

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 939 257**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/60 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2019** **PCT/KR2019/013269**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2021** **WO21033833**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2019** **E 19930169 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2023** **EP 3800194**

54 Título: **Péptido con actividad blanqueadora de la piel y uso del mismo**

30 Prioridad:

20.08.2019 KR 20190101883

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

20.04.2023

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, YONGJI;
KIM, EUN MI y
LEE, EUNG JI

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 939 257 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 con actividad blanqueadora de la piel y uso del mismo

Campo técnico

La presente divulgación se refiere a un péptido con actividad blanqueadora de la piel y a uso del mismo.

5 Técnica antecedente

Los factores que determinan el color de la piel incluyen básicamente el melasma, las pecas y el bronceado debido a la exposición a los rayos UV, salvo diferencias por raza, región, sexo y edad, y también incluyen la pigmentación general, el acné, las cicatrices, la distribución de la queratina, la circulación sanguínea, el estrés, las condiciones de salud, etc. Entre estos factores, la pigmentación es conocida como el principal factor que determina el color de la piel.

Los pigmentos que afectan al color de la piel incluyen la melanina, el melanoide, el caroteno, la hemoglobina, el carotenoide, etc., y los distintos colores de la piel, el pelo y los ojos están determinados por estos pigmentos. Entre ellos, el pigmento más importante para determinar el color de la piel es la melanina y, concretamente, el color de la piel viene determinado por la cantidad y distribución de la melanina. La melanina se produce en unas células denominadas melanocitos, situadas bajo la epidermis de la piel, y es transferida y expulsada de la capa córnea por el metabolismo cutáneo. Independientemente del color de la piel, el número de melanocitos es casi el mismo, pero la diferencia en el color de la piel sólo se atribuye a la cantidad, el tipo y la distribución de la melanina.

En la piel, la tirosina es convertida en DOPA por una enzima del cuerpo humano, llamada tirosinasa, y una serie de procesos de oxidación producen finalmente melanina, que es un polímero de color marrón oscuro. Cuando se produce más melanina de la necesaria, se pueden producir hiperpigmentaciones como melasma, pecas, manchas, etc., que son resultados cosméticamente malos. Recientemente, la población de ocio ha aumentado y cada vez más personas disfrutan de actividades al aire libre, por lo que existe una demanda creciente para prevenir la pigmentación de la melanina causada por los rayos ultravioleta. El documento EP 2 990 027 A1 divulga pentapéptidos (por ejemplo, QVAVK) como agentes cosméticos blanqueadores de la piel y su uso para el tratamiento de la hiperpigmentación.

Ante dichos antecedentes técnicos, se han realizado diversos estudios sobre el desarrollo de un agente blanqueador que evite la producción excesiva de melanina a través de mecanismos tales como la inhibición de la actividad de los melanocitos, la inhibición de la actividad de la tirosinasa, etc. (Publicación de patente coreana nº 10-2019-0050058), pero aún no se han obtenido resultados satisfactorios. Las referencias a procedimientos de tratamiento en los párrafos siguientes de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

Descripción de las realizaciones

Problema técnico

Se proporciona un nuevo péptido con eficacia blanqueadora.

Se proporciona una composición cosmética que incluye el péptido.

Se proporciona una composición farmacéutica que incluye el péptido.

Se proporciona un procedimiento para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad de hiperpigmentación utilizando el péptido.

Solución al problema

Un aspecto proporciona un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "péptido" puede referirse a una molécula lineal formada por la unión de restos de aminoácidos entre sí mediante enlaces peptídicos. El péptido puede prepararse según un procedimiento de síntesis química conocido en la técnica, en particular técnicas de síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Amer. Química. 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 US nº 5.516.891).

El péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 puede tener actividad biológicamente eficaz. La actividad biológicamente eficaz puede presentar una o más características seleccionadas de entre las siguientes: a) inhibición de la producción de melanina; b) inhibición de la actividad tirosinasa; y c) inhibición de la expresión de Rab27a, melanofilina (Mlph), miosina VA, factor de transcripción inductor de melanocitos (MITF),

tirosinasa o proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP1). Por lo tanto, el péptido puede utilizarse para blanquear la piel o para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad de hiperpigmentación.

