cosmética es un limpiador que contiene tensioactivos, ejemplos útiles del ingrediente portador pueden ser el sulfato de alcohol alifático, el éter sulfato de alcohol alifático, el monoéster de sulfosuccinato, el isetionato, los derivados de imidazolio, taurato de metilo, sarcosinato, éter sulfato de amida de ácido graso, alquil amido betaína, alcohol alifático, glicérido de ácido graso, dietanolamida de ácido graso, aceite vegetal, derivados de lanolina o éster de ácido graso etoxilado de glicerol, pero no se limitan a ellos.

20 Los ingredientes contenidos en la composición cosmética de la presente invención pueden incluir, además del péptido y los ingredientes portadores como ingredientes activos, ingredientes que se utilizan habitualmente en las composiciones cosméticas, por ejemplo, suplementos ordinarios, como un antioxidante, un purificador, un solubilizante, vitaminas, un pigmento y/o un agente saborizante, pero no se limitan a ellos.

Todavía otro aspecto de la presente invención se dirige a un uso de un péptido en un procedimiento cosmético para prevenir y/o mejorar la pérdida de cabello, consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

25 Dado que el péptido es el mismo que el anterior, se omitirán las descripciones de los contenidos superpuestos entre ellos para evitar una complejidad excesiva de la presente especificación.

Todavía otro aspecto de la presente invención se dirige a un uso de un péptido en un procedimiento cosmético para estimular la producción de cabello y/o el crecimiento del mismo, consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

30 Dado que el péptido es el mismo que el anterior, se omitirán las descripciones de los contenidos superpuestos entre ellos para evitar una complejidad excesiva de la presente especificación.

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar un péptido que tenga actividad terapéutica para estimular la melanogénesis, consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

35 Según 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 regular la síntesis de melanina, aumenta la expresión de MITF y TRP1, que son factores implicados en la melanogénesis.

40 Estos resultados indican que el péptido de la presente invención tiene un efecto terapéutico de mejora de la hipomelanosis mediante el aumento de la melanogénesis. Por lo tanto, el péptido de la presente invención puede ser para su uso en un procedimiento terapéutico para la prevención, mejora y/o tratamiento de la hipomelanosis.

La hipomelanosis es vitíligo, albinismo, nevo despigmentoso, pitiriasis alba, pitiriasis versicolor, despigmentación postinflamatoria, morfea, piebaldismo, hipomelanosis guttata idiopática o leucoderma punctatum, pero no se limita a ello.

45 Todavía otro aspecto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento terapéutico de prevención y/o tratamiento de la hipomelanosis, conteniendo la composición farmacéutica, como ingrediente activo, al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos formados por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

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

50 Además, la composición farmacéutica puede contener además un portador farmacéuticamente aceptable, pero no se limita a ello.

El portador farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente invención se utiliza normalmente en el momento de la formulación, y los ejemplos del mismo pueden incluir, pero no se limitan a, lactosa,

5 dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma de acacia, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, 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 saborizante, 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 vía cutánea tópica.

10 La dosis adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención varía dependiendo de factores, tales como un procedimiento de formulación, una forma de administración, la edad del paciente, el peso corporal, el sexo, la morbilidad, la alimentación, un tiempo de administración, una vía de administración, una tasa de excreción y la sensibilidad de respuesta. Los profesionales con experiencia normal pueden determinar y prescribir fácilmente la dosis que es eficaz para el tratamiento o la prevención deseada. Según 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.

15 La composición farmacéutica de la presente invención se formula utilizando un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con un procedimiento que es fácilmente realizable por una persona que tenga conocimientos normales en la técnica al 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.

20 En el presente documento, la forma de dosificación puede ser una solución en un medio oleoso acuoso, una suspensión, una emulsión, un extracto, un polvo, gránulos, una tableta, una cápsula o un gel (por ejemplo, un hidrogel), y puede contener además un agente dispersante o un estabilizador.

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.

25 Además, la composición cosmética puede contener además un portador cosméticamente aceptable, pero no se limita a ello.

30 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "péptido" se refiere a una molécula lineal formada por residuos de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. El péptido de la presente invención puede prepararse mediante procedimientos de síntesis química conocidos, especialmente, técnicas de síntesis en fase sólida (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 U.S. No. 5.516.891).

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

35 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "prevenir la caída del cabello" se refiere a bloquear o debilitar la caída del cabello de los folículos pilosos o del cuero cabelludo.

40 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "estimular la producción de cabello" se refiere a la producción de cabello, y se utiliza en un sentido amplio para aumentar la tasa de producción de cabello y la cantidad de producción de cabello. Además, el término significa que las funciones de la raíz del cabello se potencian, o que el número de cabellos que crecen en los folículos pilosos aumenta debido a que se acorta el ciclo de caída y producción del cabello.

Tal y como se utiliza en este documento, el término "crecimiento del cabello" se refiere a aumentar el grosor del cabello generado o a influir en la tasa de aumento de la longitud.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad cosméticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para alcanzar la eficacia de la composición anterior de la presente invención.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para alcanzar la eficacia o la actividad del péptido anterior.

Efectos ventajosos

50 La presente invención se dirige a un péptido que tiene una actividad para estimular la producción de cabello y/o la melanogénesis, una composición que contiene el péptido como ingrediente activo para prevenir y/o mejorar la pérdida de cabello, una composición que contiene el péptido como ingrediente activo para estimular la producción de cabello y/o el crecimiento del cabello, un uso del péptido para prevenir y/o mejorar la pérdida de cabello, un uso del péptido para estimular la producción y/o el crecimiento del cabello, una composición farmacéutica que contiene el péptido como ingrediente activo para prevenir y/o tratar la hipomelanosis, una composición cosmética que contiene el péptido como ingrediente activo para prevenir y/o mejorar la hipomelanosis, y un uso del péptido para prevenir, mejorar y/o

tratar la hipomelanosis. El péptido estimula el crecimiento de las células del folículo piloso y aumenta la expresión de los factores de crecimiento y de los factores relacionados con la producción de cabello, mostrando así un excelente efecto sobre la producción de cabello. Además, el péptido aumenta la actividad y la expresión de la tirosinasa e incrementa la expresión de los factores implicados en la melanogénesis, mostrando así un excelente efecto sobre la melanogénesis. El péptido anterior de la presente invención puede aplicarse de forma muy ventajosa a medicamentos, cuasimedicamentos y cosméticos gracias a su excelente actividad y seguridad

Breve descripción de los dibujos

- 10 La FIG. 1a es un gráfico que muestra el efecto estimulador del crecimiento de las células de la papila dérmica del folículo piloso humano (HHFDPC) de un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 según una realización de la presente invención.
- La FIG. 1b es un gráfico que muestra el efecto estimulador del crecimiento de las células de la papila dérmica del folículo piloso humano (HHFDPC) de un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 según una realización de la presente invención.
- 15 La FIG. 2a es un diagrama que muestra los resultados de la confirmación de los aumentos de la expresión de β -catenina y P-GSK3 β mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 según una realización de la presente invención.
- La FIG. 2b es un diagrama que muestra los resultados de la confirmación de los aumentos de la expresión de β -catenina y P-GSK3 β mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 según una realización de la presente invención.
- 20 La FIG. 3a es una imagen que muestra los resultados de la confirmación de un aumento de la expresión de PI3K y un aumento de la fosforilación de ERK por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 según una realización de la presente invención.
- La FIG. 3b es una imagen que muestra los resultados de la confirmación de un aumento de la expresión de PI3K y un aumento de la fosforilación de ERK por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 según una realización de la presente invención.
- 25 La FIG. 4a es una imagen que muestra los resultados de confirmar un aumento de la expresión de Bcl-2 y una disminución de la expresión de Bax mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 según una realización de la presente invención.
- La FIG. 4b es una imagen que muestra los resultados de confirmar un aumento de la expresión de Bcl-2 y una disminución de la expresión de Bax mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 según una realización de la presente invención.
- 30 La FIG. 5a es una imagen que muestra los resultados de la confirmación de un aumento de la expresión de queratina-14 mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 según una realización de la presente invención.
- 35 La FIG. 5b es una imagen que muestra los resultados de la confirmación de un aumento de la expresión de queratina-14 mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 según una realización de la presente invención.
- La FIG. 6 es una imagen que muestra los resultados de la confirmación del aumento de la expresión de VEGF y KGF por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 según una realización de la presente invención.
- 40 La FIG. 7 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 según una realización de la presente invención.
- 45 La FIG. 8 es una imagen que muestra los resultados de la confirmación de un aumento de la expresión de MSX2 mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 según una realización de la presente invención.
- La FIG. 9a es una imagen que 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 según una realización de la presente invención.
- 50

La FIG. 9b es una imagen que 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 según una realización de la presente invención.

