

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 937 058**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2019** **PCT/KR2019/013266**
87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2021** **WO21033831**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2019** **E 19930166 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2023** **EP 3800193**

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

30 Prioridad:

20.08.2019 KR 20190101880

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2023

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;
LEE, EUNG JI y
KIM, JAN DI

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 937 058 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptido que tiene actividad blanqueadora de la piel y uso del mismo

5 Campo técnico

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

10 Antecedentes de la técnica

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

Los pigmentos que afectan el color de la piel incluyen la melanina, el melanoide, el caroteno, la hemoglobina, el carotenoide, etc., y diversos colores de 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 en concreto, el color de la piel está determinado por la cantidad y distribución de la melanina. La melanina se produce en unas células llamadas melanocitos, situadas bajo la epidermis de la piel, y es transferida a y expulsada del estrato córneo 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 solo se atribuye a la cantidad, tipo y distribución de la melanina.

En la piel, la tirosina se convierte en DOPA mediante una enzima del cuerpo humano llamada tirosinasa, y una serie de procesos de oxidación producen finalmente melanina, que es un polímero marrón oscuro. Cuando se produce más melanina de la necesaria, puede producirse hiperpigmentación tal como melasma, pecas, manchas, etc., que son resultados cosméticamente malos. Recientemente, la población que disfruta del ocio ha aumentado y más personas disfruta de actividades al aire libre y, por tanto, existe una creciente demanda para prevenir la pigmentación por melanina provocada por los rayos ultravioleta.

Con estos antecedentes técnicos, se han realizado diversos estudios sobre el desarrollo de un agente blanqueador que prevenga 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 europea N.º EP 10-2019-009722; Publicación de Solicitud de Patente Europea EP-A-3 412 275), pero aún no se han obtenido resultados satisfactorios.

Descripción de las realizaciones

40 Problema técnico

El alcance de la invención queda definido por el conjunto de reivindicaciones adjunto. Un aspecto proporciona un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Otro aspecto proporciona una composición blanqueadora de la piel que incluye el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 como principio activo.

Aún otro aspecto proporciona una composición cosmética que incluye la composición blanqueadora de la piel.

Aún otro aspecto proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de hiperpigmentación por melanina, incluyendo la composición farmacéutica la composición blanqueadora de la piel.

Otros objetos y ventajas de la presente divulgación se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones, las reivindicaciones adjuntas y los dibujos adjuntos. Dado que los expertos en la materia o en una técnica similar pueden reconocer e inferir suficientemente los contenidos que no se describen en la presente memoria descriptiva, se omitirá la descripción detallada de los mismos.

Solución al problema

Cada descripción y realización divulgada en la presente solicitud puede aplicarse a otras descripciones y realizaciones. Es decir, todas las combinaciones de diversos elementos divulgados en la presente solicitud entran dentro del alcance de la presente solicitud. Además, el alcance de la presente solicitud no está limitado por la descripción específica descrita a continuación.

Un aspecto proporciona un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Como se usa 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 se puede preparar de acuerdo con un método de síntesis química conocido en la técnica, en particular, técnicas de síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, *et al.*, Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) o técnicas de síntesis en fase líquida (patente de Estados Unidos N.º 5.516.891). Los presentes inventores han realizado intensos esfuerzos para desarrollar un péptido que tenga una actividad biológicamente eficaz y, como resultado, han identificado el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. En este caso, la actividad biológicamente eficaz puede presentar una o más características seleccionadas de (a) inhibición de la producción de melanina; (b) inhibición de la actividad de tirosinasa; y (c) inhibición de la expresión de Rab27a, Mlph, miosina VA, MITF, tirosinasa o TRP1. Por lo tanto, el péptido puede usarse para blanquear la piel y para prevenir o tratar una enfermedad de hiperpigmentación por melanina.

El péptido se puede unir con un grupo protector en el extremo N o C del mismo para obtener estabilidad química, propiedades farmacológicas potenciadas (semivida, absorbencia, título, potencia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, amplio espectro de actividad biológica) y antigenicidad reducida. En una realización específica, el extremo N del péptido puede unirse a cualquier grupo protector seleccionado del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenilmetoxycarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo, un grupo butoxycarbonilo, un grupo aliloxycarbonilo y un polietilenglicol (PEG); y/o el extremo C del péptido puede estar unido a cualquier grupo protector seleccionado del grupo que consiste en un grupo amino (-NH₂), un grupo alquilo terciario y un grupo azida (-NHNH₂). Opcionalmente, el péptido puede incluir además una secuencia de direccionamiento, una etiqueta, un resto marcado o un aminoácido preparado para un fin específico de aumentar la semivida o la estabilidad del péptido.

Como se usa en el presente documento, el término "estabilidad" puede significar no sólo estabilidad *in vivo* que protege al péptido del ataque de las enzimas de escisión de proteínas *in vivo*, sino también estabilidad en almacenamiento (por ejemplo, estabilidad en almacenamiento a temperatura ambiente).

Otro aspecto proporciona una composición cosmética que incluye el péptido que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3 como principio activo; una composición farmacéutica que incluye el péptido que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3 como principio activo; y el uso del péptido que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3 para la preparación de la composición cosmética o farmacéutica, o para su uso como composición cosmética o farmacéutica.

Aún otro aspecto proporciona una composición blanqueadora de la piel que incluye el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 como principio activo.

Entre los términos o elementos mencionados en la descripción del péptido, los que coinciden con los mencionados son los descritos anteriormente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "blanqueamiento de la piel" puede interpretarse no sólo como aclaramiento del tono de la piel mediante la inhibición de la síntesis de pigmentos de melanina, sino también como mejora de la hiperpigmentación de la piel provocada por la luz ultravioleta, las hormonas o la herencia. En este caso, la hiperpigmentación de la piel puede incluir pecas, melasma, manchas negras seniles, manchas marrones, lentigo, etc., pero sin limitarse a ello.

Como se usa en el presente documento, la expresión "mejorar" puede significar todas las acciones que al menos reducen un parámetro relacionado con la afección que se alivia o trata, por ejemplo, el grado de un síntoma.

Los péptidos funcionales existentes, a pesar de su actividad biológica eficaz, tienen la desventaja de que no entran de forma eficaz en los tejidos o células diana debido a su propio tamaño o se eliminan en el cuerpo en poco tiempo debido a la corta semivida. Por lo contrario, la composición blanqueadora de acuerdo con una realización incluye el péptido que consiste en 10 aminoácidos o menos como principio activo y, por lo tanto, el principio activo tiene una excelente tasa de penetración en la piel. Por ejemplo, cuando se aplica tópicamente sobre la piel, la composición puede presentar un efecto blanqueador de la piel eficaz.