El péptido puede unirse con un grupo protector en su extremo N-terminal, en su extremo C-terminal o en ambos extremos para obtener estabilidad química, propiedades farmacológicas mejoradas (vida media, absorbencia, título, potencia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, amplio espectro de actividad biológica) y antigenicidad reducida. La estabilidad puede referirse no sólo a la estabilidad *in vivo* que protege al péptido del ataque de las enzimas de escisión de proteínas *in vivo*, sino también a la estabilidad de almacenamiento (por ejemplo, estabilidad de almacenamiento a temperatura ambiente). El N-terminal del péptido puede unirse con un grupo protector cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluoreonilmetoxicarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo, un grupo butoxicarbonilo, un grupo aliloxicarbonilo y un polietilenglicol (PEG). El C-terminal del péptido puede unirse con cualquier grupo protector seleccionado del grupo que consiste en un grupo amino (-NH₂), un grupo alquilo terciario y un grupo azida (-NHNH₂). Además, el péptido puede incluir opcionalmente una secuencia diana, una etiqueta, un resto marcado o una secuencia de aminoácidos preparada con el fin específico de aumentar la semivida o la estabilidad del péptido.

Otro aspecto proporciona una composición cosmética que incluye el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como principio activo; una composición farmacéutica que incluye el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como ingrediente activo; y el uso del péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 para la preparación de la composición cosmética o farmacéutica, o para ser utilizado como composición cosmética o farmacéutica.

Otro aspecto más proporciona una composición cosmética blanqueadora de la piel que incluye el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como principio activo.

El péptido es el mismo que el descrito anteriormente.

El término "blanqueamiento de la piel" significa no sólo aclarar el tono de la piel mediante la inhibición de la síntesis de pigmentos de melanina, sino también mejorar la hiperpigmentación de la piel causada por la luz ultravioleta, las hormonas o la herencia. La hiperpigmentación de la piel puede incluir melasma, pecas, lentigo, manchas, lentigo senil o puntos marrones, etc.

Los péptidos funcionales existentes, a pesar de su eficaz actividad biológica, tienen la desventaja de que no penetran eficazmente en los tejidos o células diana debido a su propio tamaño o se eliminan en el organismo en poco tiempo debido a su corta vida media. Por el contrario, la composición cosmética blanqueadora de la piel según una realización incluye el péptido consistente en 10 aminoácidos o menos como ingrediente activo, y por lo tanto, el ingrediente activo tiene un índice de penetración en la piel excelente. Por ejemplo, cuando se aplica tópicamente a la piel, la composición puede mostrar un efecto blanqueador de la piel eficaz.

El término "mejorar" puede referirse a todas las acciones que al menos reducen un parámetro relacionado con la afección que se está aliviando o tratando, por ejemplo, el grado de un síntoma.

La composición cosmética puede incluir una cantidad cosméticamente eficaz del péptido; y/o un vehículo cosméticamente aceptable. Por "cantidad cosméticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente para lograr la eficacia blanqueadora de la piel de la composición cosmética. La cantidad cosméticamente eficaz puede ser determinada por los expertos en la materia, basándose en un conocimiento común, de forma que se muestre el efecto blanqueador de la piel. Una relación en peso del péptido y el vehículo cosméticamente aceptable puede ser, por ejemplo, de 500:1 a 1:500, y por ejemplo, la relación en peso puede ser de 450:1 a 1:450, de 400:1 a 1:400, de 350:1 a 1:350, de 300:1 a 1:300, de 250:1 a 1:250, 200:1 a 1:200, 150:1 a 1:150, 100:1 a 1:100, 80:1 a 1:80, 60:1 a 1:60, 40:1 a 1:40, 20:1 a 1:20, 10:1 a 1:10, 8:1 a 1:8, 6:1 a 1:6, 4:1 a 1:4, o 2:1 a 1:2, pero sin limitarse a lo anterior.

La composición cosmética puede prepararse en cualquier formulación comúnmente preparada en la técnica y, por ejemplo, puede formularse en 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 maquillaje en polvo, una base de maquillaje en emulsión, una base de maquillaje en cera, un pulverizador, etc., pero no se limita a lo mencionado. Por ejemplo, la composición cosmética puede prepararse en la formulación de una loción suavizante, una loción nutritiva, una crema nutritiva, una crema de masaje, una esencia, una crema para los ojos, una crema limpiadora, una espuma limpiadora, un agua limpiadora, un envase, un pulverizador, un polvo, etc.

