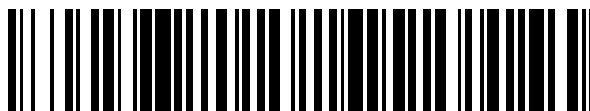


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 020**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 7/00 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2009 E 09849032 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2474555**

54 Título: **Péptido derivado de WNT10 y su uso**

30 Prioridad:

01.09.2009 KR 20090081817

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2015

73 Titular/es:

**CAREGEN CO., LTD. (100.0%)
690-3 Geumjeong-dong
Gunpo-si, Gyeonggi-do 435-050, KR**

72 Inventor/es:

**CHUNG, YOUNG JI;
KIM, EUN MI;
SONG, SANG SU y
CHO, KYOUNG MI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 552 020 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 derivado de WNT10 y su uso

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a un péptido derivado de WNT10, a una composición para mejorar la pérdida del cabello y las dolencias cutáneas usando la misma, y a una composición para tratar un trastorno relacionado con la ruta de transducción de la señal de WNT10 y un trastorno inducido por la proteína DKK-1 usando la misma.

Descripción de la técnica relacionada

- 10 El folículo piloso es un órgano peculiar de la piel de los mamíferos que se desarrolla desde la parte inferior de la epidermis primitiva en capas de la piel más internas. El tapón de células, conocido como folículo o papila dérmica, se encuentra en la base del folículo piloso (Stenn y Paus, *Physiol. Rev.*, 81: 449 (2002)), y la papila es esencial en la circulación normal del folículo piloso (Oliver, *Embryol. Exp. Morph.* 15: 331 (1966); Oliver, *Embryol. Exp. Morph.* 16: 231 (1967)) y en el crecimiento del tallo del cabello. El tallo del cabello está formado por células epiteliales dispuestas en forma de hebra que están compuestas por filamentos de queratina y proteínas que agregan los
- 15 filamentos unidas estrechamente a los anteriores.

- El cabello humano sigue un ciclo de crecimiento con tres fases distintas: fases anágena, catágena, y telógena. El ciclo de crecimiento del cabello está regulado por hormonas o muchos factores de crecimiento. El estrés o malnutrición graves pueden adelantar las fases catágena y telógena, conduciendo a una grave pérdida del cabello (alopecia) (Vladimir A. Botchkarev, *American Journal of Pathology*, 162 (3): 709-712 (2003)). En un modelo de calvicie masculina, los folículos pilosos que están en la frente o en el cráneo son sensibles a los andrógenos, que dan lugar a que los folículos se miniaturicen, dando como resultado por tanto una pérdida del cabello. En resumen, la excesiva secreción de andrógenos activa la 5- α reductasa, que produce testosterona que se va a convertir en dihidrotestosterona (DHT). Posteriormente, la DHT reduce el número de cabellos terminales oscuros gruesos acortando el periodo de crecimiento del cabello y miniaturizando los folículos pilosos, lo que da lugar a la pérdida del
- 20 cabello. Se ha supuesto que aproximadamente un 20% de las mujeres que presentan pérdida de cabello padecen unos pocos trastornos denominados "modelo de calvicie femenina" en el que el cabello frecuentemente se vuelve más fino en la parte superior del cráneo. Además, la pérdida del cabello se amplía con el envejecimiento. Por ejemplo, se puede producir una pérdida grave del cabello debido a diferentes trastornos tales como alopecia cicatricial o dolencias cicatriciales que incluyen quemaduras o lesiones de compresión. Cualquiera que sea la causa,
- 25 aunque se haya potenciado el poder de la mujer en la fuerza de trabajo y el hombre cuide su aspecto, la pérdida de cabello puede tener impactos fisiológicos, sociales y sexuales remarcables así como la pérdida del orgullo y del respeto por uno mismo. Aunque se han usado varios medicamentos para tratar la pérdida del cabello, son demasiado caros o dan lugar a efectos secundarios muy diferentes entre los individuos. Adicionalmente, es necesario tomar estos fármacos de manera constante. En esta línea, uno de sus inconvenientes más graves es que
- 30 se produce la pérdida de cabello al dejar de tomarlos. Mientras tanto, otro desmérito es que sus eficacias y efectos secundarios pueden ser muy diferentes entre individuos.