De acuerdo con una realización, el péptido puede inhibir significativamente la producción de melanina y la actividad de tirosinasa. Además, el péptido puede inhibir la expresión de Rab27a, Mlph, miosina VA, MITF, tirosinasa o TRP1, que es un factor asociado a la producción de melanina. Por lo tanto, el péptido se puede usar como principio activo de una composición cosmética blanqueadora de la piel.

Aún otro aspecto proporciona una composición cosmética blanqueadora de la piel que incluye el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 como principio activo.

Entre los términos o elementos mencionados en la descripción del péptido, los que coinciden con los mencionados son los descritos anteriormente.

La composición cosmética puede incluir una cantidad cosméticamente eficaz del péptido; y/o un vehículo cosméticamente aceptable, pero sin limitarse a ello.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad cosméticamente eficaz" significa una cantidad suficiente para lograr la eficacia blanqueadora de la piel de la composición cosmética.

Una relación en peso del péptido y el vehículo cosméticamente aceptable puede ser, por ejemplo, 500:1 a 1:500, y por ejemplo, la relación en peso 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,
10 200:1 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 ello.

La composición cosmética se puede preparar en cualquier formulación preparada comúnmente en la técnica y, por ejemplo, puede formularse en una solución, una suspensión, una emulsión, una pasta, un gel, una crema, una loción,
15 un polvo, un jabón, un limpiador que contiene tensioactivos, aceite, una base en polvo, una base en emulsión, una base de cera, una pulverización, etc., pero sin limitarse a ello. Por ejemplo, la composición cosmética se puede preparar en la formulación de una loción suavizante, una loción nutritiva, una crema nutritiva, una crema para masajes, una esencia, una crema para los ojos, una crema limpiadora, una espuma limpiadora, agua limpiadora, una compresa, una pulverización, un polvo, etc.

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

25 Cuando la formulación de la composición cosmética sea en polvo o en pulverización, puede usarse lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio o polvo de poliamida como de vehículo. Por ejemplo, en el caso de una pulverización, puede incluirse además un propulsor tal como clorofluorohidrocarburo, propano/butano o dimetil éter.

30 Cuando la formulación de la composición cosmética sea una solución o una emulsión, puede utilizarse como componente de vehículo un disolvente, un agente solubilizante o un agente emulsionante. Por ejemplo, se puede incluir 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. Cuando la formulación de la composición cosmética sea una pasta,

35 como componente de vehículo, puede utilizarse un diluyente líquido tal como agua, etanol o propilenglicol, un agente de suspensión tal como alcohol isostearílico etoxilado, éster de sorbitol polioxietilenado y éster de sorbitán polioxietilenado, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar, tragacanto, etc.

40 Cuando la formulación de la composición cosmética sea un limpiador que contiene tensioactivos, puede usarse como un componente de vehículo sulfato de alcohol alifático, éter sulfato de alcohol alifático, monoéster del ácido sulfosuccínico, isetionato, un derivado de imidazolio, metiltaurato, sarcosinato, éter sulfato de amida de ácidos grasos, alquilamidobetaina, alcohol alifático, glicéridos de ácidos grasos, dietanolamida de ácidos grasos, aceite vegetal, un derivado de lanolina, éster de ácido graso de glicerol etoxilado, etc.

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

50 Aún otro aspecto proporciona un método para blanquear la piel, incluyendo el método la aplicación, a la piel de un individuo, de la composición cosmética que incluye el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 como principio activo.

Entre los términos o elementos mencionados en la descripción de la composición cosmética, los que coinciden con los mencionados son los descritos anteriormente.

55 Como se usa en el presente documento, los términos "aplicar", "administrar" y "extender" pueden usarse indistintamente y pueden significar al menos la localización parcial de la composición de acuerdo con una realización en un sitio deseado, o la colocación de la composición de acuerdo con una realización en un individuo a través de una vía de administración.

60 Aún otro aspecto proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de hiperpigmentación por melanina, incluyendo la composición farmacéutica el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 como principio activo.

65 Entre los términos o elementos mencionados en la descripción del péptido, los que coinciden con los mencionados son los descritos anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "prevenir" se refiere a todas las acciones que inhiben o retrasan la aparición de una enfermedad mediante la administración de la composición.

5 Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a cualquier forma de tratamiento que proporcione a un individuo que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad efectos que incluyen mejorar 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.

10 El término "individuo" significa un sujeto que necesita tratamiento de una enfermedad, y más específicamente, un mamífero, tal como un ser humano, o un primate no humano, un ratón, un perro, un gato, un caballo y una vaca.

15 La "enfermedad de hiperpigmentación por melanina", que es una enfermedad a prevenir o tratar mediante la composición farmacéutica, puede referirse colectivamente a una enfermedad en la que el pigmento melanina se produce en exceso y se deposita en la piel. Por ejemplo, la enfermedad puede ser melasma, pecas, lentigo senil o lentigos solares, pero sin limitarse a ello.

20 La composición farmacéutica puede incluir una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable, pero sin limitarse a ello.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" puede significar una cantidad suficiente para lograr la eficacia de la composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de hiperpigmentación por melanina.

Una relación en peso del péptido y el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, 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 ello.

30 El vehículo farmacéuticamente aceptable se usa comúnmente en la preparación y puede incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica, 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, aceite mineral, etc., pero sin limitarse a ello. Se describen detalladamente vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed, 1995).

35 La composición farmacéutica puede incluir además un lubricante, un agente humectante, un edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante, etc., además de los componentes anteriores, pero sin limitarse a ello.

40 La composición farmacéutica se puede administrar 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 sin limitarse a ello.

45 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 sin limitarse a ello. La composición farmacéutica se puede prescribir de diversas maneras dependiendo de factores tales como el método de formulación, el modo de administración, una edad del paciente, peso, sexo, patologías, alimentación, momento de administración, vía de administración, tasa de excreción y sensibilidad de respuesta.

50 La composición farmacéutica se puede preparar en una forma de dosis unitaria o se puede preparar en un recipiente multidosis formulando la composición farmacéutica utilizando un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con un método, lo que pueden llevar a cabo fácilmente los expertos en la materia a que se refiere la presente divulgación.

55 La formulación puede ser una forma de solución, suspensión o emulsión en un medio oleoso o acuoso, o puede ser una forma de extracto, polvo, gránulo, comprimido o cápsula, y puede incluir además un agente de dispersión y/o un estabilizador. Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

60 Aún otro aspecto proporciona un método de prevención o tratamiento de una enfermedad de hiperpigmentación por melanina, incluyendo el método administrar, a un individuo, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 como principio activo.

65 Entre los términos o elementos mencionados en la descripción de la composición farmacéutica, los que coinciden con

los mencionados son los descritos anteriormente.