5 La FIG. 10 es una imagen que muestra los resultados de la confirmación de los aumentos de la expresión de ARNm de MITF, tirosinasa y TRP1 mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 según una realización de la presente invención.

La FIG. 11 es una imagen que muestra los resultados de la confirmación de los aumentos de la expresión proteica de MITF y tirosinasa mediante un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 según una realización de la presente invención.

10 El mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención está dirigida a un péptido que muestra actividad estimulante de la producción de cabello, consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2.

Modo de llevar a cabo la invención

15 En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle con referencia a ejemplos. Estos ejemplos son sólo para ilustrar la presente invención de forma más específica, y será evidente para los expertos en la técnica que el ámbito de la presente invención no está limitado por estos ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo sintético 1: Síntesis de péptidos

20 Se añadieron 700 mg de resina de cloruro de clorotritilo (resina CTL, Nova Biochem Cat No. 01-64-0021) en un recipiente de reacción, y se añadieron 10 ml de cloruro de metileno (MC), seguido de agitación durante 3 minutos. Después de eliminar la solución, se añadieron 10 ml de dimetil formamida (DMF), y se agitó durante 3 minutos, y luego se eliminó de nuevo el disolvente. Se añadieron 10 ml de una solución de diclorometano a un reactor, y 200 mol de Fmoc-Cys(Trt)-OH (Bachem, Suiza) y 400 mol de diisopropil etilamina (DIEA). A continuación, la mezcla se disolvió bien con agitación, y luego la reacción se llevó a cabo con agitación durante 1 hora. Después de la reacción, se realizó un lavado, y a continuación se disolvió metanol y DIEA (2:1) en diclorometano (DCM), seguido de una reacción durante 25 10 minutos, y después se lavó el material resultante con exceso de DCM/DMF (1:1).

Una vez eliminada la solución, se añadieron 10 ml de dimetil formamida (DMF), y se agitó durante 3 minutos, y luego se eliminó de nuevo el disolvente. Se añadieron 10 ml de una solución de desprotección (20% de piperidina/DMF) a un recipiente de reacción, seguido de una agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos, y luego se eliminó la solución. Se añadió una cantidad igual de una solución de desprotección, y a continuación se mantuvo la reacción de nuevo durante 10 minutos, y después se eliminó la solución, seguida de un lavado dos veces con DMF, una con MC y otra con DMF, durante 3 minutos cada una, preparando así la resina Cys(Trt)-CTL. Se añadieron 10 ml de una solución de DMF a un nuevo reactor, y se añadieron 200 mmol de Fmoc-Ser(tBu)-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 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 la reacción se llevó a cabo con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora.

Después de eliminar la solución de reacción, la agitación se llevó a cabo con una solución de DMF tres veces durante 5 minutos cada una, seguida de la eliminación. Se tomó una pequeña cantidad de la resina de reacción para comprobar el grado de reacción mediante la prueba de Kaiser (prueba de ninhidrina). La reacción de desprotección se llevó a cabo dos veces utilizando una solución de desprotección de la misma manera que la descrita anteriormente, preparando así la resina Ser(tBu)-Cys(Trt)-CTL.

Después de un lavado suficiente con DMF y MC, se llevó a cabo de nuevo el ensayo de Kaiser, y a continuación se realizó el siguiente ensayo de fijación de aminoácidos de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

45 Se realizó una reacción en cadena en el orden de Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH y Fmoc-Ala-OH sobre la base de la secuencia de aminoácidos seleccionada. El grupo protector Fmoc se eliminó por reacción dos veces con la solución de desprotección durante 10 minutos para cada uno y luego un lavado favorable.

50 Se añadieron anhídrido acético, DIEA y HoBt para llevar a cabo la acetilación durante 1 hora, y luego la resina peptidil preparada se lavó con DMF, MC y metanol tres veces para cada uno, se secó bajo el flujo de gas nitrógeno y se secó completamente por descompresión al vacío en P2O5.

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

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

5 A continuación, los precipitados se recolectaron por centrifugación, seguida de dos lavados con éter frío. Se extrajo la solución madre, seguida de un secado suficiente bajo atmósfera de nitrógeno, sintetizando así 0,73 g de un péptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (Ala-Cys-Thr-Ser-Ser-Gln-Leu-Arg-Ser-Cys) (rendimiento: 87.1%) antes de la purificación.

10 El peso molecular se determinó como 1055,2 (valor teórico: 1055.19) utilizando un sistema de análisis de peso molecular. Un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 también se sintetizó por el mismo procedimiento descrito anteriormente.

[Tabla 1]

| SEQ ID NO | Secuencia (5'→3') | Valor de análisis (espectrómetro de masas) | |
|-----------|-------------------|--|---------------|
| | | Valor analítico | Valor teórico |
| 1 | ACTSSQLRSC | 1055.2 | 1055.19 |
| 2 | KYLLVHRPYRR | 1664.0 | 1663.97 |

Ejemplo 1: Ensayo de proliferación DPC

15 Las células de la papila dérmica del folículo piloso humano se sembraron a una densidad de 2x10³ células/pocillo en placas de 96 pocillos, y luego se incubaron durante la noche. Después de cambiarlas a un medio libre de suero, las células fueron tratadas con los péptidos, seguidas de una incubación durante 3 días, y luego los pocillos fueron tratados con una solución de MTT de 4 mg/ml, seguida de una reacción durante 4 horas. El formazán resultante se solubilizó con DNSO y, a continuación, se midió la absorbancia a 550 nm mediante un lector de microplacas. Los resultados se muestran en las FIGS. 1a y 1b.

20 Como puede confirmarse en las FIGS. 1a y 1b, el crecimiento de las células de la papila dérmica del folículo piloso humano fue estimulado de manera dependiente de la dosis por el tratamiento del péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, respectivamente.

Ejemplo 2: Prueba de actividad de β-catenina

25 Las células de la papila dérmica del folículo piloso humano se sembraron a una densidad de 4x10⁵ células/pocillo en placas de 6 pocillos, y luego se incubaron durante la noche. Después de cambiar a un medio libre de suero, las células fueron tratadas con los péptidos, seguidas de una incubación de 15 y 30 minutos, y luego se recolectaron los pocillos para aislar las proteínas nucleares y citoplasmáticas. Se realizó una transferencia Western utilizando β-catenina (Santa Cruz Biotechnology, USA) para comparar los patrones de expresión de β-catenina. Los resultados se muestran en las FIGS. 2a y 2b.

30 Como puede confirmarse en las FIGS. 2a y 2b, la actividad de β-catenina y el nivel de fosforilación de GSK3β se incrementaron en la papila dérmica del folículo piloso humano mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. La actividad de la β-catenina resulta de estar libre de un complejo debido a la degradación por fosforilación de GSK3β, y aumenta la expresión de moléculas relacionadas con el crecimiento del cabello.

35 **Ejemplo 3: PI3K y p-ERK WB**

40 Las células de la papila dérmica del folículo piloso humano se sembraron a una densidad de 4x10⁵ células/pocillo en placas de 6 pocillos, y se incubaron durante la noche. Después de cambiar a un medio libre de suero, las células fueron tratadas con los péptidos, seguidas de una incubación de 15 y 30 minutos, y luego se recolectaron los pocillos para preparar el lisado celular. Se realizó una transferencia Western utilizando anticuerpos PI3K (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) y anticuerpos fosfo-ERK (Cell Signaling Technology, EE.UU.) para comparar los patrones de expresión de las proteínas. Los resultados se muestran en las FIGS 3a y 3b.

Como puede confirmarse en las FIGS. 3a y 3b, la expresión de PI3K y la fosforilación de ERK, que influyen en el crecimiento de la papila dérmica del folículo piloso humano, fueron aumentadas por el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 4: Bcl-2/Bax WB

Las células de la papila dérmica del folículo piloso humano se sembraron a una densidad de 4x10⁵ células/pocillo en una placa de 6 pocillos, y luego se incubaron durante la noche. Después de cambiarlas a un medio libre de suero, las células fueron tratadas con los péptidos, seguidas de una incubación durante 24 horas, y luego se recolectaron los pocillos para preparar el lisado celular. Se realizó una prueba de transferencia Western utilizando anticuerpos contra Bcl-2 y Bax (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) para comparar los patrones de expresión de las proteínas. Los resultados se muestran en las FIGS. 4a y 4b.