Cuando la formulación de la composición cosmética es una pasta, crema o gel, puede utilizarse como componente vehículo aceite animal, aceite vegetal, cera, parafina, almidón, tragacanto, un derivado de la celulosa, polietilenglicol, silicona, bentonita, sílice, talco, óxido de zinc, etc.

Cuando la formulación de la composición cosmética es un polvo o un aerosol, puede utilizarse lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio o poliamida en polvo como componente vehículo. Por ejemplo, en el caso de un aerosol, puede incluirse adicionalmente un propelente como clorofluorohidrocarbano, propano/butano o dimetil éter.

Cuando la formulación de la composición cosmética es una solución o una emulsión, puede utilizarse como componente vehículo un disolvente, un agente solubilizante o un agente emulsionante. Por ejemplo, puede incluirse agua, etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, aceite de 1,3-butilglicol, éster alifático de glicerol, polietilenglicol o éster de ácido graso de sorbitán.

- 5 Cuando la formulación de la composición cosmética es una suspensión, puede utilizarse como componente vehículo un diluyente líquido como agua, etanol o propilenglicol, un agente de suspensión como alcohol isosteárico etoxilado, éster de sorbitol polioxietilenado y éster de sorbitán polioxietilenado, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar, tragacanto, etc.

- 10 Cuando la formulación de la composición cosmética es un limpiador que contiene tensioactivos, sulfato de alcohol alifático, éter sulfato de alcohol alifático, monoéster de ácido sulfosuccínico, isetionato, un derivado de imidazolio, metiltaurato, sarcosinato, éter sulfato de amida de ácido graso, alquilamidobetaina, alcohol alifático, glicérido de ácido graso, dietanolamida de ácido graso, aceite vegetal, un derivado de lanolina, éster etoxilado de ácido graso de glicerol, etc. como componente vehículo.

- 15 Además del péptido como principio activo y del componente vehículo, la composición cosmética puede incluir ingredientes comúnmente utilizados en composiciones cosméticas, por ejemplo, un agente auxiliar común como un antioxidante, un estabilizante, un solubilizante, vitaminas, un pigmento y un agente aromatizante.

Otro aspecto adicional proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de hiperpigmentación, la composición farmacéutica incluyendo el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como principio activo.

- 20 El péptido es el mismo que el descrito anteriormente.

- El término "prevenir" se refiere a todas las acciones que inhiben o ralentizan la aparición de una enfermedad mediante la administración de la composición. El término "tratar" se refiere a cualquier forma de tratamiento que proporciona a un individuo que padece o corre el riesgo de padecer una enfermedad efectos que incluyen la mejora de las condiciones (por ejemplo, uno o más síntomas) del individuo, el retraso de la progresión de la enfermedad, el retraso de la aparición de los síntomas, la ralentización de la progresión de los síntomas, etc. Por tanto, "tratar" y "prevenir" no significan curar o eliminar por completo los síntomas.

La "enfermedad de hiperpigmentación" se refiere a una enfermedad en la que el pigmento melanina se produce y deposita excesivamente en la piel, es decir, síntomas de hiperpigmentación. La enfermedad de hiperpigmentación puede ser, por ejemplo, melasma, pecas, lentigo, mancha, lentigo senil o lentigos solares.

- 30 La composición farmacéutica puede incluir una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido; y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término "cantidad farmacéuticamente eficaz" puede significar una cantidad suficiente para lograr la eficacia de la composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de hiperpigmentación.

- 35 Una relación en peso del péptido y el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, de 500:1 a 1:500. Por ejemplo, la relación de pesos puede ser 450:1 a 1:450, 400:1 a 1:400, 350:1 a 1:350, 300:1 a 1:300, 250:1 a 1:250, 200:1 a 1:200, 150:1 a 1:150, 100:1 a 1:100, 80:1 a 1:80, 60:1 a 1:60, 40:1 a 1:40, 20:1 a 1:20, 10:1 a 1:10, 8:1 a 1:8, 6:1 a 1:6, 4:1 a 1:4, o 2:1 a 1:2, pero sin limitarse a lo mencionado.

- 40 El vehículo farmacéuticamente aceptable es de los comúnmente utilizados en la preparación, y puede incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, etc., pero sin limitarse a los mencionados. Los vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables adecuados se describen detalladamente en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).