Aún otro aspecto proporciona una composición alimenticia blanqueadora de la piel que incluye el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 como principio activo.

Entre los términos o elementos mencionados en la descripción del péptido, los que coinciden con los mencionados son los descritos anteriormente.

El contenido del péptido como principio activo en la composición alimenticia se puede seleccionar apropiadamente, sin limitación, dependiendo de la forma del alimento, el uso del mismo, etc. Por ejemplo, el péptido se puede añadir en una cantidad del 0,01 % en peso al 15 % en peso, basado en el peso total del alimento. Por ejemplo, el péptido se puede añadir en una proporción de 0,02 g a 10 g, o de 0,3 g a 1 g, basado en 100 ml de una composición de bebida saludable.

Efectos ventajosos de la divulgación

Un péptido de acuerdo con un aspecto inhibe significativamente la producción de melanina y la actividad de tirosinasa, así como la expresión de un factor asociado con la producción de melanina, presentando así excelentes efectos blanqueadores de la piel.

El péptido de acuerdo con un aspecto inhibe significativamente la producción de melanina y la actividad de tirosinasa, así como la expresión de un factor asociado con la producción de melanina, aplicándose así para aliviar o mejorar una enfermedad de hiperpigmentación por melanina en la piel.

Por consiguiente, el péptido de acuerdo con un aspecto se puede aplicar como un principio activo para una composición blanqueadora de la piel o una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad de hiperpigmentación por melanina.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra los resultados de examinar la reducción de la producción de melanina, después de añadir un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a células B16F10;

La FIG. 2 muestra los resultados de examinar la reducción de la producción de melanina, después de añadir un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a células B16F10;

La FIG. 3 muestra los resultados de examinar la reducción de la producción de melanina, después de añadir un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 a células B16F10;

La FIG. 4 muestra los resultados de examinar la reducción de la actividad de tirosinasa, después de añadir el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a células B16F10;

La FIG. 5 muestra los resultados de examinar la reducción de la actividad de tirosinasa, después de añadir el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a células B16F10;

La FIG. 6 muestra los resultados de examinar la reducción de la actividad de tirosinasa, después de añadir el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 a células B16F10;

La FIG. 7 muestra los resultados de examinar la inhibición de la expresión de Rab27a, miosina VA, MITF, TRP1 y tirosinasa, que son genes asociados con la producción de melanina, después de añadir el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a células B16F10;

La FIG. 8 muestra los resultados de examinar la inhibición de la expresión de Mlph, MITF y tirosinasa, que son genes asociados con la producción de melanina, después de añadir el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a células B16F10;

La FIG. 9 muestra los resultados de examinar la inhibición de la expresión de Rab27a, miosina VA, Mlph, MITF, tirosinasa y TRP1, que son genes asociados con la producción de melanina, después de añadir el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 a células B16F10;

La FIG. 10 muestra los resultados de examinar la inhibición de la expresión de Mlph, tirosinasa y MITF, que son proteínas asociadas con la producción de melanina, después de añadir el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a células B16F10;

La FIG. 11 muestra los resultados de examinar la inhibición de la expresión de tirosinasa, TRP-1 y MITF, que son proteínas asociadas con la producción de melanina, después de añadir el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a células B16F10; y

La FIG. 12 muestra los resultados de examinar la inhibición de la expresión de Mlph, Rab27a, tirosinasa y MITF, que son proteínas asociadas con la producción de melanina, después de añadir el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 a células B16F10.

Modo de la divulgación

En lo sucesivo en el presente documento, la presente divulgación se describirá con más detalle con referencia a las realizaciones. Sin embargo, estas realizaciones tienen un fin únicamente ilustrativo y el alcance de la presente divulgación no se limita a estas realizaciones.

Ejemplo 1. Síntesis de péptido

Se sintetizó un péptido que tenía una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 descrita en la siguiente [Tabla 1] usando un sintetizador de péptidos automatizado (Milligen 9050, Millipore, EE.UU.) y se aisló el péptido puro utilizando una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa 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 (extremos N a C)
1	LRKRKRRFWVL
2	FHFIPNW
3	WPFLRP

Ejemplo 2. Examen del efecto inhibidor sobre la producción de melanina

Se sembraron células de melanoma de ratón B16F10 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo, seguido de incubación durante 16 horas. Después de ello, el medio de cultivo se sustituyó por un medio complementado con suero al 2 %, y luego se le añadieron 200 ng/ml de hormonas estimulantes de melanocitos α (α -MSH, forma siglada de *α -melanocyte-stimulating hormones*) para estimular la producción de melanina, junto con cada péptido de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 o 3 a una concentración de 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M o 200 μ M, respectivamente, seguido de incubación durante 72 horas. Después de ello, las células incubadas se disolvieron en NaOH 1 N y se midió la absorbancia a 450 nm. Además, se utilizó un grupo sin tratar (Con) como control, y se utilizaron solo un grupo tratado con α -MSH como control negativo, y un agente blanqueador de la piel conocido, Arbutina (200 μ M, 500 μ M) y un grupo tratado con α -MSH como control positivo.

Como resultado, como se muestra en las FIGS. 1 a 3, se confirmó que la producción de melanina se redujo de manera dependiente de la concentración mediante la adición del péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 o 3.

Ejemplo 3. Examen del efecto inhibidor sobre la actividad de tirosinasa

Se sembraron células de melanoma de ratón B16F10 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo, seguido de incubación durante 16 horas. Después de ello, se sustituyó el medio de cultivo por un medio complementado con suero al 2 %, y luego se le añadieron 200 ng/ml de α -MSH, junto con cada péptido de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 o 3 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 incubación durante 72 horas. La placa de 6 pocillos se colocó en hielo y luego se lavó con PBS frío. Las células se lisaron añadiendo un tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,8, tampón de lisis) que contenía tritón X-100 al 1 %. Después de ello, las células de la placa de pocillos se rasparon y se recogieron en un tubo de 1,5 ml, seguido de agitación vorticial. Se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 minutos para obtener un sobrenadante. Después de ello, se cuantificaron las proteínas en el sobrenadante para ajustar el contenido de proteínas a una cantidad predeterminada. Se le añadió un tampón y se distribuyó un total de 90 μ l de la muestra en una placa de 96 pocillos. Además, se prepararon en la placa una muestra experimental, una muestra blanco y una muestra de control positivo, como se indica a continuación en la Tabla 2.