- Las materias primas utilizadas en productos cosméticos tienen la ventaja de que son baratas, aunque no dan buenos resultados porque están compuestas de componentes derivados de extractos vegetales. Para superar los inconvenientes de la bioestabilidad, eficacia o coste, se ha desarrollado un procedimiento para que los péptidos
- 40 derivados de WNT10 que tienen actividades idénticas al WNT10 natural se puedan producir de forma barata mediante un procedimiento de síntesis química, y un producto nanopeptídico que tiene una eficacia y permeabilidad en la piel superiores utilizando tecnología de nanosomas, en comparación con una proteína completa. El péptido permite inducir la proliferación y la diferenciación de los citoblastos presentes en el folículo piloso de la piel para producir una raíz de cabello que conduzca a desarrollar nuevos folículos pilosos. Además, el péptido permite la activación de la ruta de la señal de la WNT- β -catenina para expresar los genes que inducen el crecimiento del
- 45 cabello incluso en dolencias en las que DKK-1, un gen de pérdida de cabello, inactiva la ruta del WNT10 producido por DHT. Además, el péptido facilita eficazmente la fase anágena durante la cual el crecimiento del cabello está activado, e inhibe potentemente la transición de la fase anágena a la catágena en el ciclo del folículo piloso que se produce por diversos factores ambientales, dando como resultado la inhibición de la pérdida del cabello. Además, el péptido muestra efectos beneficiosos sobre el crecimiento y la salud del cabello normal suministrando nutrientes al
- 50 cabello. Se ha sabido ahora que dos fármacos comerciales (minoxidilo y finasterida) pueden retrasar solo la pérdida del cabello adicional. Sin embargo, no existen actualmente medicamentos que puedan ser útiles para inducir la regeneración de nuevos folículos pilosos en la práctica. Hay comercialmente disponibles en el mercado muchos cosméticos para el cuero cabelludo para evitar la pérdida del cabello, incluyendo por ejemplo: (a) un producto que incluye un extracto vegetal derivado de sófora, pimienta picante, hierbas de Swertia, Morus alba, hojas de morera, ginseng, regaliz, peonía, dedalera, hinojo, cornejo, ajo, y así sucesivamente; (b) una composición que contiene xantinas y hormonas de crecimiento para mejorar no solo el metabolismo celular suprimido por un exceso de dihidrotestosterona (DHT) sino también para facilitar el crecimiento del cabello mediante la inhibición de la pérdida del
- 55 del cabello y la regeneración del cabello inducida por las hormonas del crecimiento; (c) un producto que contiene

minerales, vitaminas y extractos de té verde, romero, artemisa o regaliz, que suministra nutrientes al cuero cabelludo y el cabello para prevenir la pérdida del cabello y promover el crecimiento del cabello; y (d) un producto para un modelo de calvicie masculina que mezcla sustancias tales como vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E, ácido nicotínico, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico, etc. con extractos vegetales, que inhibe las 5- α reductasas para suprimir la producción de DHT durante el metabolismo andrógeno y para ayudar a que se desarrolle el metabolismo del cabello. Sin embargo, apenas influyen sobre la producción de nuevo cabello. Como ejemplo adicional, un grupo de investigación de la Jikei University School of Medicine en Tokio, Japón, ha desarrollado el producto usando ácido corosólico conocido por ser eficaz en la diabetes, que inhibe las 5- α reductasas y presenta un excelente efecto sobre el crecimiento del cabello.

Muchos factores se asocian entre sí durante el crecimiento y la degeneración del cabello. Para la producción de cabello, los presentes investigadores han estudiado factores de crecimiento en serie que tienen una actividad para: (a) estimular la proliferación de queratinocitos, que son los más importantes para la producción de la raíz del cabello; (b) inducir la diferenciación del cabello; (c) suministrar nutrientes en las proximidades del cabello; y (d) activar los factores de crecimiento endotelial vascular. De ellos, el WNT10 derivado de ser humano afecta específicamente al desarrollo del cabello transfiriendo una señal a una célula. La ruta de WNT10 de transducción de la señal se activa mediante una interacción entre la proteína WNT10 secretada y la proteína de Frizzled que es, él mismo, uno de sus receptores. En esta línea, Las proteínas relacionadas con el receptor LDL (LRP5 y LRP6) funcionan como un correceptor (Clin Cancer Res 2007; 13 (14) 15 de julio de, 2007, WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network). Los efectos corriente abajo en la ruta de transducción de la señal de WNT10 incluyen la participación del complejo Axina- β -catenina-GSK3 β mediante la activación de la proteína DVL (Desactivada) Akt (Fukumoto y col., J. Biol. Chem., 276: 17479-17483 (2001)). Posteriormente, GSK3 β se inactiva mediante fosforilación, dando como resultado una inhibición de la fosforilación y la degradación de la β -catenina. Las β -cateninas acumuladas se translocan a un núcleo y a continuación interactúan con los factores de transcripción del factor potenciador linfoide-factor de linfocitos T (LEF-TCF), permitiendo inducir la transcripción de los genes diana. Las proteínas resultantes pueden tener un papel crítico en el crecimiento y la diferenciación del cabello, y permiten que se produzcan nuevas células pilosas. Además, disminuyen las actividades de DHT producidas por la hormona masculina (andrógeno) para suprimir la pérdida del cabello.