Como puede confirmarse en las FIGS. 4a y 4b, la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 aumentó y la expresión de la proteína Bax relacionada con la apoptosis disminuyó en las células de la papila dérmica del folículo piloso humano 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 5: RT-PCR de Queratina-14

Se sembraron células de la papila dérmica del folículo piloso humano a una densidad de 5x10⁵ células/pocillo en placas de 6 pocillos, y se incubaron durante la noche. Después de cambiarlas a un medio libre de suero, las células fueron tratadas con los péptidos, seguidas de una incubación de 24 horas, y luego se recolectaron los pocillos para aislar el ARN. Tras la cuantificación del ARN, se llevó a cabo la síntesis del ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc (Intron, Corea), seguida de la PCR utilizando la premezcla de PCR (Intron, Corea) y los cebadores de queratina-14, y a continuación se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 5% para comparar el nivel de expresión del ARNm del factor de crecimiento en las respectivas condiciones de tratamiento de las muestras. Los resultados se muestran en las FIGS. 5a y 5b.

[Tabla 2]

| SEQ ID NO | Nombre del cebador | Secuencia (5'-3') |
|-----------|--------------------|--------------------------|
| 3 | Queratina-14_F | CCACCTTTCATCTTCCCAATTCTC |
| 4 | Queratina-14_R | GTGCGGATCTGGCGGTTG |

Como puede verse en las FIGS. 5a y 5b, la expresión del ARNm de la queratina-14, que es un factor relacionado con el crecimiento del cabello, aumentó en las células de la papila dérmica del folículo piloso humano 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 6: RT-PCR de KGF y VEGF

Las células de la papila dérmica del folículo piloso humano se sembraron a una densidad de 4x10⁵ células/pocillo en una placa de 6 pocillos, y se incubaron durante la noche. Después de cambiarlas a un medio libre de suero, las células fueron tratadas con los péptidos, seguidas de una incubación de 24 horas, y luego se recolectaron los pocillos para aislar el ARN. Tras la cuantificación del ARN, se llevó a cabo la síntesis del ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc (Intron, Corea), seguida de la PCR utilizando la premezcla de PCR (Intron, Corea) y los respectivos cebadores de KGF y VEGF, y a continuación se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 5% para comparar los niveles de expresión del ARNm de los factores de crecimiento en las condiciones de tratamiento de las muestras. Los resultados se muestran en la FIG. 6.

[Tabla 3]

| SEQ ID NO | Nombre del cebador | Secuencia (5'-3') |
|-----------|--------------------|-------------------------|
| 5 | KGF_F | TCTGTGCAACACAGTGGTACCT |
| 6 | KGF_R | GTGTGTCCATTTAGCTGATGCAT |
| 7 | VEGF_F | CCATGAACTTTCTGCTGTCTT |
| 8 | VEGF_R | TCGATCGTTCTGTATCAGTCT |

Como puede confirmarse en la FIG. 6, la expresión de VEGF y KGF, que influyen en el crecimiento de las células de la papila dérmica del folículo piloso humano, se incrementó mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Ejemplo 7: RT-PCR de TGF- β 1

Las células de la papila dérmica del folículo piloso humano se sembraron a una densidad de 4×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos, y se incubaron durante la noche. Después de cambiarlas a un medio libre de suero, las células fueron tratadas con los péptidos, seguidas de una incubación de 24 horas, y luego se recolectaron los pocillos para aislar el ARN. Tras la cuantificación del ARN, se llevó a cabo la síntesis de ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc (Intron, Corea), seguido de la PCR utilizando la premezcla de PCR (Intron, Corea) y los cebadores de TGF- β 1, y luego se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 5% para comparar el nivel de expresión de ARNm del factor de crecimiento en las condiciones de tratamiento de las muestras. Los resultados se muestran en la FIG. 7.

[Tabla 4]

| SEQ ID NO | Nombre del cebador | Secuencia (5'-3') |
|-----------|--------------------|-----------------------|
| 9 | TGF- β 1_F | GCCCTGGATACCAACTATTGC |
| 10 | TGF- β 1_R | TCAGCACTTGCAGGAGTAGCG |

Como puede confirmarse en la FIG. 7, la expresión de TGF- β 1, que es uno de los factores de inhibición del crecimiento del cabello, aumentó en las células de la papila dérmica del folículo piloso humano mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Ejemplo 8: RT-PCR de MSX2

Las células de la papila dérmica del folículo piloso humano se sembraron a una densidad de 4×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos, y se incubaron durante la noche. Después de cambiarlas a un medio libre de suero, las células fueron tratadas con los péptidos, seguidas de una incubación de 24 horas, y luego se recolectaron los pocillos para aislar el ARN. Tras la cuantificación del ARN, se llevó a cabo la síntesis del ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc (Intron, Corea), seguida de la PCR utilizando la premezcla de PCR (Intron, Corea) y los cebadores MSX2, y a continuación se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 5% para comparar el nivel de expresión del ARNm del factor de crecimiento en las condiciones de tratamiento de las muestras. Los resultados se muestran en la FIG. 8.

[Tabla 5]

| SEQ ID NO | Nombre del cebador | Secuencia (5'-3') |
|-----------|--------------------|----------------------|
| 11 | MSX2_F | AACACAAGACCAACCGGAAG |
| 12 | MSX2_R | GCAGCCATTTTCAGCTTTTC |

Como puede confirmarse en la FIG. 8, la expresión de MSX2, que es un factor que influye en la elongación de los tallos del cabello, aumentó en las células de la papila dérmica del folículo piloso humano mediante el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Ejemplo 9: Ensayo de medición de la melanina

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 con un medio fresco, seguido del tratamiento con el presente péptido con diferentes concentraciones. Tras la incubación durante 72 horas, se retiró el medio de cultivo y se extrajeron las células, que se transfirieron a tubos de 1,5 ml, y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se recogieron las pellas de células para observar la melanina. A continuación, se añadieron 150 μ l de NaOH 2 M a las pellas de células para lisar la melanina intracelular a 60 °C durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 100 μ l del sobrenadante obtenido de la lisis en cada pocillo de las placas de 96 pocillos, y se midió la absorbancia a 490 nm. Los resultados se muestran en las FIGS. 9a y 9b.

Como se muestra en las FIGS. 9a y 9b, la melanogénesis aumentó en los melanocitos por el tratamiento con el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 10: RT-PCR de genes relacionados con la melanogénesis

Los melanocitos (línea celular B16F10) se incubaron en placas de cultivo de 6 pocillos durante 24 horas, y se trataron con los péptidos de la presente invención con diferentes concentraciones. Tras extraer el ARN de las células incubadas

durante 72 horas, se preparó el ADNc. Se realizó la PCR utilizando los respectivos cebadores específicos para el MITF y la tirosinasa, que intervienen en la melanogénesis, y se observaron los cambios de expresión de los respectivos genes. Los resultados se muestran en la FIG. 10.

[Tabla 6]

| SEQ ID NO | Nombre del cebador | Secuencia (5'-3') |
|-----------|--------------------|-----------------------|
| 13 | MITF_F | CCAGCCTGGCGATCATGTCAT |
| 14 | MITF_R | GGTCTGGACGAGTTGCTG |
| 15 | tirosina_F | GGCCAGCTTTCAGGCAGAGG |
| 16 | tirosina_R | TGGTGCTTCATGGGCAAAT |
| 17 | TRP1_F | TCTGTGAAGGTGCAGGAG |
| 18 | TRP1_R | CCGAAACAGTGAAGGTT |

5

Como puede verse en la FIG. 10, la expresión de ARNm del factor transcripcional MITF y de la enzima tirosinasa, que intervienen en la melanogénesis, aumentó con el tratamiento de los melanocitos con el péptido de la SEQ ID NO: 1.

Ejemplo 11: Transferencia Western de proteínas relacionadas con la melanogénesis

10 Los melanocitos (línea celular B16F10) se incubaron en placas de cultivo de 6 pocillos durante 24 horas, y se trataron con los péptidos de la presente invención con diferentes concentraciones. Tras 72 horas de incubación, las células se lisaron y se sometieron a una prueba de transferencia Western utilizando anticuerpos específicos (dos tipos, ambos de Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) para investigar la expresión de MITF y tirosinasa, que son factores implicados en la melanogénesis. Los resultados se muestran en la FIG. 11.

15 Como puede verse en la FIG. 11, la expresión proteica del factor de transcripción MITF y de la enzima tirosinasa, que participan en la melanogénesis, se incrementó mediante el tratamiento de los melanocitos con el péptido de la SEQ ID NO: 1.