[Tabla 2]

	Muestra experimental	Muestra blanco	Muestra de control positivo
Muestra	90 μ l	-	-
Tampón	-	90 μ l	90 μ l
Tirosinasa de hongos (0,1 mg/ml)	-	-	10 μ l

Después de ello, se añadieron 20 μ l de L-DOPA 10 mM a cada muestra y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después, se midió la absorbancia a 475 nm. Además, se utilizó un grupo sin tratar (Con) como control, y se utilizaron solo un grupo tratado con α -MSH como control negativo y Arbutina (200 μ M o 500 μ M) y un grupo tratado con α -MSH como control positivo.

Como resultado, como se muestra en las FIG. 4 a 6, se confirmó que se inhibió la actividad de tirosinasa de manera dependiente de la concentración mediante la adición del péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 o 3.

Ejemplo 4. Examen del efecto inhibidor sobre la expresión de genes asociados a la producción de melanina

Se sembraron células de melanoma de ratón B16F10 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo, seguido de incubación durante 16 horas. Después de ello, se sustituyó el medio de cultivo por un medio

complementado con suero al 2 %, y luego se le añadieron 200 ng/ml de α -MSH, junto con cada péptido de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 o 3 a una concentración de 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M o 200 μ M, respectivamente, seguido de incubación durante 72 horas. Los ARNm se extrajeron de las células cultivadas y los ARNm extraídos se transcribieron de forma inversa utilizando un kit de síntesis de ADNc y una premezcla de PCR (Intron, Corea), sintetizando así ADNc, respectivamente. Después de ello, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cada ADNc y cebadores para Rab27a, Melanofilina (Mlph), miosina VA, MITF, Tirosinasa y TRP1. Además, se utilizaron un control, un control negativo y un control positivo de la misma manera que en el Ejemplo 2, y las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en el presente documento son las mismas que en la Tabla 3 a continuación.

[Tabla 3]

Nombre del cebador		Secuencia (5'->3')	SEQ ID NO:
Rab27a	directo	GAAAATAGCGCCAAGCACCC	4
	inverso	CCTCTTTCACTGCCCTCTGG	5
Mlph	directo	ACGA TGTCAGGGGCAAACA T	6
	inverso	CTCCTCTGTGTCAGCACTGG	7
miosina VA	directo	TTCTACATTGTGGGCGCCAT	8
	inverso	TCCTCCAGGTTGGTCAATCG	9
MITF	directo	CCAGCCTGGCGATCATGTCAT	10
	inverso	GGTCTGGACAGGAGTTGCTG	11
Tirosinasa	directo	GGCCAGCTTTCAGGCAGAGG	12
	inverso	TGGTGCTTCATGGGCAAAT	13
TRP1	directo	TCTGTGAAGGTGTGCAGGAG	14
	inverso	CCGAAACAGAGTGGAAGGTT	15
GAPDH	directo	GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATT G	16
	inverso	CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGA GT	17

Como resultado, como se muestra en la FIG. 7, se confirmó que la expresión de Rab27a, miosina VA, MITF, TRP1 y tirosinasa, que son genes asociados a la producción de melanina, fue inhibida por la adición del péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Además, como se muestra en la FIG. 8, se confirmó que la expresión de Mlph, MITF y tirosinasa, que son genes asociados a la producción de melanina, fue inhibida por la adición del péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, como se muestra en la FIG. 9, se confirmó que la expresión de Rab27a, miosina VA, Mlph, MITF, Tirosinasa y TRP1, que son genes asociados a la producción de melanina, fue inhibida por la adición del péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

Ejemplo 5. Examen del efecto inhibitor sobre la expresión de una proteína asociada a la producción de melanina

Se sembraron células de melanoma de ratón B16F10 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo, seguido de incubación durante 16 horas. Después de ello, se substituyó el medio de cultivo por un medio complementado con suero al 2 %, y luego se le añadieron 200 ng/ml de α -MSH, junto con cada péptido de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 o 3 a una concentración de 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M o 200 μ M, respectivamente, seguido de incubación durante 72 horas. Después de ello, las células cultivadas se lisaron y luego se sometieron a transferencia de Western usando anticuerpos (santacruz biotechnology, EE.UU.) contra Mlph, Rab27a, Tirosinasa, MITF y TRP-1. Además, se utilizaron un control, un control negativo y un control positivo de la misma manera que en el Ejemplo 2.

Como resultado, como se muestra en la FIG. 10, se confirmó que la expresión de Mlph, Rab27a, Tirosinasa y MITF, que son proteínas asociadas a la producción de melanina, fue inhibida por la adición del péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Además, como se muestra en la FIG. 11, se confirmó que la expresión de la Tirosinasa, TRP-1 y MITF, que son proteínas asociadas a la producción de melanina, fue inhibida por la adición

del péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, como se muestra en la FIG. 12, se confirmó que la expresión de Mlph, Rab27a, Tirosinasa y MITF, que son proteínas asociadas a la producción de melanina, fue inhibida por la adición del péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

- 5 Tomados en conjunto, los resultados experimentales anteriores indican que el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 o 3 de acuerdo con una realización tiene eficacia para blanquear la piel.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
- 5 2. El péptido de la reivindicación 1, en donde el extremo N del péptido está unido a cualquier grupo protector seleccionado del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenilmetoxycarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo, un grupo butoxycarbonilo, un grupo aliloxycarbonilo y un polietilenglicol (PEG).
- 10 3. El péptido de la reivindicación 1, en donde el extremo C del péptido está unido a cualquier grupo protector seleccionado del grupo que consiste en un grupo amino (-NH₂), un grupo alquilo terciario y un grupo azida (-NHNH₂).
4. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido presenta uno o más seleccionados de las siguientes características:
15 (a) inhibición de la producción de melanina;
(b) inhibición de la actividad de tirosinasa; y
(c) inhibición de la expresión de Rab27a, Mlph, miosina VA, MITF, tirosinasa o TRP1.
- 20 5. Una composición blanqueadora de la piel que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como principio activo.
6. Una composición cosmética que comprende la composición blanqueadora de la piel de la reivindicación 5.
- 25 7. Una composición cosmética para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad de hiperpigmentación por melanina, comprendiendo la composición cosmética la composición blanqueadora de la piel de la reivindicación 5.
8. La composición cosmética para el uso de la reivindicación 7, en donde la enfermedad de hiperpigmentación por melanina es melasma, pecas, lentigo senil o lentigos solares.
- 30 9. Un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad de hiperpigmentación por melanina.
- 35 10. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la enfermedad de hiperpigmentación por melanina es melasma, pecas, lentigo senil o lentigos solares.
11. Una composición farmacéutica que comprende un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 40 12. Un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en medicina.