A lo largo de la presente solicitud, se hace referencia a diferentes patentes y publicaciones, y sus citas se proporcionan entre paréntesis.

Descripción detallada de la presente invención

Para desarrollar péptidos que tengan acciones idénticas a la proteína WNT10 natural así como que tenga más potenciada la estabilidad y la penetración en la piel que la proteína WNT10 natural, los presentes inventores han preparado y seleccionado una multitud de péptidos derivados de WNT10 humano. Como resultado, los presentes inventores han descubierto péptidos derivados de WNT10 que tienen una estabilidad y una penetración en la piel superiores así como excelentes actividades fisiológicas (*por ejemplo*, mejora en la pérdida del cabello, promoción del crecimiento celular, facilitación de la expresión de la fibronectina, etc.) sobre la base de la secuencia de aminoácidos de la WNT10 natural, realizando en su caso la presente invención.

De acuerdo con ello, es un objeto de la presente invención proporcionar un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N. °: 1.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición para mejorar la pérdida del cabello.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar una composición para mejorar las dolencias de la piel.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar una composición para mejorar o tratar un trastorno relacionado con la ruta de transducción de la señal de WNT10.

Es otro objeto más adicional de la presente invención proporcionar una composición para tratar un trastorno inducido por la proteína DKK-1.

Otros objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada junto con las reivindicaciones y los dibujos adjuntos-.

Para desarrollar péptidos que tengan acciones idénticas a la proteína WNT10 natural así como que tenga más potenciada la estabilidad y la penetración en la piel que la proteína WNT10 natural, los presentes inventores han preparado y seleccionado una multitud de péptidos derivados de WNT10 humano. Como resultado, los presentes inventores han descubierto péptidos derivados de WNT10 que tienen superior estabilidad y penetración en la piel así como excelentes actividades fisiológicas (*por ejemplo*, mejora en la pérdida del cabello, promoción del crecimiento celular, facilitación de la expresión de la fibronectina, etc.) sobre la base de la secuencia de aminoácidos de la WNT10 natural.

Los presentes inventores han desarrollado novedosos análogos económicos mediante la preparación de péptidos con acciones idénticas a la proteína WNT10 natural para superar los inconvenientes convencionales tales como: (a)

procedimiento adicional de replegado que lleva tiempo para obtener la proteína WNT10 activa a pesar de las excelentes actividades de la proteína WNT10; (b) procedimiento de purificación complicado para eliminar los contaminantes derivados de *E. coli*; (c) permeabilidad problemática a la barrera capilar debido a la estabilidad y al elevado peso molecular; y (d) dificultad en la aplicación práctica debido a un alto coste.

5 El péptido de la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos derivadas de WNT10. Preferentemente, el péptido de la presente invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 1. El término péptido usado en el presente documento se refiere a una molécula lineal formada por la unión entre restos de aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

10 Los péptidos de la presente invención se pueden preparar mediante procedimientos convencionales de síntesis química conocidos de una persona experta en la materia, en particular, técnicas de síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-54 (1963); Stewart, y col., Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111 (1984)).

15 Los péptidos de la presente invención pueden prepararse previendo principalmente una porción que puede unirse a una proteína receptora a través de la síntesis parcial aleatoria de algunas porciones de la proteína WNT10 y optimizando a continuación una secuencia de aminoácidos de la porción prevista. Posteriormente, los péptidos candidatos que tienen la actividad más excelente se seleccionan para aislar los péptidos de la presente invención.

El péptido de la SEC ID N.º: 1 no tiene solo acciones similares a las de la proteína WNT10 natural sino que también muestra actividades de factor de crecimiento mediante la unión a un receptor.

20 De acuerdo con una realización preferible, el presente péptido facilita la proliferación celular en queratinocitos y fibroblastos. De acuerdo con una realización preferible, el presente péptido promueve la expresión de la fibronectina.

Además, el péptido de la presente invención presenta una actividad para activar la ruta de señalización de WNT. De acuerdo con una realización preferible, el péptido de la presente invención transfiere β -catenina a un núcleo.

25 Los péptidos de la presente invención tienen *per se* mayor estabilidad que la proteína WNT20 natural, y su modificación permite tener mucha mayor estabilidad.

Preferentemente, los péptidos de la presente invención tienen un grupo protector en el extremo N seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo acetilo, grupo fluorenilmetoxicarbonilo, grupo formilo, grupo palmitoilo, grupo miristilo, grupo estearilo y polietilenglicol (PEG).