Aplicabilidad industrial

20 La presente invención se refiere a un péptido que muestra actividad estimulante de la producción de cabello y/o actividad estimulante de la melanogénesis, una composición que contiene el péptido como ingrediente activo para prevenir y/o mejorar la pérdida de cabello, una composición que contiene el péptido como ingrediente activo para estimular la producción de cabello y/o el crecimiento del cabello, un uso del péptido para prevenir y/o mejorar la pérdida de cabello, un uso del péptido para estimular la producción y/o el crecimiento del cabello, una composición farmacéutica que contiene el péptido como ingrediente activo para prevenir y/o tratar la hipomelanosis, una composición cosmética que contiene el péptido como ingrediente activo para prevenir y/o mejorar la hipomelanosis, y el péptido para su uso en la prevención, mejora y/o tratamiento de la hipomelanosis.

- <110> CAREGEN CO., LTD.
- <120> Péptidos que tienen actividades para el crecimiento del cabello y promueven la síntesis de melanina y usos de los mismos
- <130> PP170018
- 30 <160> 18
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- 35 <213> Secuencia artificial

ES 2 886 965 T3

<220>
 <223> Péptido 1
 <400>1
 Ala Cys Thr Ser Ser Gln Leu Arg Ser Cys
 1 5 10
 5 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Péptido 2
 <400>2
 Lys Tyr Leu Leu Val His Arg Pro Tyr Tyr Arg Arg
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> Cebador de avance de queratina -14
 <400> 3 ccaccttca tcttccaat tctc 24
 <210> 4
 <211> 18
 20 <212> ADN
 <213> Cebador inverso de queratina-14
 <400> 4 gtgcgatct ggcggttg 18
 <210> 5
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Cebador de avance de KGF
 <400> 5 tctgtcgaac acagtgttac ct 22
 <210> 6
 <211> 23
 30 <212> ADN
 <213> Cebador inverso de KGF
 <400> 6 gtgtgtccat ttactgatg cat 23
 <210> 7
 <211> 21
 35 <212> ADN

<213> Cebador de avance de VEGF
 <400> 7 ccatgaactt tctgctgtct t 21
 <210> 8
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Cebador inverso de VEGF
 <400> 8 tcgatcgttc tgtatcagtc t 21
 <210> 9
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Cebador de avance de TGF-beta 1
 <400> 9 gccctggata ccaactattg c 21
 <210> 10
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Cebador inverso de TGF-beta 1
 <400> 10 tcagcacttg caggagtagc g 21
 <210> 11
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Cebador de avance de MSX2
 <400> 11 aacacaagac caaccggaag 20
 <210> 12
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Cebador inverso de MSX2
 <400> 12 gcagccattt tcagcttttc 20
 <210> 13
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Cebador de avance de MITF
 <400> 13 ccagcctggc gatcatgtca t 21
 <210> 14
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Cebador inverso de MITF
 <400> 14 ggtctggaca ggagttgctg 20

ES 2 886 965 T3

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Cebador de avance de Tirosinasa
5 <400> 15 ggccagctt caggcagg 20
<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Cebador inverso de tirosinasa
10 <400> 16 tgggtctca tgggcaaat 20
<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Cebador de avance de TRP1
15 <400> 17 tctgtgaagg tgtgcaggag 20
<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Cebador inverso de TRP1
20 <400> 18 ccgaaacaga gtggaaggtt 20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.
2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el C-terminal del péptido es un grupo hidroxilo (-OH), un grupo amino (-NH₂) o un grupo azida (-NHNH₂).
- 5 3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el N-terminal del péptido se modifica con al menos un grupo de protección seleccionado del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenil metoxi carbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y polietilenglicol (PEG).
4. Un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, teniendo el péptido una actividad para estimular la producción de cabello.
- 10 5. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el péptido:
 - a) estimula el crecimiento de las células del folículo piloso;
 - b) aumenta la expresión de β -catenina;
 - c) aumenta la expresión de un factor de crecimiento relacionado con la producción de cabello seleccionado del grupo que consiste en el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF);
 - 15 d) aumenta la expresión de la fosfoinositida 3-cinasa (PI3K) y la fosforilación de la quinasa regulada por la señal extracelular (ERK);
 - e) aumenta la expresión de al menos un factor relacionado con la producción de cabello seleccionado del grupo que consiste en Msh homeobox 2 (MSX2) y queratina-14;
 - 20 f) disminuye la expresión del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1); o
 - g) aumenta la expresión del linfoma de células B 2 (Bcl-2) y disminuye la expresión de la proteína X asociada a BCL2 (Bax).
6. Una composición que comprende un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Uso de un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o de una composición como se define en la reivindicación 6 en un procedimiento cosmético para la prevención o mejora de la caída del cabello.
- 25 8. Uso de un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición como se define en la reivindicación 6 en un procedimiento cosmético de estimulación de la producción de cabello o del crecimiento del mismo.
9. Un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición como se define en la reivindicación 6 para su uso en medicina.
- 30 10. Un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición como se define en la reivindicación 6 para su uso en un procedimiento terapéutico de prevención o tratamiento de la hipomelanosis.
11. Un péptido o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la prevención o el tratamiento de la hipomelanosis es mediante el aumento de la melanogénesis.
- 35 12. Un péptido o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el péptido aumenta la expresión de al menos un factor relacionado con la síntesis de melanina seleccionado del grupo que consiste en el factor de transcripción asociado a la microftalmia (MITF) y la proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP1).
13. Un péptido o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la hipomelanosis es vitíligo, albinismo, nevus depigmentosus, pitiriasis alba, pitiriasis versicolor, despigmentación postinflamatoria, morfea, piebaldismo, hipomelanosis guttata idiopática o leucoderma punctatum.
- 40

Célula: **HHFDPC**

Concentración de péptidos: 0,5, 5, 50 μ M

Control positivo: minoxidil 10 μ M, IGF-1 260nM

Tratamiento: 3 días

Ensayo: Ensayo del MTT

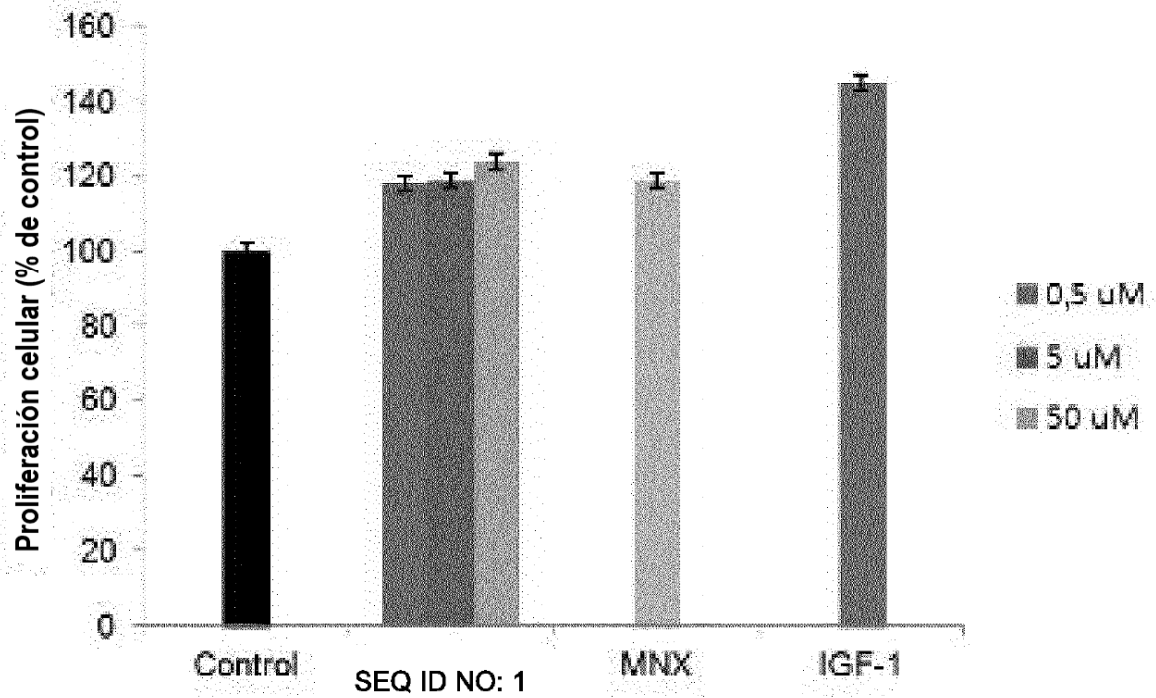


Fig. 1A

Célula: **HHFDPC**
Concentración de péptidos: 0,5, 5, 50 μM
Control positivo: **IGF-1 260nM**
Tratamiento: 3 días
Ensayo: Ensayo del MTT