FIG. 1

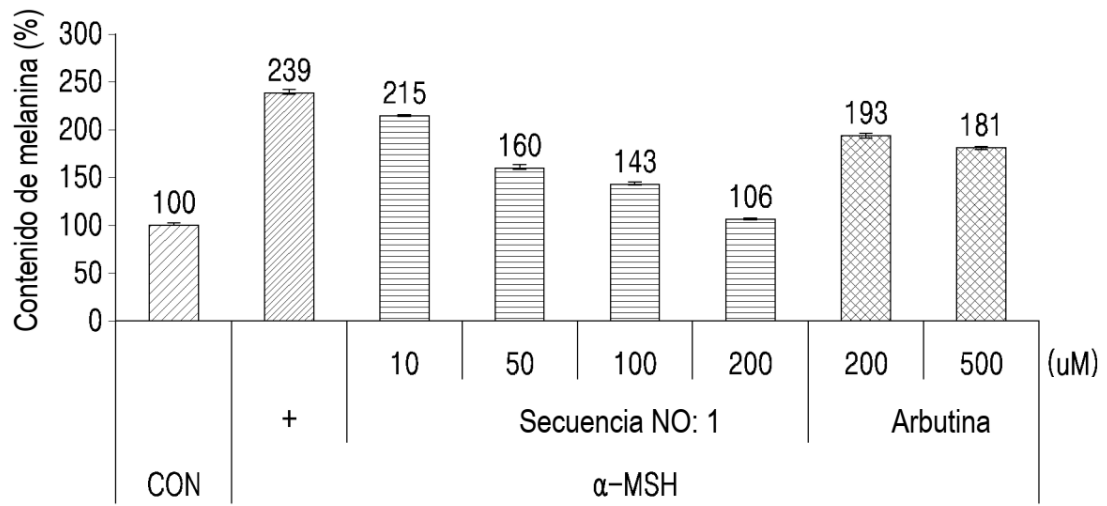


FIG. 2

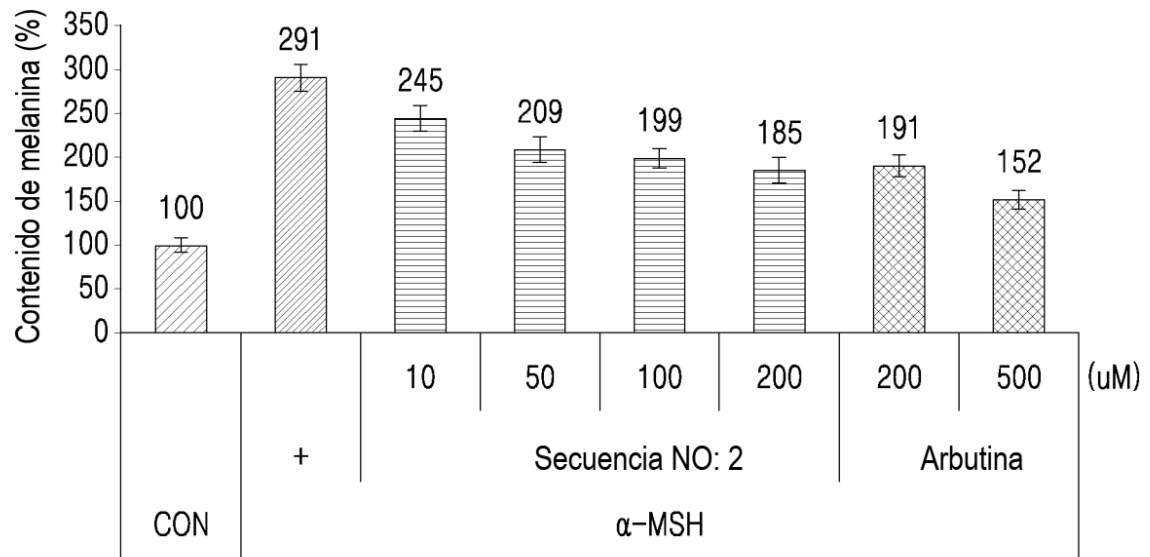


FIG. 3

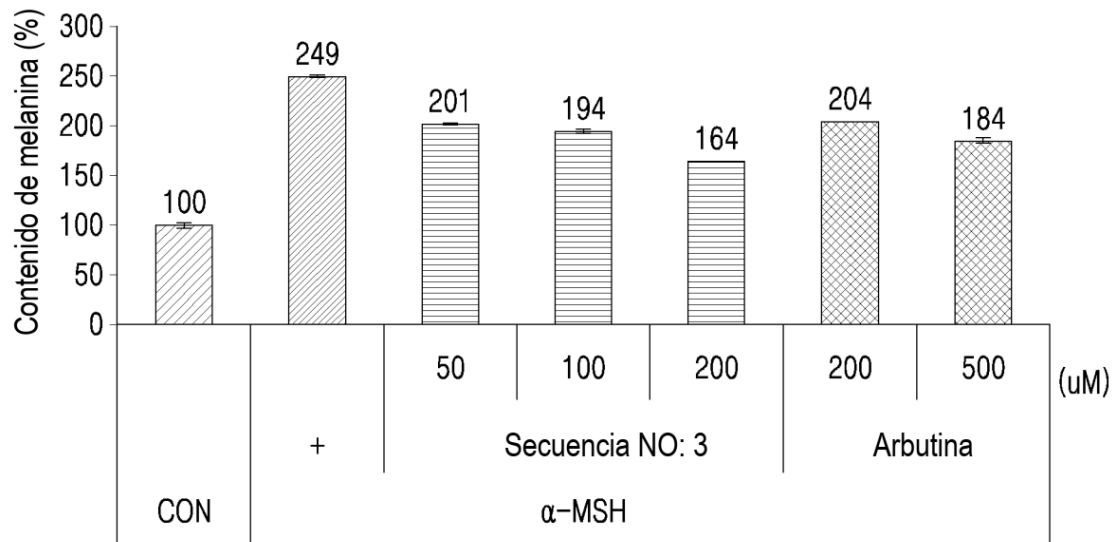