30 De acuerdo con una realización preferible, los péptidos de la presente invención pueden tener un grupo protector seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo acetilo, grupo fluorenilmetoxicarbonilo, grupo formilo, grupo palmitoilo, grupo miristilo, grupo estearilo y polietilenglicol (PEG). Por tanto, los grupos protectores de los presentes péptidos contribuyen a proporcionar una estabilidad mucho mayor que la modificación de la proteína WNT2fl natural.

35 Las modificaciones de los péptidos descritos anteriormente aumentan mucho la estabilidad de los péptidos de la presente invención. El término "estabilidad" usado en el presente documento se refiere a la estabilidad *in vivo* y a la estabilidad durante el almacenamiento (*por ejemplo*, estabilidad en almacenamiento a temperatura ambiente) por igual. El grupo protector anteriormente descrito protege a los péptidos del ataque de las proteasas *in vivo*.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para tratar o mejorar la pérdida del cabello, que contiene como principio activo el péptido anteriormente mencionado de la presente invención.

40 En otro aspecto más de la presente invención, se proporciona una composición para mejorar las dolencias cutáneas, que contiene como principio activo el péptido anteriormente mencionado de la presente invención.

Como la presente invención comprende los péptidos relacionados con el factor de crecimiento de la presente invención como los principios activos descritos anteriormente, las descripciones comunes entre los mismos se omiten para evitar una excesiva redundancia que aumente la complejidad de la presente memoria descriptiva.

45 De acuerdo con una realización preferible, la presente composición incluye además el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2 o la SEC ID N.º: 3, o ambos péptidos.

De acuerdo con una realización preferible, el tratamiento o la mejora de la pérdida del cabello por el presente péptido es la promoción del crecimiento o la producción de cabello.

50 Como se demuestra en los siguientes Ejemplos, los péptidos de la presente invención tienen actividad estimuladora de proliferación celular en queratinocitos y fibroblastos y facilitan la señalización de la β -catenina como una ruta de señalización representativa de la proteína WNT10. Se ha podido verificar que el péptido de la presente invención permite que la ruta de la señal de WNT esté activa a pesar de la presencia de DKK-1 como inhibidor de WNT. Además, el presente péptido potencia la expresión de la fibronectina como gen diana de WNT. Adicionalmente, se ha podido demostrar que el péptido de la presente invención contribuye a una expresión de la fibronectina

potenciada incluso en presencia de DKK-1. De acuerdo con los experimentos animales basados en los resultados anteriormente mencionado, se ha podido apreciar que el péptido de la presente invención promueve significativamente el crecimiento del cabello. Por tanto, la composición de la presente invención tiene excelentes efectos sobre el crecimiento del cabello y las mejoras en las dolencias cutáneas.

- 5 De acuerdo con una realización preferible, la mejora en las dolencias cutáneas por el presente péptido es la mejora en las arrugas o en la elasticidad de la piel, prevención del envejecimiento de la piel, mejora en la humedad de la piel, eliminación de heridas o regeneración de la piel.

En otro aspecto más de la presente invención, se proporciona una composición para mejorar o tratar un trastorno relacionado con la ruta de transducción de la señal de WNT10, que contiene como principio activo el péptido anteriormente mencionado de la presente invención.

10 En otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición para tratar un trastorno inducido por la proteína DKK-1, que contiene como principio activo el péptido anteriormente mencionado de la presente invención.

15 Como la presente invención comprende los péptidos relacionados con el factor de crecimiento de la presente invención como los principios activos descritos anteriormente, las descripciones comunes entre los mismos se omiten para evitar una excesiva redundancia que aumente la complejidad de la presente memoria descriptiva.

De acuerdo con una realización preferible, el trastorno relacionado con la ruta de transducción de la señal de WNT10 incluye un trastorno ocular, un trastorno modulado por lípidos, un trastorno óseo o un trastorno tumoral, y más preferentemente, un trastorno óseo o un trastorno tumoral.

20 De acuerdo con una realización preferible, el trastorno óseo se selecciona entre el grupo que consiste en una enfermedad asociada con el desarrollo óseo, una fractura de hueso, una pérdida ósea senil, condrodistrofia, hipercalcemia, hiperostosis, osteogénesis imperfecta, osteomalacia, osteomielitis, osteoporosis, enfermedad de Paget del hueso, osteoartritis y raquitis.

25 De acuerdo con una realización preferible, el trastorno tumoral incluye carcinoma colorrectal, carcinoma de mama o melanoma.

De acuerdo con una realización preferible, el trastorno modulado por lípidos se selecciona entre el grupo que consiste en cardiopatías, deficiencia familiar de lipoproteína lipasa, hiperlipoproteinemia de tipo III, hipercolesterolemia familiar, hipertrigliceridemia familiar, hiperlipoproteinemia de tipo lipoproteína múltiple, aumento de lípidos por diálisis y/o diabetes, y deficiencia familiar en apolipoproteína CII.