- 45 La composición farmacéutica puede incluir además un lubricante, un agente humectante, un edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante, etc., además de los componentes anteriores, pero sin limitarse a los mencionados.

La composición farmacéutica puede administrarse por vía oral o parenteral, y específicamente por vía parenteral. La administración parenteral puede incluir inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal, administración tópica, administración transdérmica, etc., pero no se limita a las mismas.

- 50 Una dosis de administración de la composición farmacéutica puede ser de 0,0001 µg a 1000 µg (microgramos), 0,001 µg a 1000 µg, 0,01 µg a 1000 µg, 0,1 µg a 1000 µg, o 1,0 µg a 1000 µg por día, pero no se limita a lo mencionado. La administración puede realizarse de una a cuatro veces al día, de dos a tres veces al día, o dos veces al día. Además, la administración de la presente divulgación puede realizarse durante 4 semanas o más, 8 semanas o más, de 4 semanas a 12 semanas, o de 8 semanas a 12 semanas. La administración puede prescribirse

de diversas formas en función de factores como el procedimiento de formulación, el modo de administración, la edad, el peso, el sexo, las condiciones de la enfermedad, la alimentación, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la sensibilidad de respuesta del paciente.

5 La composición farmacéutica puede prepararse en forma de dosis unitaria o puede prepararse en un envase multidosis formulando la composición farmacéutica utilizando un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable según un procedimiento, que puede ser fácilmente llevado a cabo por los expertos en la materia a la que pertenece la presente divulgación.

10 La formulación puede presentarse en forma de solución, suspensión o emulsión en un medio oleoso o acuoso, o en forma de extracto, polvo, gránulo, comprimido o cápsula, y puede incluir además un agente dispersante y/o un estabilizador.

Otro aspecto adicional proporciona un procedimiento para blanquear la piel, el procedimiento incluye aplicar, a la piel de un individuo, la composición cosmética que incluye el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como principio activo.

El péptido, el blanqueamiento de la piel y la composición cosmética son los mismos que los descritos anteriormente.

15 Los términos "extender", "aplicar" y "administrar" pueden utilizarse indistintamente, y pueden significar la localización al menos parcial de la composición según una realización en un lugar deseado, o la colocación de la composición según una realización en un individuo a través de una vía de administración.

20 Otro aspecto adicional proporciona un procedimiento para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad de hiperpigmentación, el procedimiento incluye administrar, a un individuo, la composición farmacéutica que incluye el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

El péptido, la composición farmacéutica, la enfermedad de hiperpigmentación, la prevención, la mejora y el tratamiento son los mismos que los descritos anteriormente.

El término "individuo" se refiere a un sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad y, más específicamente, a un mamífero, como un primate humano o no humano, un ratón, un perro, un gato, un caballo y una vaca.

25 Otro aspecto más proporciona una composición alimentaria blanqueadora de la piel que incluye el péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como principio activo.

El péptido y el blanqueamiento de la piel son los mismos que los descritos anteriormente.

30 El contenido del péptido como ingrediente activo en la composición alimentaria puede seleccionarse adecuadamente, sin limitación, en función de la forma del alimento, su uso, etc. Por ejemplo, el péptido puede añadirse en una cantidad del 0,01% en peso al 15% en peso, en base al peso total del alimento. Por ejemplo, el péptido puede añadirse en una proporción de 0,02 g a 10 g, o de 0,3 g a 1 g, en base a 100 mL de una composición de bebida saludable.

Efectos ventajosos de la divulgación

35 Un péptido según un aspecto inhibe significativamente la producción de melanina y la actividad de la tirosinasa, así como la expresión de factores asociados con la producción de melanina, exhibiendo así un excelente efecto blanqueador de la piel y aplicándose en la prevención, mejora o tratamiento de una enfermedad de hiperpigmentación. En consecuencia, el péptido según un aspecto puede aplicarse como un ingrediente activo para una composición blanqueadora de la piel o una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad de hiperpigmentación.

40 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra los resultados del examen de la reducción de la producción de melanina, tras añadir un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a células B16F10;

La FIG. 2 muestra los resultados del examen de la reducción de la actividad tirosinasa, tras añadir el péptido a las células B16F10;

45 La FIG. 3 muestra los resultados del examen de la inhibición de la expresión de Rab27a, Mlph, miosina VA, MITF, tirosinasa y TRP1, que son genes asociados a la producción de melanina, tras añadir el péptido a células B16F10; y

La FIG. 4 muestra los resultados del examen de la inhibición de la expresión de Mlph, Rab27a, tirosinasa (TYR) y MITF, que son proteínas asociadas a la producción de melanina, tras añadir el péptido a células B16F10.