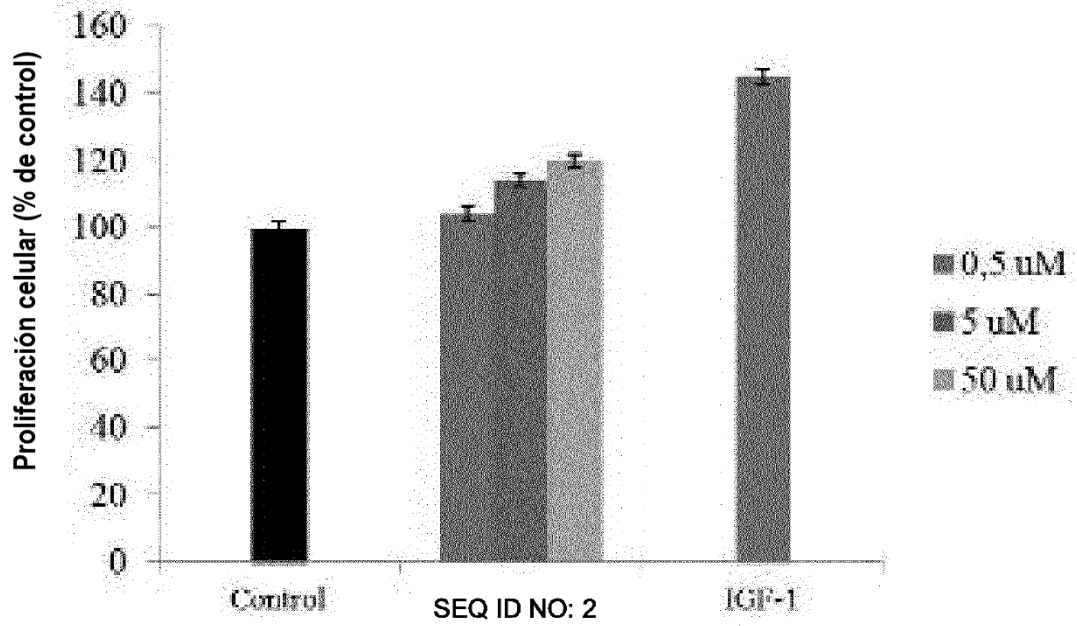


Fig. 1B

Célula: HHFDPC
Concentración de péptidos: 5, 50 μ M
Control positivo: minoxidil 10 μ M
Tratamiento: 15, 30 min
Ensayo: Transferencia Western

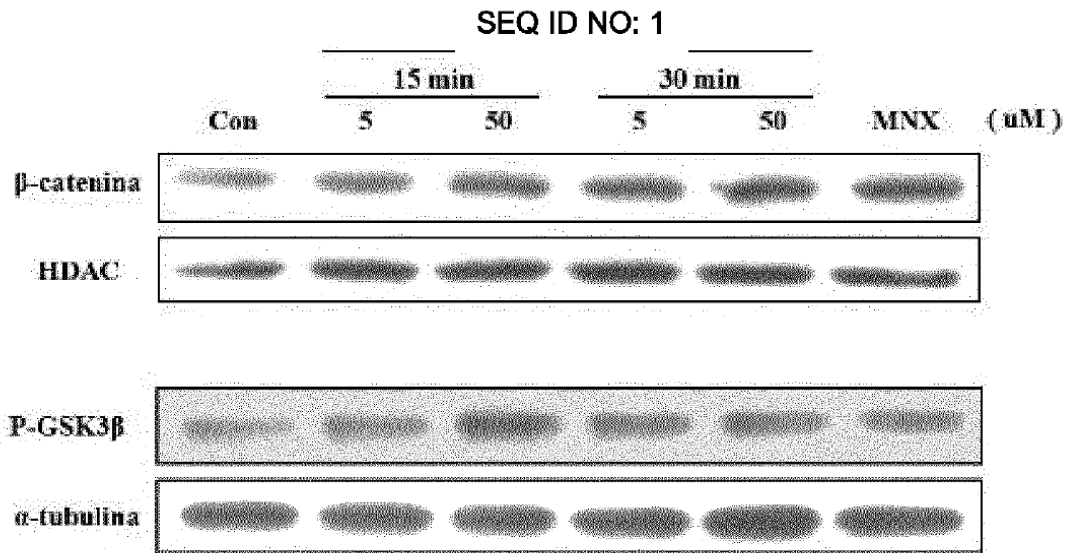


Fig. 2A

Célula: HHDPC
Concentración de péptidos: 5, 50 μ M
Control positivo: minoxidil 10 μ M
Tratamiento: 15, 30 min
Ensayo: Transferencia Western

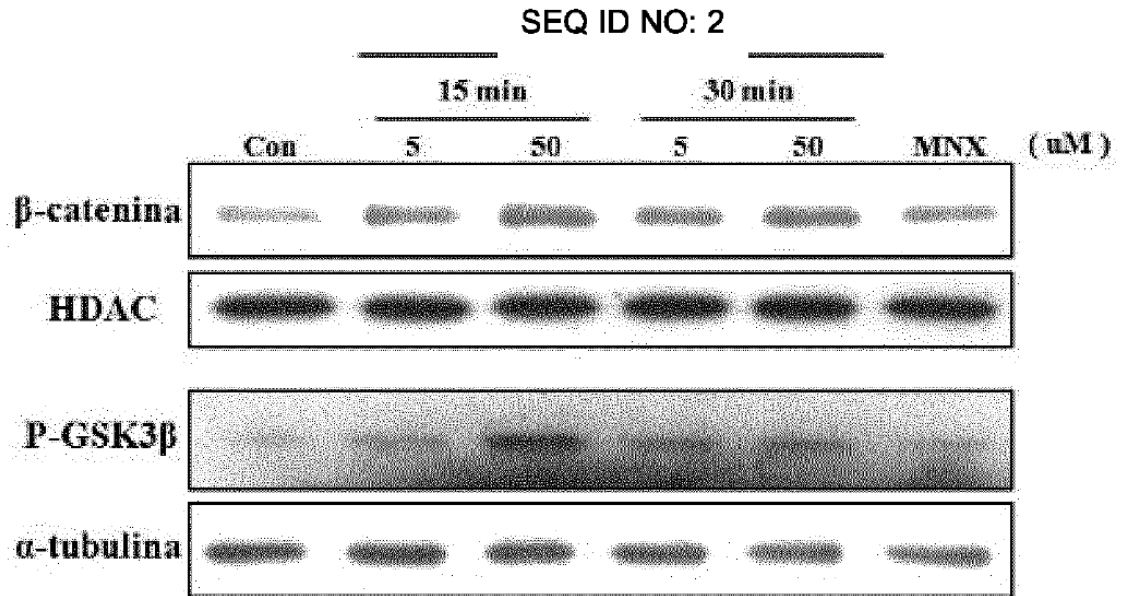


Fig. 2B

Célula: **HHFDPC**
Concentración de péptidos: 5, 50 μ M
Control positivo: minoxidil 10 μ M
Tratamiento: 15, 30 min
Ensayo: Transferencia Western

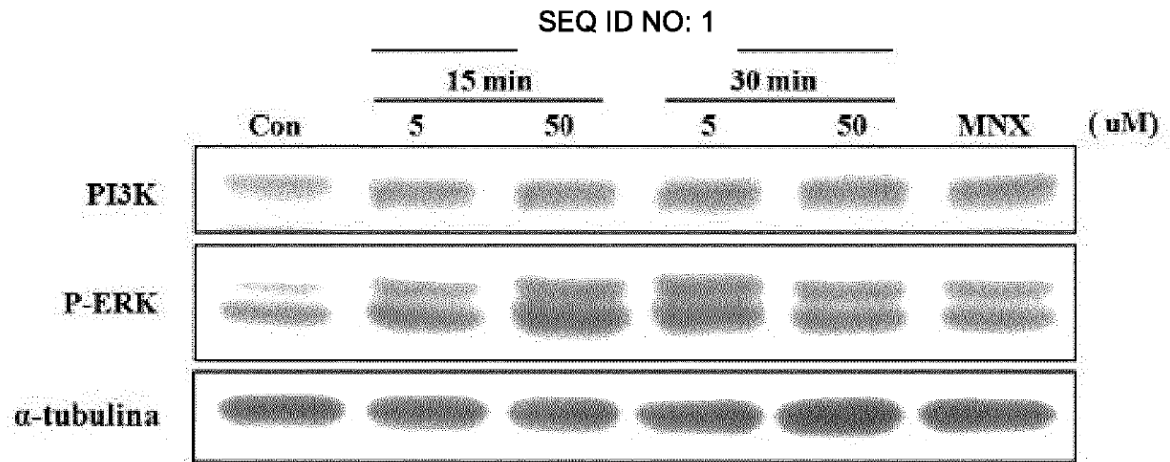


Fig. 3A

Célula: **HHFDPC**
Concentración de péptidos: 5, 50 μ M
Control positivo: **minoxidil 10uM**
Tratamiento: 15, 30 min
Ensayo: Transferencia Western