30 De acuerdo con una realización preferible, el trastorno inducido por la proteína DKK-1 incluye diabetes o recuperación y regeneración muscular, y la diabetes se asocia con el tratamiento de resistencia a la insulina e hipoglicemia.

De acuerdo con una realización preferible, la composición es una composición farmacéutica que contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido relacionado con el factor de crecimiento de la presente invención; y (b) un transportador farmacéuticamente aceptable.

35 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" usado en el presente documento se refiere a una cantidad suficiente para mostrar y conseguir eficacias y actividades del péptido relacionado con el factor de crecimiento de la presente invención.

40 El transportador farmacéuticamente aceptable incluido en la composición farmacéutica de la presente invención se utiliza habitualmente en formulaciones farmacéuticas, pero no se limita a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, caucho arable, fosfato de potasio, arginato, gelatina, silicato de potasio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabes, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, y aceites minerales. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender además un lubricante, un humectante, un edulcorante, un aromatizante, un emulsionante, un agente suspensor, y un conservante. Se pueden encontrar los detalles de los transportadores y las formulaciones farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).

45 De acuerdo con las técnicas convencionales conocidas de los expertos en la materia, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede formular con un transportador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable tal como se ha descrito anteriormente, proporcionando finalmente varias formas de dosis unitaria y una forma multidosis. Los ejemplos no limitantes de las formulaciones incluyen, pero no se limitan a, una disolución, una suspensión o una emulsión en medio acuoso u oleoso, un extracto, un elixir, un polvo, un gránulo, un comprimido y una cápsula, y puede comprender además un agente de dispersión o un estabilizador.

50 De acuerdo con una realización preferible, la composición es una composición cosmética que contiene: (a) una cantidad cosméticamente eficaz del péptido relacionado con el factor de crecimiento de la presente invención; y (b)

un transportador cosméticamente aceptable. El término usado en el presente documento "cantidad cosméticamente aceptable" se refiere a una cantidad suficiente para conseguir eficacias sobre mejoras en las condiciones de la piel anteriormente descritas.

Las composiciones cosméticas de la presente invención pueden formularse en una amplia variedad de formas, por ejemplo, que incluyen una solución, una suspensión, una emulsión, una pasta, una pomada, un gel, una crema, una loción, un polvo, un jabón, un limpiador que contiene un tensioactivo, un aceite, una base en polvo, una base en emulsión, una base en cera y un pulverizador. Específicamente, las composiciones cosméticas de la presente invención pueden formularse en una amplia variedad de suavizantes de la piel, líquido nutritivo, crema nutritiva, crema de masaje, esencia, crema para ojos, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, envase, pulverizador o polvo.

Si la composición cosmética está en forma de pasta, crema o gel, puede incluir grasas animales y vegetales, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, sílice, talco, óxido de cinc o mezclas de estas sustancias.

Si la formulación está en polvo o en un pulverizador, puede incluir lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio, polvo de poliamida y mezclas de estas sustancias. El pulverizador comprende adicionalmente los propulsores habituales, por ejemplo, clorofluorocarbonos, propano/butano o dimetil éter.

La formulación de la solución y la emulsión puede comprender un disolvente, solubilizante y emulsionante, por ejemplo, agua, etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilglicol, aceites, ésteres grasos de glicerol, polietilenglicol y ésteres de ácido graso de sorbitán.

La formulación de la suspensión puede contener diluyentes líquidos, por ejemplo, agua, etanol o propilenglicol, agentes suspensores, por ejemplo, alcoholes de isostearilo etoxilados, sorbitol polioxietilenado y ésteres de sorbitán polioxietilenados, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar y tragacanto o mezclas de estas sustancias.

La formulación de las composiciones limpiadoras con tensioactivo puede incluir sulfato de alcohol alifático, éter sulfato de alcohol alifático, monoéster de sulfosuccinato, isotinato, derivados de imidazolio, taurato de metilo, sarcosinato, éter sulfato de amida de ácido graso, amidobetaína de alquilo, alcohol alifático, glicérido de ácido graso, dietanolamida de ácido graso, aceite vegetal, derivados de lanolina, éster de ácido graso de glicerol etoxilado o mezclas de dichos ingredientes.

Adicionalmente, las composiciones cosméticas de la presente invención pueden incluir sustancias auxiliares así como péptidos como principios activos y transportadores. Los ejemplos no limitantes de las sustancias auxiliares incluyen conservantes, antioxidantes, estabilizantes, solubilizantes, vitaminas, colorantes, mejoradores del olor o mezclas de dichas sustancias.