Modo de divulgación

En lo sucesivo, la presente divulgación se describirá con más detalle haciendo referencia a las realizaciones. No obstante, estas realizaciones son meramente ilustrativas, y el alcance de la presente divulgación se limita a las mismas.

Ejemplo 1. Síntesis del péptido

- 5 Un péptido consistente en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 descrito a continuación [Tabla 1] se sintetizó utilizando un sintetizador de péptidos automatizado (Milligen 9050, Millipore, EE.UU.), y el péptido puro se aisló utilizando una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa C18 (Waters Associates, EE.UU.). Como columna se utilizó ACQUITY UPLC BEH300 C18 (2,1 mm X 100 mm, 1,7 μ m, Waters Co, EE.UU.).

[Tabla 1]

SEQ ID NO:	Secuencia de péptidos
1	PNRYP

Ejemplo 2. Eficacia blanqueadora del péptido sintetizado

(1) Examen del efecto inhibidor sobre la producción de melanina

- Se sembró una célula de melanoma de ratón B16F10 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo, y se incubó durante 16 horas. A continuación, se sustituyó el medio de cultivo por un medio suplementado con un 2% (v/v) de suero, y se añadieron 200 ng/mL de hormonas estimulantes de α -melanocitos (α -MSH) para estimular la producción de melanina, junto con cada péptido de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, a una concentración de 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M o 200 μ M, respectivamente, seguido de incubación durante 72 horas. A continuación, las células incubadas se disolvieron en NaOH 1 N y se midió la absorbancia a 450 nm. Además, se utilizó un grupo no tratado (Con) como control, y sólo un grupo tratado con α -MSH como control negativo y 200 μ M o 500 μ M de arbutina-, que es un conocido agente blanqueador de la piel, y el grupo tratado con α -MSH como control positivo.

- A partir de la absorbancia a 450 nm, se determinó el contenido de melanina (%) producida por las células B16F10. El contenido determinado de melanina (%) se muestra en la FIG. 1. Como se muestra en la FIG. 1, se confirmó que la producción de melanina se reducía de forma dependiente de la concentración mediante la adición del péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

(2) Examen del efecto inhibidor sobre la actividad de la tirosinasa

Efecto inhibidor del péptido de SEQ ID NO: 1 sobre la actividad de la tirosinasa, que es una enzima clave en la producción de melanina.

- En detalle, se sembró una célula de melanoma de ratón B16F10 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo, seguida de incubación durante 16 horas. A continuación, se sustituyó el medio de cultivo por un medio suplementado con un 2% (v/v) de suero y se añadieron 200 ng/mL de α -MSH. Junto con ello, el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a una concentración de 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M o 160 μ M, respectivamente, seguido de una incubación durante 72 horas. La placa de 6 pocillos se colocó en hielo y, a continuación, se lavó con PBS frío dos veces. A continuación, las células se lisaron añadiendo tampón de fosfato sódico 0,1 M (pH 6,8, tampón de lisis) con un 1% (v/v) de tritón X-100. A continuación, las células de la placa de pocillos se rasparon con un raspador y se recogieron en un tubo de 1,5 ml. Las células recogidas se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 minutos para obtener un sobrenadante. A continuación, se cuantificaron las proteínas del sobrenadante para ajustar el contenido proteínico a una cantidad predeterminada. Se añadió un tampón y se dispensaron 90 μ L en total de la muestra en una placa de 96 pocillos. Además, se prepararon en la placa una muestra experimental, una muestra en blanco y una muestra de control positivo, como se indica en la Tabla 2.