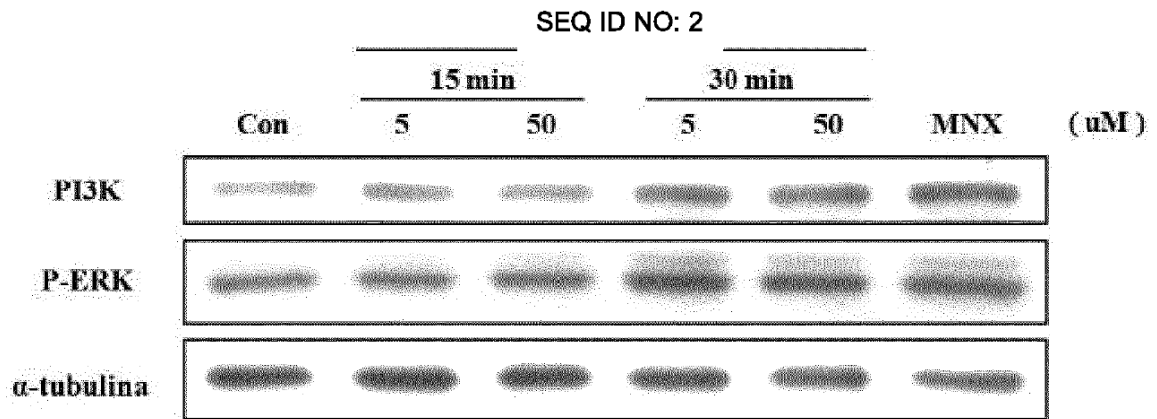


Fig. 3B

Célula: **HHFDPC**
Concentración de péptidos: **0,5, 5, 50nM**
Control positivo: **minoxidil 10uM**
Tratamiento: **24h**
Ensayo: **Transferencia Western**

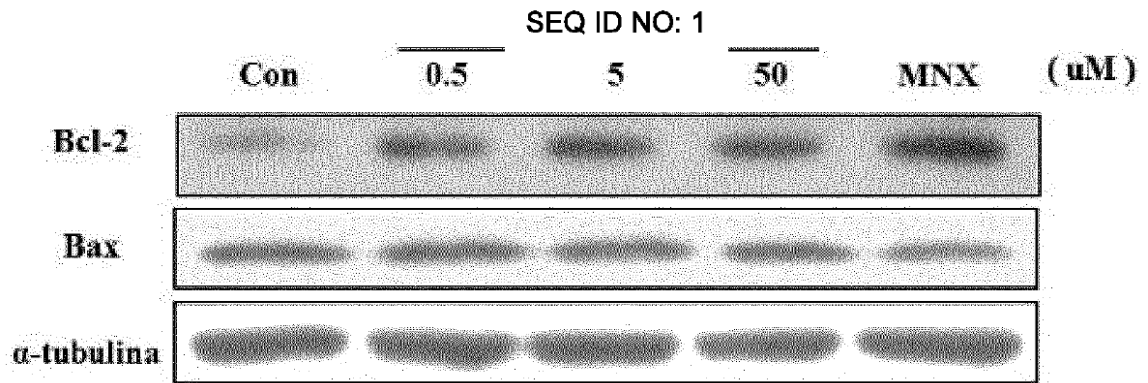


Fig. 4A

Célula: **HHFDPC**
Concentración de péptidos: **0,5, 5, 50uM**
Control positivo: **minoxidil 10uM**
Tratamiento: **24h**
Ensayo: **Transferencia Western**

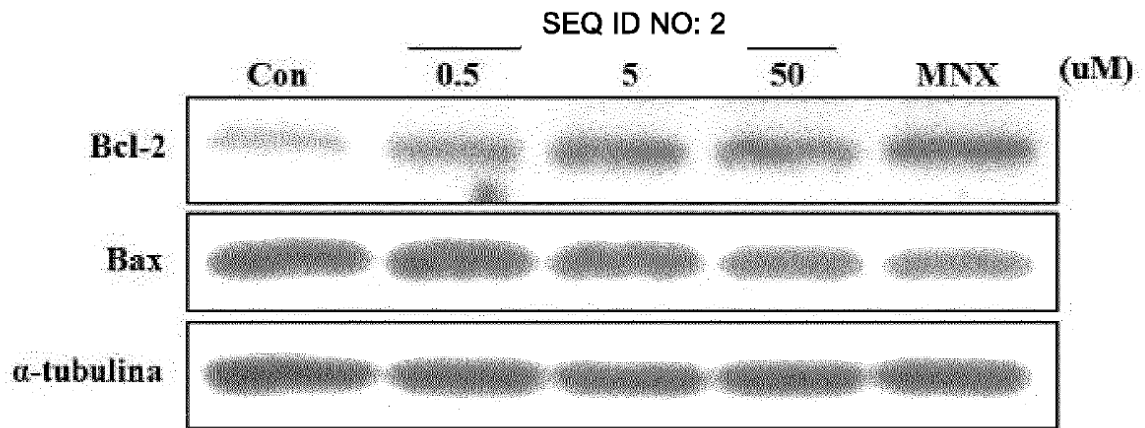


Fig. 4B

Célula: HaCaT
Concentración de péptidos: 0,5, 5, 50 μ M
Control positivo: EGF 160 μ M
Tratamiento: 24h
Ensayo: RT-PCR

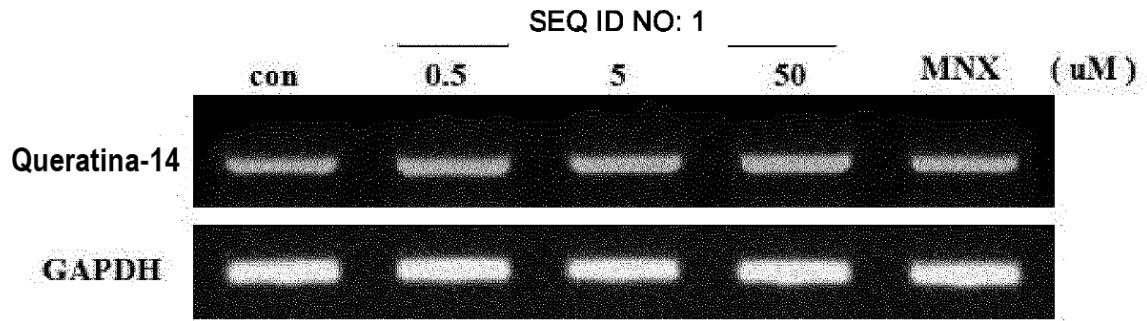


Fig. 5A

Célula: HaCaT
Concentración de péptidos: 0,5, 5, 50 μ M
Control positivo: EGF 160 μ M
Tratamiento: 24h
Ensayo: RT-PCR

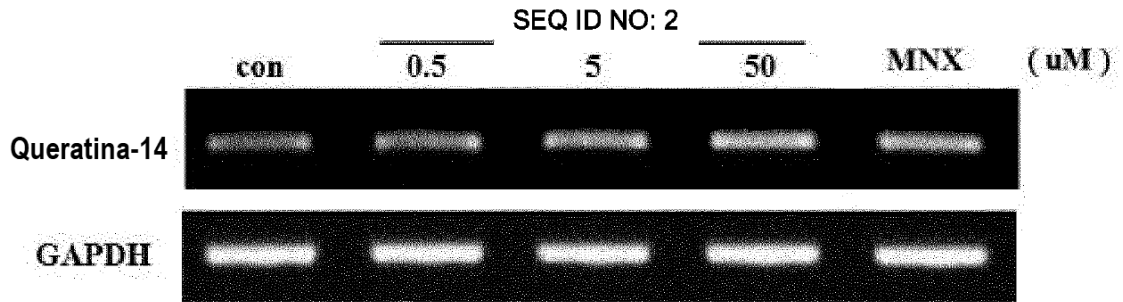


Fig. 5B

Célula: **HHFDPC**
Concentración de péptidos: 0,5, 5, 50 μ M
Control positivo: **minoxidil 10 μ M**
Tratamiento: 24h
Ensayo: RT-PCR