Las características y ventajas de la presente invención se resumirán como sigue:

- (i) el péptido derivado de WNT10 de la presente invención posee actividades idénticas o similares al WNT10 natural;
- (ii) los péptidos de la presente invención tienen una estabilidad y una potencia de penetración en la piel mucho mayores que WNT10 natural;
- (iii) por tanto, la composición que contiene el presente péptido no solamente muestra excelentes efectos sobre la mejora en la pérdida del cabello (por ejemplo, promoción del crecimiento del cabello o producción de cabello), sino que también tiene eficacias superiores sobre el tratamiento de un trastorno relacionado con la ruta de transducción de la señal de WNT10 y un trastorno inducido por la proteína DKK-1; y
- (iv) la excepcional actividad y estabilidad del presente péptido descrito anteriormente puede ser muy ventajosa en la aplicación a composiciones farmacéuticas, cuasi-fármacos y cosméticos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa los resultados del análisis de la HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) del péptido de la SEC ID N.º 1 preparado en los Ejemplos de Preparación.

La Fig. 2a es una gráfica que representa un efecto estimulatorio sobre el crecimiento de los queratinocitos tratados con el péptido preparado en los Ejemplos de Preparación.

La Fig. 2b es una gráfica que representa un efecto estimulatorio sobre el crecimiento de fibroblastos tratados con el péptido reparado en los Ejemplos de preparación.

La Fig. 3 es una imagen de microscopio que demuestra los efectos del péptido de la presente invención para promover el crecimiento de queratinocitos y fibroblastos.

La Fig. 4 muestra una imagen de inmunotinción que representa que la expresión de la proteína ki-67 (un marcador celular de la proliferación) está notablemente potenciada mediante el tratamiento con el péptido de la presente invención.

La Fig. 5a es una gráfica que representa una proliferación celular mucho más potenciada en queratinocitos tratados con el complejo de péptido que en aquellos tratados con cada péptido preparado en los Ejemplos de

Preparación.

La Fig. 5b es una gráfica que representa una proliferación celular mucho más elevada en fibroblastos tratados con el complejo de péptido que en aquellos tratados con cada péptido preparado en el Ejemplo de Preparación.

La Fig. 6a muestra un resultado de análisis de transferencia Western que mide los cambios de expresión de la β -catenina mediante el presente péptido. Se ha mostrado que la expresión de la β -catenina reducida por DKK-1 (un inhibidor de WNT y de la pérdida de cabello) se aumentó y se potenció mediante la adición del presente péptido.

La Fig. 6b es una imagen de inmunotinción que representa la actividad elevada de la β -catenina mediante el péptido de la presente invención. La Fig. 7 es un resultado de análisis de transferencia Western que representa un efecto estimulador más significativo sobre la expresión de la β -catenina por el complejo de péptido en

comparación con cada péptido preparado en los Ejemplos de Preparación.

La Fig. 8 muestra un resultado de análisis de transferencia Western en el que el presente péptido induce una elevada actividad de la β -catenina, y el complejo de péptido muy significativo potencia la actividad de la β -catenina en comparación con cada péptido preparado en los Ejemplos de Preparación.

La Fig. 9a es una gráfica que representa que la expresión de la fibronectina se eleva gradualmente por cada péptido preparado en los Ejemplos de Preparación con el lapso de tiempo.

La Fig. 9b representa una gráfica que mide los cambios en la expresión de la fibronectina mediante el presente péptido. Se ha mostrado que la expresión de la fibronectina inhibida por DKK-1 (un inhibidor de WNT y de los genes de pérdida del cabello) se almacenó y potenció mediante la adición del presente péptido.

La Fig. 10 es una gráfica de un análisis de transferencia Western que representa un efecto potenciado más significativo sobre la expresión de la fibronectina por el complejo de péptido en comparación con cada péptido preparado en los Ejemplos de Preparación.

La Fig. 11 representa los resultados que miden la estabilidad térmica del péptido de la presente invención y de la proteína WNT10 natural.

La Fig. 12 representa que el péptido de la presente invención tiene una actividad para promover el crecimiento del cabello en la piel de la espalda del ratón.

La Fig. 13a muestra una imagen de inmunotinción que representa que en un folículo piloso de ratón, la producción de folículos pilosos está facilitada por el complejo de péptido de la presente invención y los folículos pilosos degenerados por la proteína DKK-1 se restaura y desarrollan mediante tratamiento simultáneo con DKK.1 y el presente complejo de péptido.

La Fig. 13b es una imagen de inmunotinción que representa que la expresión de la β -catenina en el folículo piloso durante el cultivo de folículos pilosos de ratón está potenciada por el complejo de péptido de la presente invención.

La Fig. 13c muestra una imagen de inmunotinción que representa la expresión de la proteína WNT en el folículo piloso durante el cultivo de folículos pilosos de ratón es elevada por el complejo de péptido de la presente invención.