FIG. 4

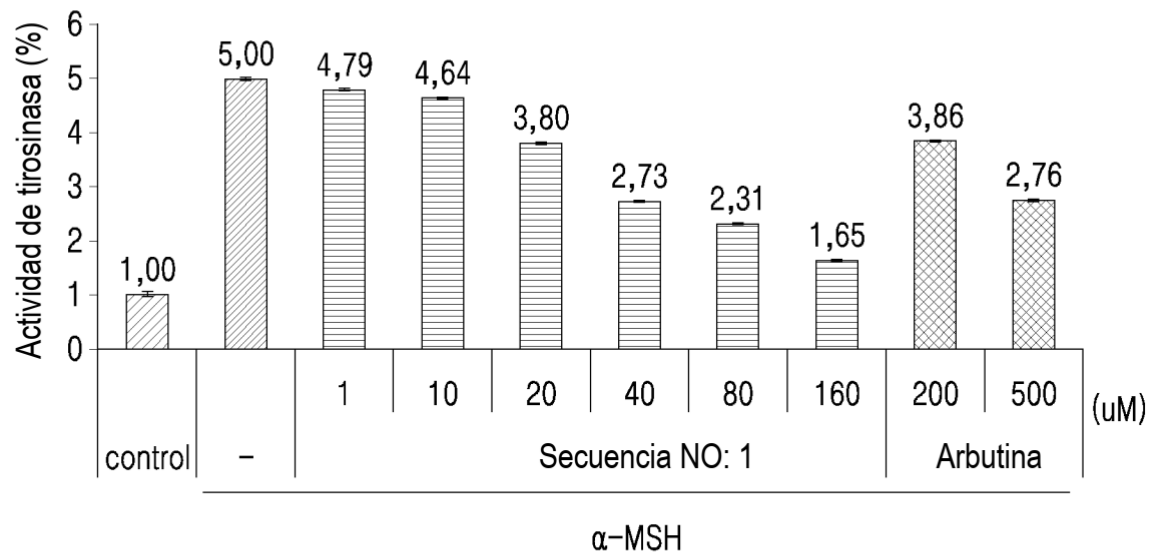


FIG. 5

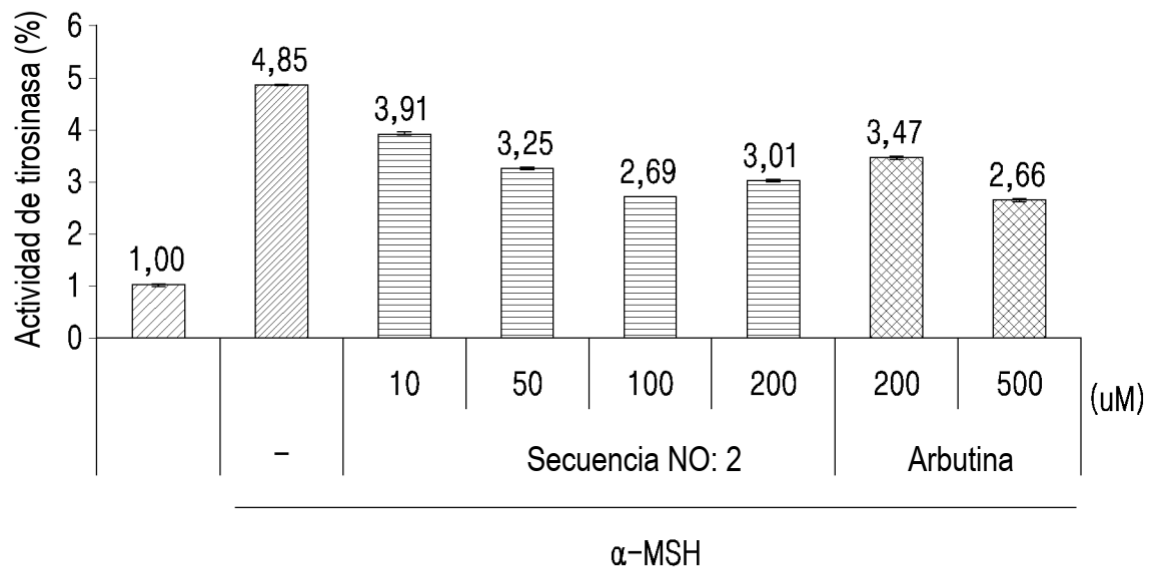


FIG. 6

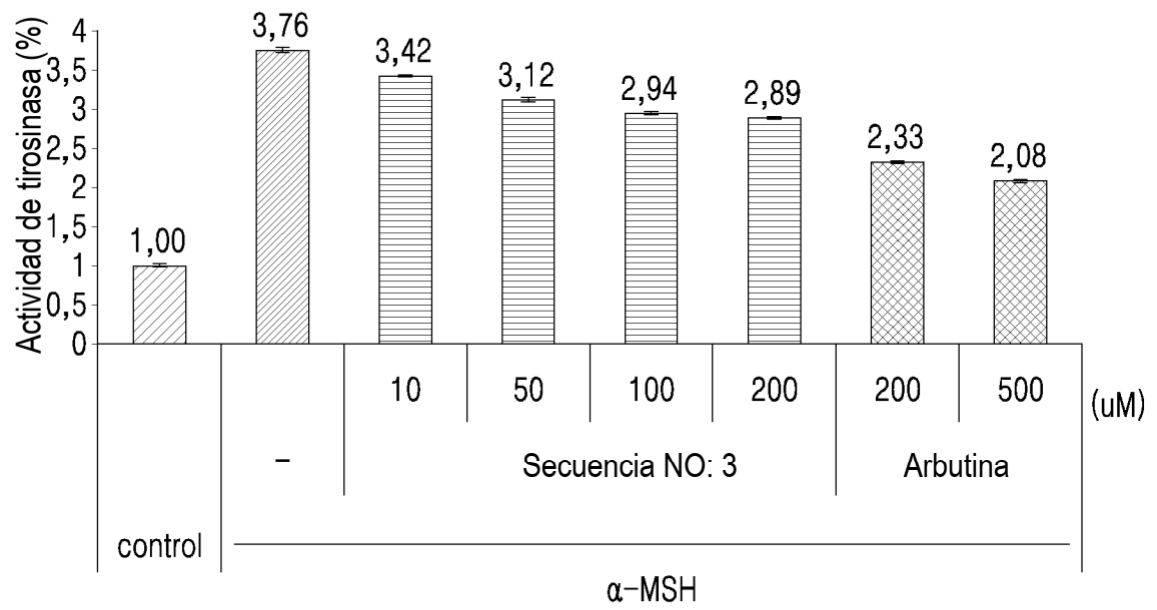