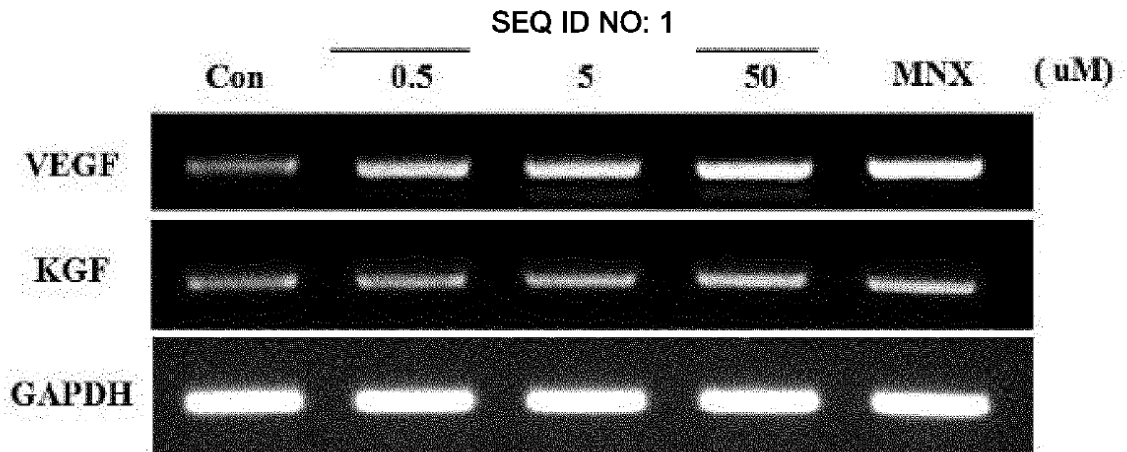


Fig. 6

Célula: **HIFDPC**
Concentración de péptidos: 0,5, 5, 50 μ M
Control positivo: minoxidil 2 μ g/ml
Tratamiento: 24h
Ensayo: RT-PCR

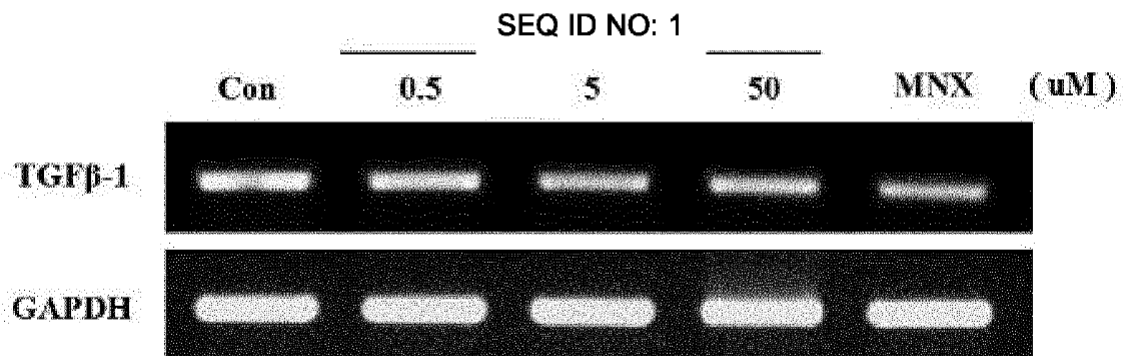


Fig. 7

Célula: **HHGMC**
Concentración de péptidos: 0,5, 5, 50 μ M
Control positivo: **EGF 160nM**
Tratamiento: 24h
Ensayo: RT-PCR

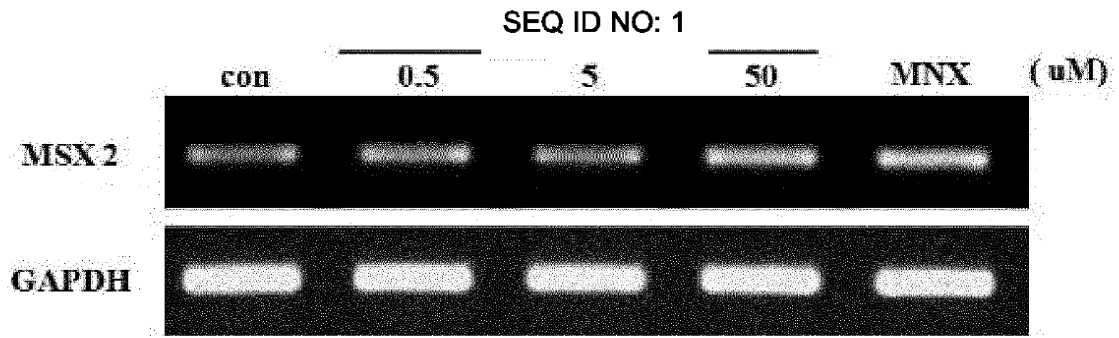


Fig. 8

Célula: B16F10
Concentración de péptidos: 10, 50, 100 μ M
Control positivo: α -MSH : 200 ng/ml
Tratamiento: 3 días
Ensayo: Contenido de melanina

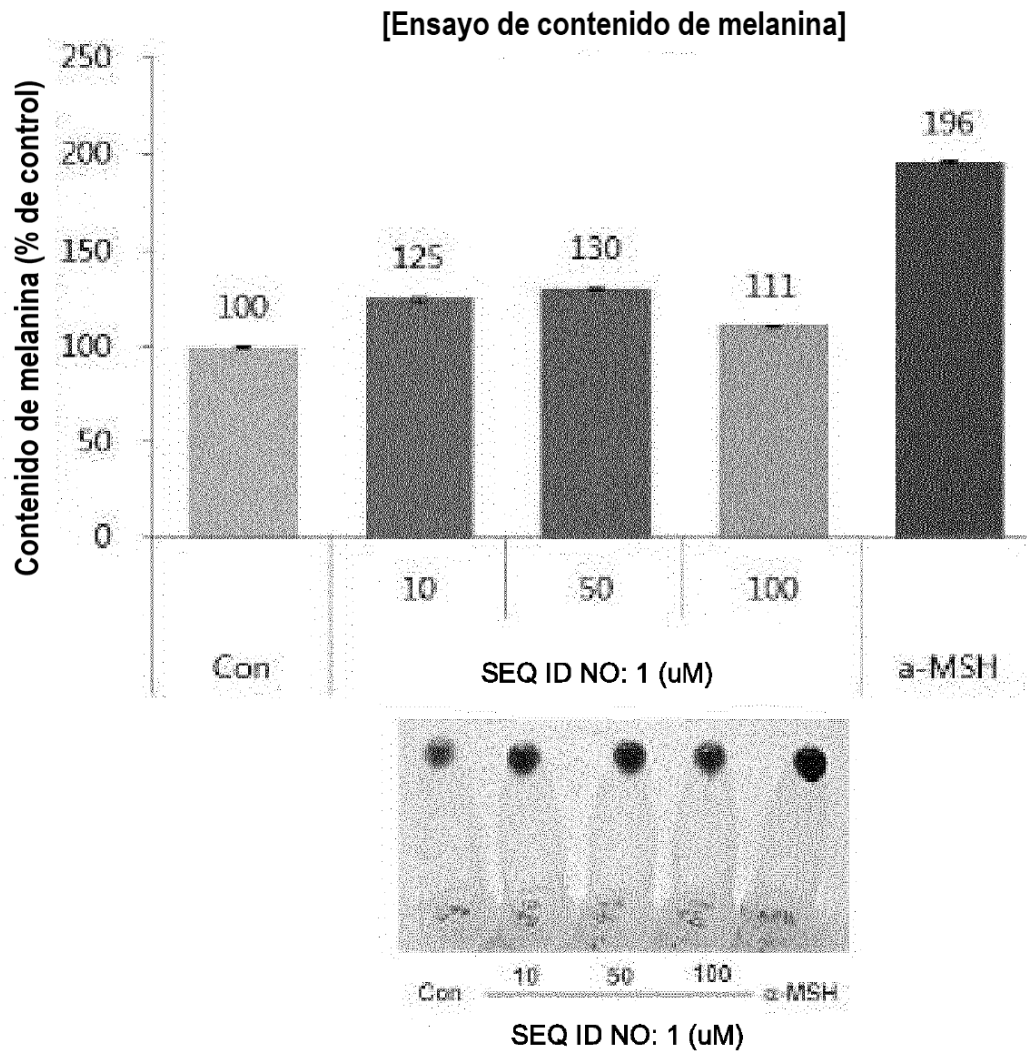


Fig. 9A

Célula: B16F10
Concentración de péptidos: 10, 50, 100 μ M
Control positivo: α -MSH: 200 ng/ml
Tratamiento: 3 días
Ensayo: Contenido de melanina