La Fig. 13d es una imagen de inmunotinción que representa que la expresión de la proteína ki-67 en folículos pilosos durante el cultivo de folículos pilosos de ratón está aumentada por el complejo de péptido de la presente invención.

La presente invención se describirá ahora más detalladamente en los ejemplos. Será evidente para los expertos en la materia que estos ejemplos están previstos para ilustrar más concretamente, y el ámbito de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas y no está limitado por los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1 de preparación: Síntesis de NH₂-Gln-Thr-Arg-Val-Gln-Arg-Cys-His-Cys-OH (SEC ID N. ° 1)

700 mg de resina de cloruro de cloro tritilo (resina CTL, Nova Biochem n° de cat. 01-64-0021) se introdujeron en un reactor, al que se añadieron 10 ml de cloruro de metileno (MC), seguido por agitación durante 3 min. Tras eliminar la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF) a lo resultante y, a continuación, la agitación se llevó a cabo durante 3 min, después de lo cual se eliminó el disolvente. Se añadieron al reactor 10 ml de solución de diclorometano y 200 mmoles de Fmoc-Cys (trt)-OH (Bachem, Suiza) y se añadieron a continuación 400 mmoles de DIEA (N,N'-diisopropil etilamina) al reactor, después de lo cual, la mezcla se disolvió mediante agitación y la reacción se mantuvo después en agitación durante 1 h. Tras el lavado, metanol y DIEA (2:1) disueltos en DCM (diclorometano) se hicieron reaccionar con la resina durante 10 min, y a continuación, la fracción resultante se lavó utilizando DCM/DMF en exceso (1:1). Tras eliminar la solución, se añadieron 10 ml de DMF a la solución resultante y la agitación se llevó a cabo durante 3 min, seguido por la eliminación del disolvente. Se añadieron 10 ml de una solución de desprotección (piperidina al 20% en DMF) al reactor, y se realizó la agitación durante 10 min a temperatura ambiente, seguido por la eliminación de la solución. Tras añadir el mismo volumen de solución de desprotección, la reacción se mantuvo en agitación durante 10 min y se retiró la solución, seguido por lavado secuencial con DMF (3 veces), MC (1 vez) y DMF (1 vez) para dar como resultado las resinas Cys(trt)-CTL. Se añadieron 10 ml de solución de DMF a un reactor diferente y a continuación se añadieron 200 mmoles de Fmoc-His(trt)-OH (Bachem, Suiza), 200 mmoles de HOBt y 200 mmoles de Bop, seguido por agitación para solubilización. Se añadieron al reactor 400 mmoles de DIEA dos veces como fracción y se llevó a cabo la agitación durante al menos 5 min para disolver todos los sólidos. La solución de aminoácidos disueltos se introdujo en el reactor que contenía la resina desprotegida y se llevó a cabo la reacción con agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la extracción de la solución de reacción, la fracción resultante se agitó tres veces (durante cada 5 min) con solución

de DMF para eliminar los residuos sin reaccionar. Una pequeña cantidad de la resina ya reaccionada se extrajo para evaluar la medida de las reacciones mediante un ensayo de ninhidrina. Usando la solución de desprotección, se llevó a cabo la desprotección dos veces de la misma manera que se ha descrito anteriormente para dar como resultado la resina His(trt)-Cys(trt)-CTL. Tras el lavado con DMF y MC, se llevó a cabo adicionalmente el ensayo de la ninhidrina y se realizaron las uniones secuenciales de los aminoácidos como se ha descrito anteriormente. Basándose en la secuencia de aminoácidos diseñada por los presentes inventores, Fmoc-Cys(trt), Fmoc-Arg, Fmoc-Gln(trt), Fmoc-Val, Fmoc-Arg, Fmoc-Thr, Fmoc-Gln(trt) y Fmoc-Arg(pbf) se unieron secuencialmente a las resinas. Se eliminó el grupo protector de Fmoc incubando vigorosamente con la solución de desprotección dos veces durante 10 min. Para la acetilación, se incubaron anhídrido acético, DIEA y HoBt con las resinas de peptidilo durante 1 h. Las resinas de peptidilo preparadas se lavaron tres veces con DMF, MC y metanol, respectivamente, y se secaron gradualmente en atmósfera de nitrógeno, después de lo cual se secaron completamente a vacío con P₂O₅. Las resinas secas se hicieron reaccionar con 30 ml de solución de partida [que contenía ácido trifluoroacético al 95% (TFA), 2,5% de agua destilada, 2,5% de tioanisol] durante 2 h a temperatura ambiente tras agitación intermitente. La resina se filtró y se lavó con un pequeño volumen de solución de TFA, después de lo cual, el filtrado se combinó con el licor madre. Tras destilación a presión reducida para reducir el volumen total a la mitad, la precipitación se indujo usando 50 ml de éter frío y los precipitados formados se recogieron mediante centrifugación, seguido por lavado dos veces con éter frío. Tras eliminar el licor madre, la fracción resultante se secó en atmósfera de nitrógeno para dar como resultado 0,65 g de péptido sin purificar 1,NH₂-Arg-Gln-Thr-Arg-Val-Gln-Arg-Cys-His-Cys-OH (tasa de rendimiento; 92,6%). Se determinó el peso molecular del producto final como 1287,1 (PM teórico: 1286,5) utilizando un analizador de masas.