FIG. 7

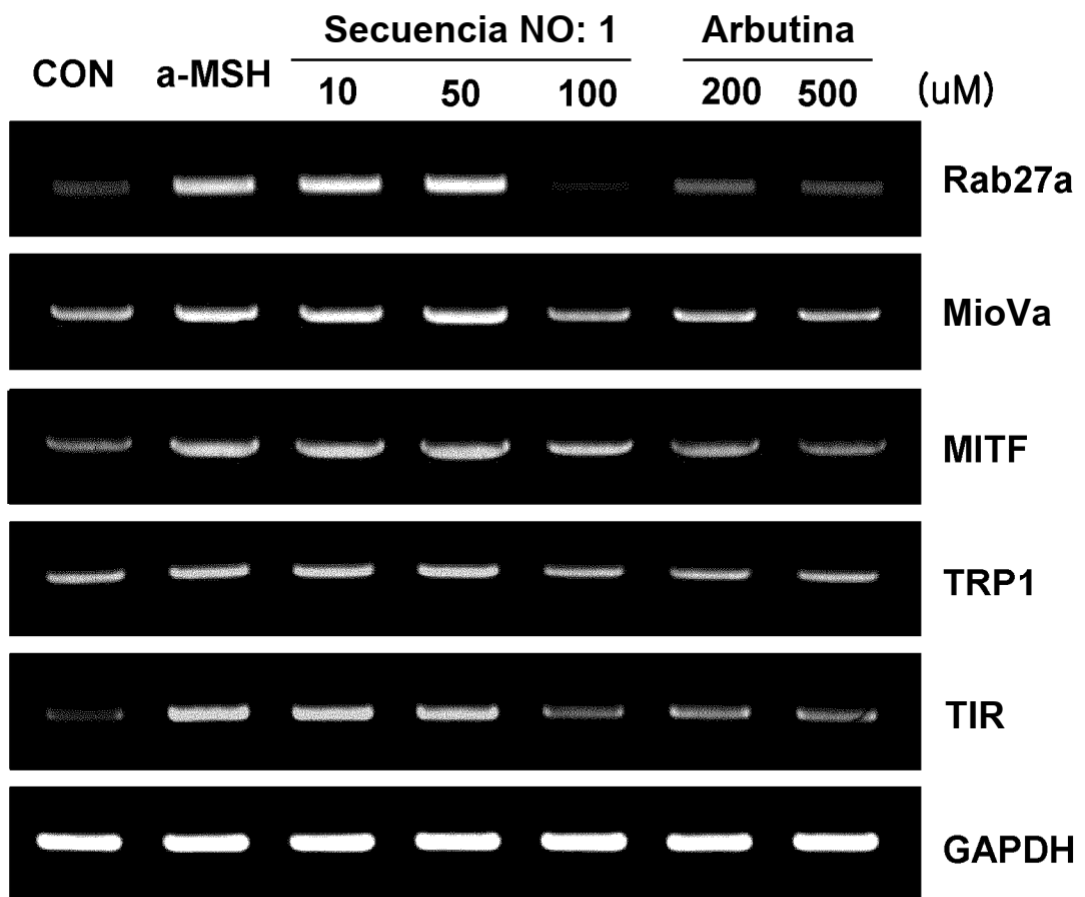


FIG. 8

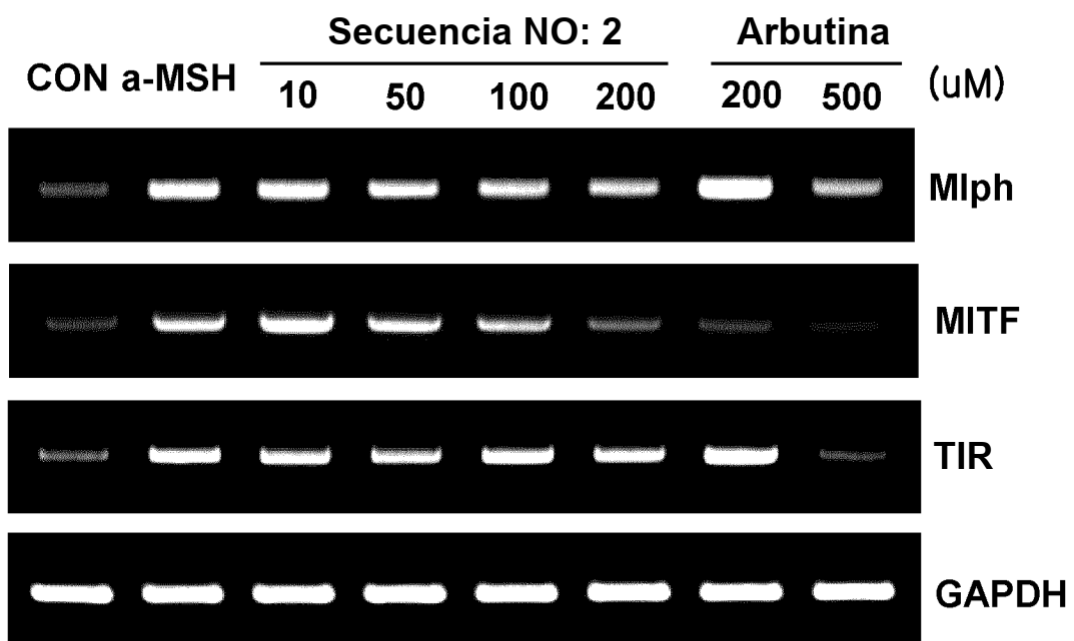


FIG. 9