[Tabla 2]

	Muestra experimental	Muestra en blanco	Muestra de control positiva
Muestra	90 μ L	-	-
Tampón	-	90 μ L	90 μ L

	Muestra experimental	Muestra en blanco	Muestra de control positiva
Tirosinasa de hongos (0,1 mg/mL)	-	-	10 µL

A continuación, se añadieron 20 µL de L-DOPA 10 mM a cada muestra y se incubaron a 37°C durante 1 hora. A continuación, se midió la absorbancia a 475 nm. Además, se utilizó un grupo no tratado (Con) como control, y sólo el grupo tratado con α -MSH como control negativo y 200 µM o 500 µM de arbutina-, que es un conocido agente blanqueador de la piel, y el grupo tratado con α -MSH como control positivo. A partir de la absorbancia a 450 nm, se determinó la actividad tirosinasa (pliegue). La actividad tirosinasa determinada (pliegue) se muestra en la FIG. 2. Como se muestra en la FIG. 2, se confirmó que la actividad tirosinasa se inhibía mediante la adición del péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

(3) Examen del efecto inhibidor sobre la expresión de genes asociados a la producción de melanina

Efecto inhibidor del péptido de SEQ ID NO: 1 sobre los genes asociados a la producción de melanina.

En detalle, se sembró una célula de melanoma de ratón B16F10 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo, seguida de incubación durante 16 horas. A continuación, se sustituyó el medio de cultivo por un medio suplementado con un 2% (v/v) de suero y se añadieron 200 ng/mL de α -MSH. Junto con ello, el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a una concentración de 1 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM o 160 µM, respectivamente, seguido de una incubación de 72 horas. Se extrajeron los ARNm de las células cultivadas, y los ARNm extraídos se transcribieron inversamente utilizando un kit de síntesis de ADNc y una mezcla de PCR (Intron, Corea), sintetizando así el ADNc, respectivamente. A continuación, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cada ADNc y los pares de cebadores Rab27a, Melanophilin (Mlph), miosina VA, MITF, tirosinasa o TRP1. Además, se utilizaron un control, un control negativo y un control positivo de la misma manera que en el Ejemplo 2.(1), y las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados en este caso son las que figuran en la Tabla 3, dada a continuación.

[Tabla 3]

Cebador		Secuencia de nucleótidos (5'→3')	SEQ ID NO:
Rab27a	Directo	GAAAATAGCGCCAAGCACCC	2
	Inverso	CCTCTTTCACCTGCCCTCTGG	3
Mlph	Directo	ACGATGTCAGGGGCAAACAT	4
	Inverso	CTCCTCTGTGTCAGCACTGG	5
Miosina VA	Directo	TTCTACATTGTGGGCGCCAT	6
	Inverso	TCCTCCAGGTTGGTCAATC	7
MITF	Directo	CCAGCCTGGCGATCATGTCAT	8
	Inverso	GGTCTGGACAGGAGTTGCTG	9
Tirosinasa	Directo	GGCCAGCTTTCAGGCAGAGG	10
	Inverso	TGGTGCTTCATGGGCAAAAT	11
TRP1	Directo	TCTGTGAAGGTGTGCAGGAG	12
	Inverso	CCGAAACAGTGGAAGGTT	13
GAPDH	Directo	GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG	14
	Inverso	CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGT	15

Los cambios en la expresión determinados a partir de los resultados de la amplificación por PCR se muestran en la FIG. 3. Como se muestra en la FIG. 3, se confirmó que la expresión de Rab27a, Mlph, miosina VA, MITF, tirosinasa y TRP1, que son genes asociados a la producción de melanina, se inhibía mediante la adición del péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

(4) Examen del efecto inhibidor sobre la expresión de las proteínas asociadas a la producción de melanina

Se examinó el efecto inhibidor del péptido de SEQ ID NO: 1 sobre las proteínas asociadas a la producción de melanina.

En detalle, se sembró una célula de melanoma de ratón B16F10 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo, seguida de incubación durante 16 horas. A continuación, se sustituyó el medio de cultivo por un medio suplementado con un 2% (v/v) de suero y se añadieron 200 ng/mL de α -MSH. Junto con ello, el péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a una concentración de 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M o 160 μ M, respectivamente, seguido de una incubación durante 72 horas. Posteriormente, las células cultivadas se lisaron y se sometieron a inmunotransferencia utilizando anticuerpos (todos disponibles en Santacruz Biotechnology, EE.UU.) contra Mlph, Rab27a, tirosinasa (TYR) o MITF. Además, se utilizaron un control, un control negativo y un control positivo de la misma manera que en el Ejemplo 2.(1).