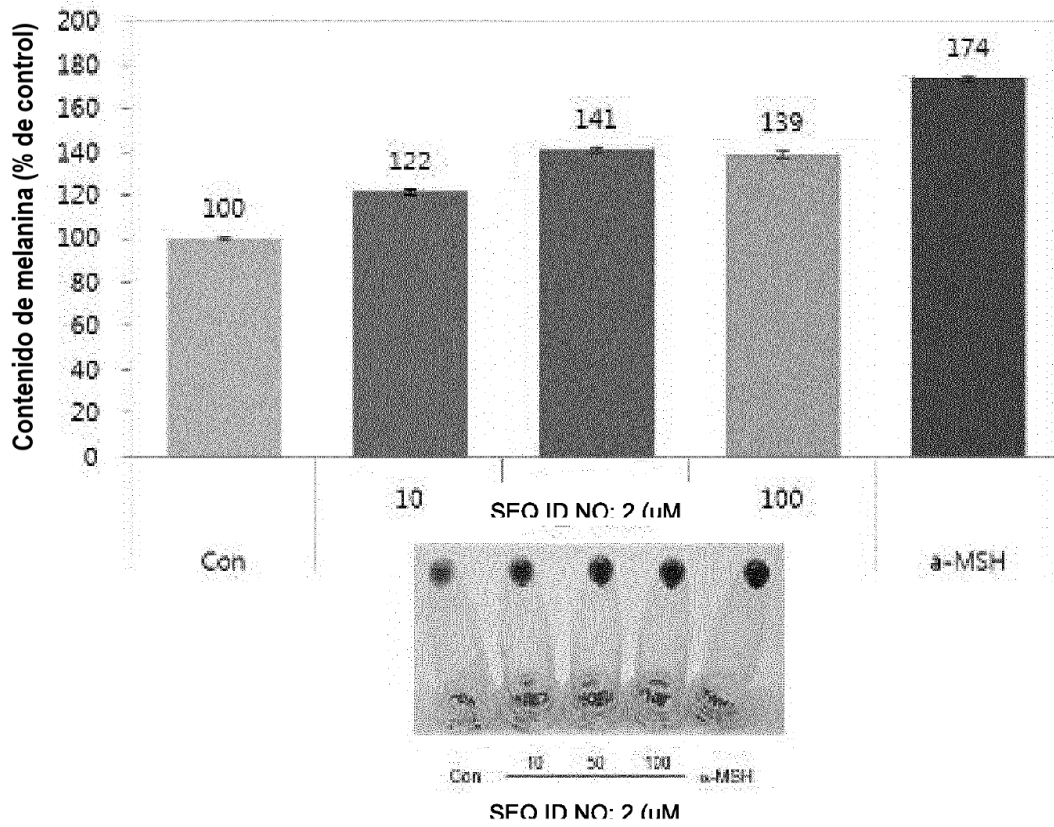


Fig. 9B

Célula: B16F10
Concentración de péptidos: 10, 50, 100 μ M
Control positivo: α -MSH : 200 ng/ml
Tratamiento: 2 días
Ensayo: RT-PCR

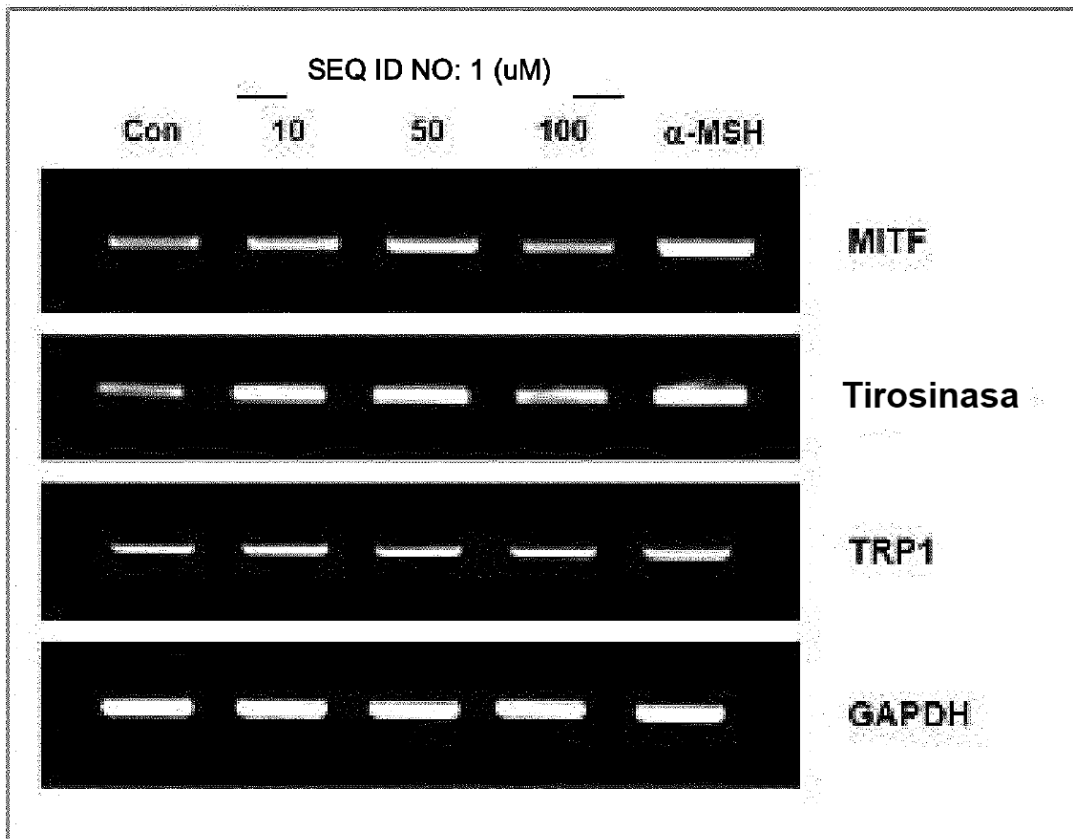


Fig. 10

Célula: **B16F10**
Concentración de péptidos: 10, 50 μ M
Control positivo: α -MSH : 200 ng/ml
Tratamiento: 3 días
Ensayo: Transferencia Western

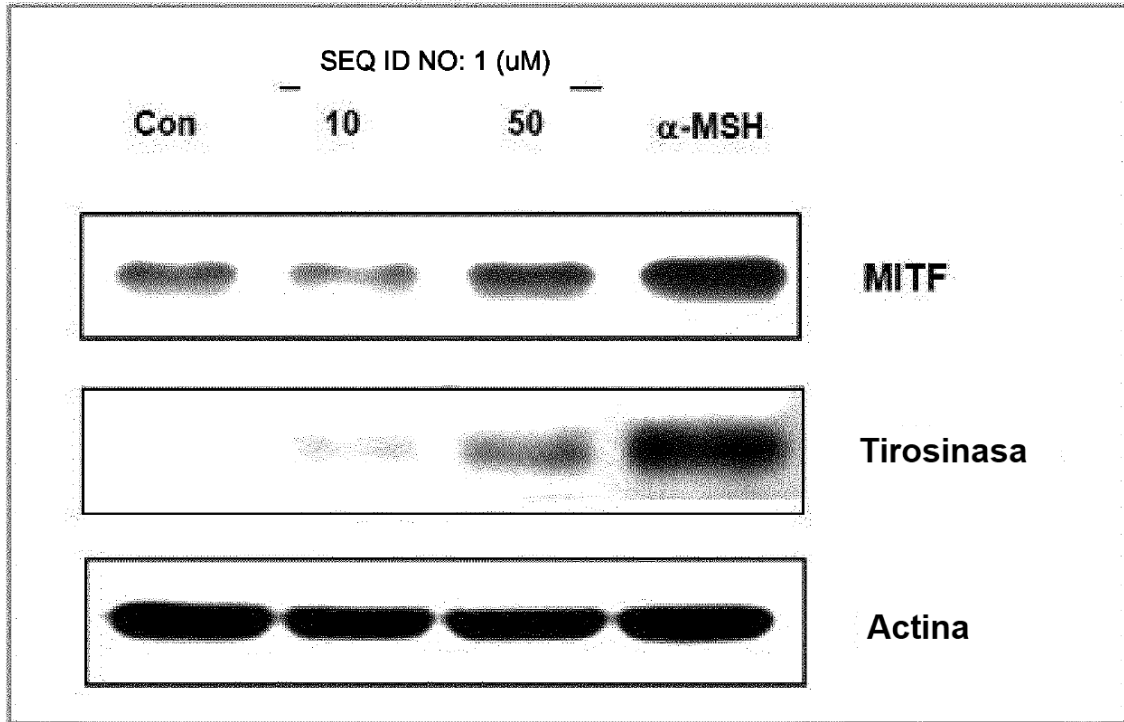


Fig. 11