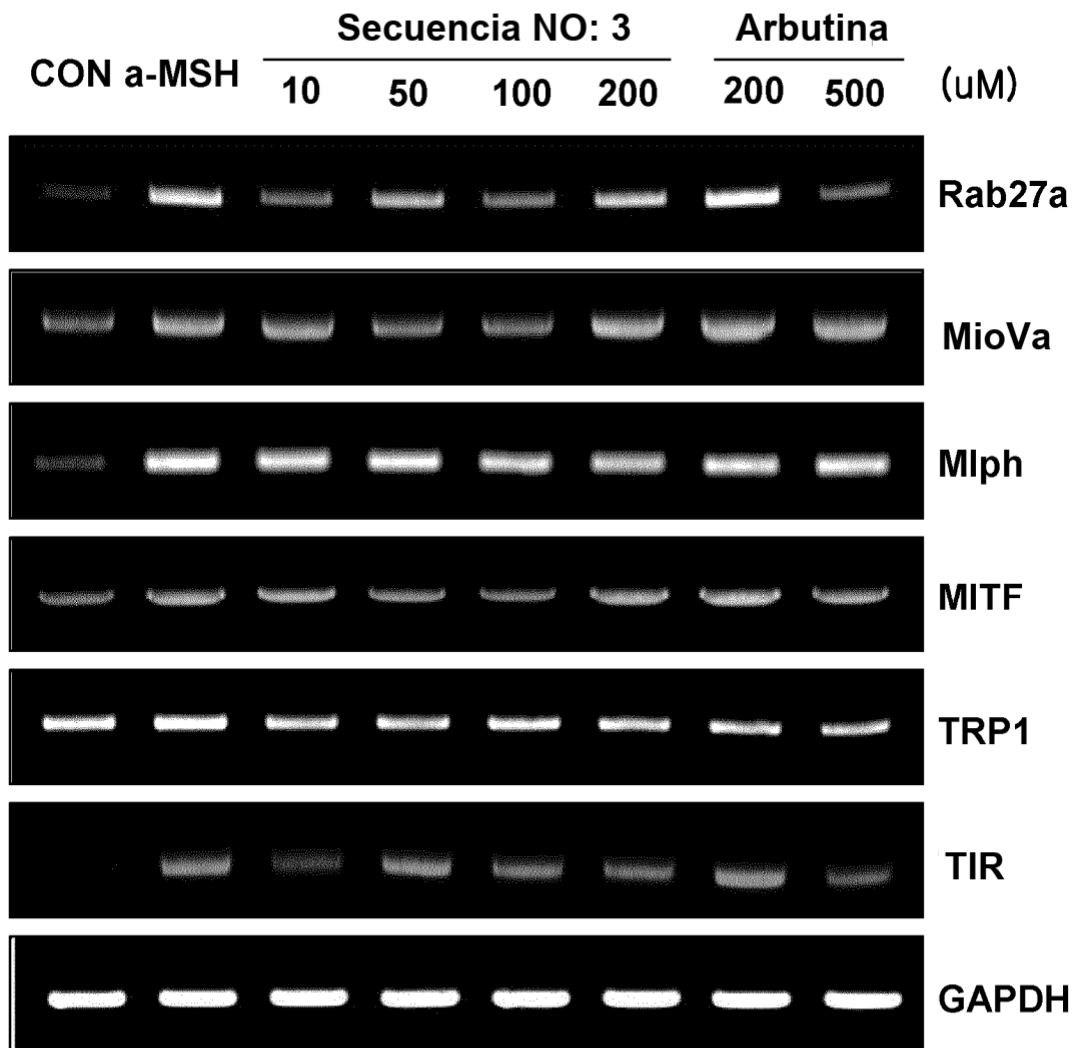


FIG. 10

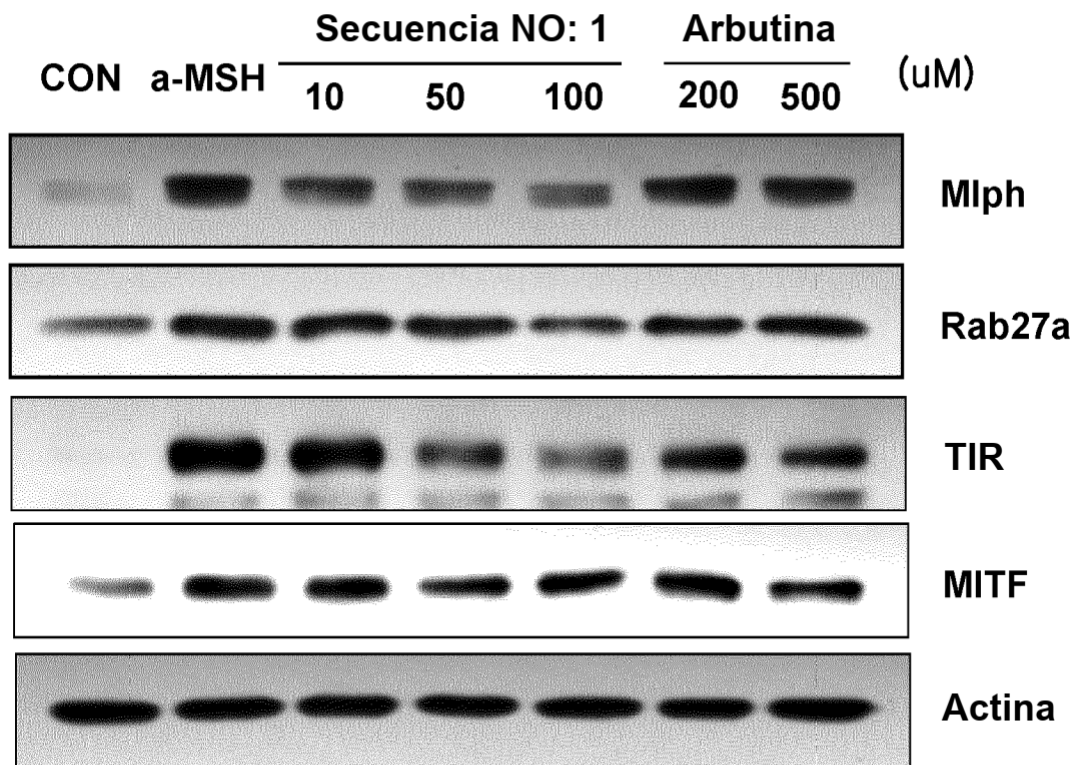


FIG. 11

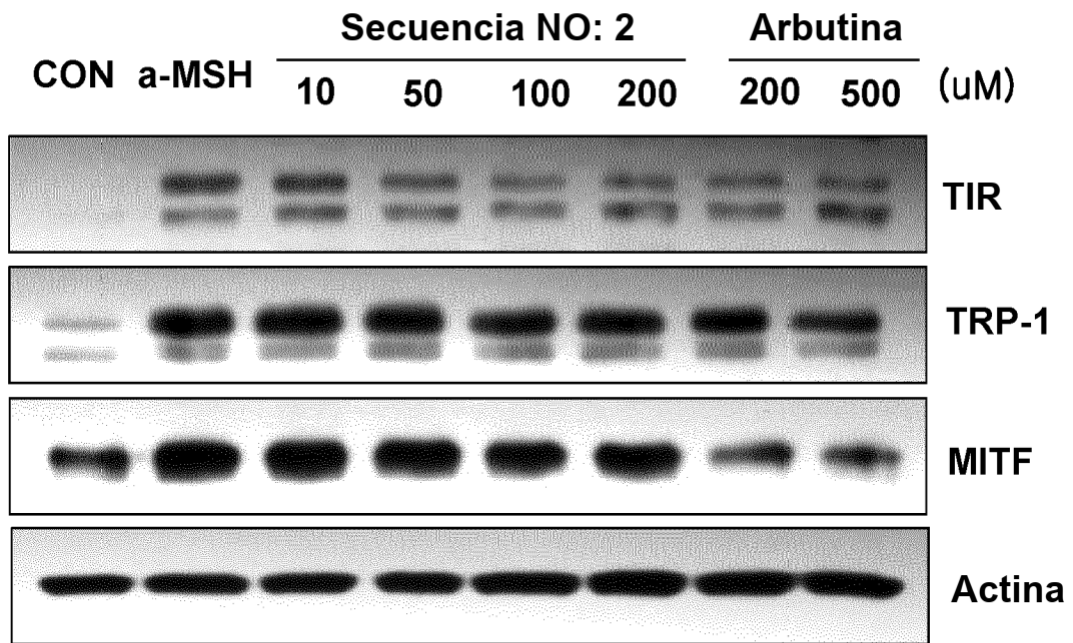


FIG. 12