Los cambios en la expresión determinados a partir de los resultados de inmunotransferencia se muestran en la FIG. 4. Como se muestra en la FIG. 4, se confirmó que la expresión de Mlph, Rab27a, TYR y MITF, que son proteínas asociadas a la producción de melanina, se inhibía mediante la adición del péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En conjunto, los resultados experimentales anteriores indican que el péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 según una realización tiene eficacia blanqueadora de la piel.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido consistente en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
2. Péptido de la reivindicación 1, en el que el N-terminal del péptido está unido con un grupo protector cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluoreonilmetoxycarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y un polietilenglicol (PEG).
3. Péptido de la reivindicación 1, en el que el C-terminal del péptido está unido con un grupo protector cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un grupo amino (-NH₂) y un grupo azida (-NHNH₂).
4. Péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido presenta una cualquiera o más características seleccionadas de entre las siguientes:
 - (a) Inhibición de la producción de melanina;
 - (b) inhibición de la actividad de la tirosinasa; y
 - (c) inhibición de la expresión de Rab27a, melanofilina (Mlph), miosina VA, factor de transcripción inductor de melanocitos (MITF), tirosinasa o proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP1).
5. Una composición cosmética blanqueadora de la piel que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como ingrediente activo.
6. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad de hiperpigmentación, la composición farmacéutica que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como ingrediente activo.
7. Composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 6, en la que la enfermedad de hiperpigmentación es melasma, pecas, lentigo, mancha, lentigo senil o lentigos solares.
8. Un procedimiento cosmético para blanquear la piel, el procedimiento comprende aplicar, a la piel de un individuo, una composición cosmética que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como ingrediente activo.
9. Una composición farmacéutica que comprende un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
10. Un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en medicina.

FIG. 1

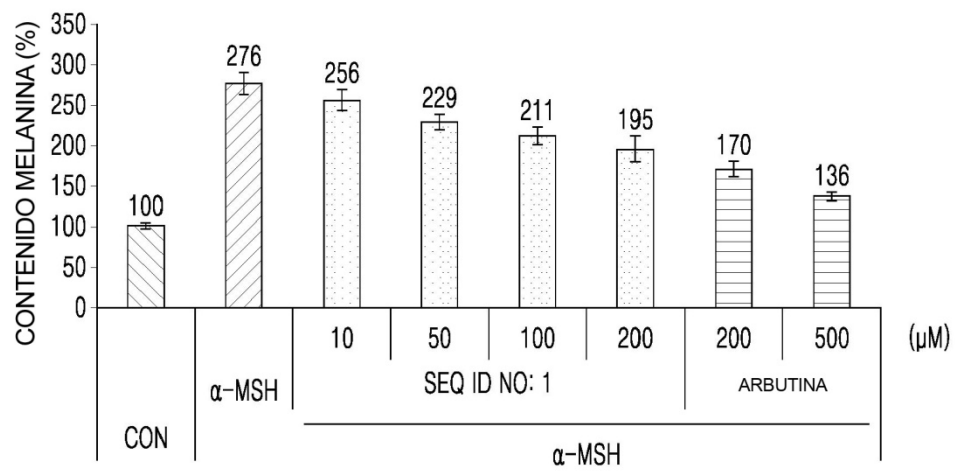


FIG. 2

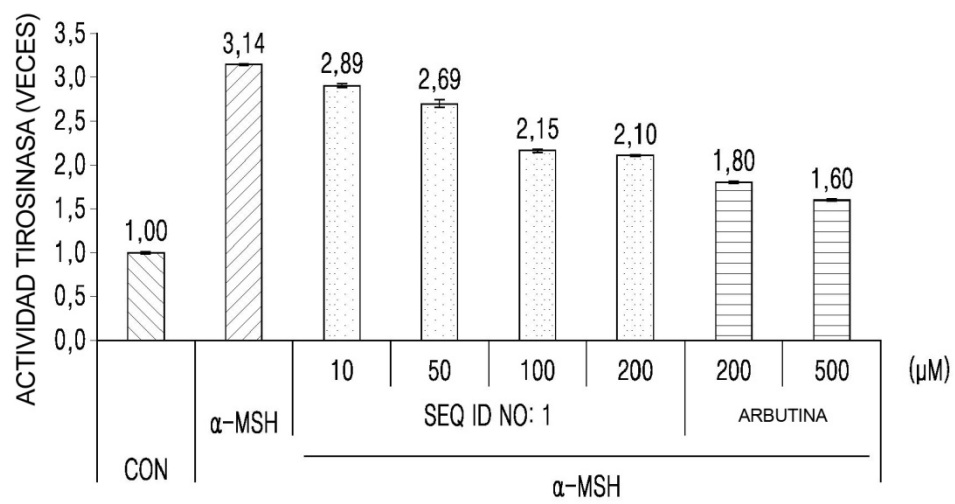


FIG. 3

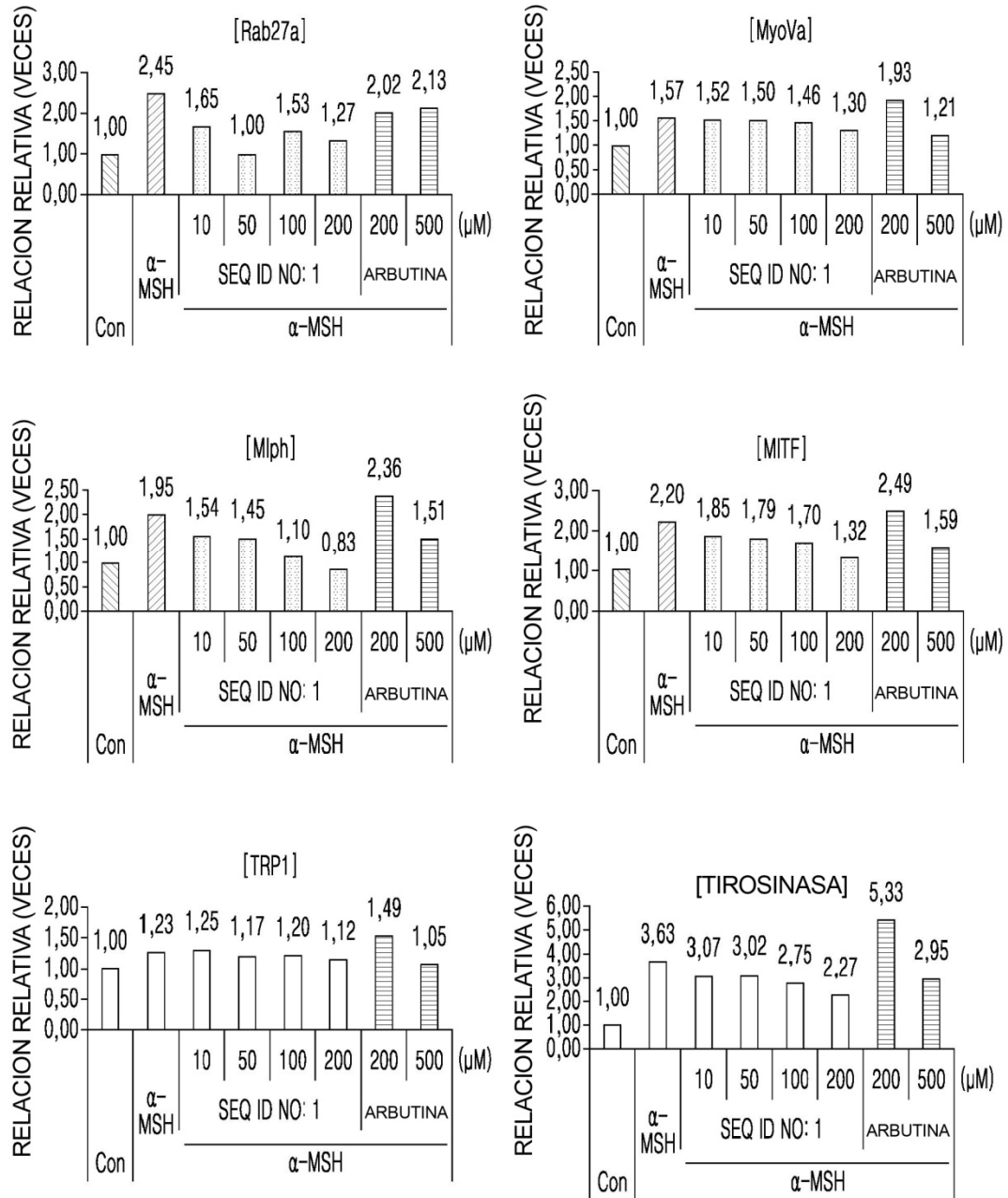


FIG. 4