Ejemplo 2 de preparación: Síntesis de otros péptidos

Los péptidos de la SEC ID N.º: 2 y la SEC ID N.º: 3 se sintetizaron según los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 de Preparación. La secuencia de aminoácidos de los péptidos anteriormente mencionados es la siguiente: SEC ID N.º:2, Ac-Tyr-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gly-Trp-Thr-His (Ac-YKSKKGGWTH); y la SEC ID N.º:3, Glu-Leu-Ile-Glu-His-engage-Arg-Pro-Ala-Asp (ELIEH-engage-RPAD; engage, Gly-Gly-Gly).

TABLA 1

SEC ID N°	Secuencia de aminoácidos	Valores analizados (analizador de masas)	
		Valores analizados	Valores teóricos
1	RQTRVERCHC	1287,1	1286,5
2	Ac-YKSKKGGWTH	1233,8	1233,4
3	ELIEH-engage-RPAD	1250,9	1250,35

Ejemplo experimental 1: Influencia de los péptidos sobre el crecimiento celular

Para evaluar si tres péptidos preparados en los Ejemplos de preparación 1-2 tienen actividades similares al factor de crecimiento, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico SRB (Sulforodamina B; Sigma-Aldrich) usando queratinocitos HaCaT (Banco de líneas celulares de Corea) y fibroblastos NIH3T3 (Banco de líneas celulares de Corea) de acuerdo con el procedimiento de Rizzino y col. (Rizzino, y col. Cancer Res., 48: 4266 (1988)).

Se cultivaron queratinocitos HaCaT y fibroblastos NIH3T3 en matraces de 250 ml que contenían EMEM (medio esencial mínimo de Eagle; Gibco, EE.UU.) suplementado con FBS al 10% (suero de feto de ternera; Sigma). Las células cultivadas se trataron con una solución de tripsina al 1% para desprender las células del fondo de los frascos de cultivo y se centrifugaron para recoger los aglomerados celulares. Después que las células se volvieran a suspender en EMEM que no contenía FBS, se añadió una alícuota (3×10^3 células) a cada pocillo de placas de 96 pocillos y se cultivó con un 5% CO₂ durante 24 h a 37 °C. Tras 24 h de cultivo, el medio se cambió por un medio reciente sin suero y las células se incubaron con una muestra vacía (para la normalización), tres péptidos sintetizados (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml) y el complejo de péptido (1 µg/ml) disueltos asépticamente en DMSO al 10% durante 72 h en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Tras eliminar los sobrenadantes, se fijaron las células con etanol y a continuación se lavaron tres veces utilizando PBS (solución salina tamponada con fosfato), seguido por incubación con una solución de SRB. Las células se lavaron suficientemente con ácido acético al 1% y se observaron al microscopio para encontrar el estado de las células vivas. Además, se midió la absorbancia a 590 nm para analizar la viabilidad celular. Mientras tanto, tras cultivar en las mismas condiciones, el tejido se inmunotizó mediante un ensayo inmunohistoquímico con anticuerpo ki-67 (SantaCruz, EE.UU.) y se observó la cantidad de proteína ki-67 como marcador de la proliferación celular.

La Fig. 2 demuestra que el péptido de la presente invención aumenta de forma notable el crecimiento de queratinocitos (Fig. 2a) y fibroblastos (Fig. 2b).

La Fig. 3 es un resultado que representa que se observó este cambio de la forma celular al microscopio después que las células se trataran con el presente péptido durante 72 h. Pudo apreciarse que el péptido de la presente invención promueve la proliferación de queratinocitos y fibroblastos, y cambia sus formas morfológicas.

La Fig. 4 muestra que la expresión de la proteína Ki-67 (un marcador celular para la proliferación) está remarcablemente potenciada en queratinocitos mediante el tratamiento con el péptido de la presente invención.

La Fig. 5 evalúa el crecimiento de queratinocitos (Fig. 5a) y fibroblastos (Fig. 5b) tras el tratamiento con el péptido. Como se muestra en la Fig. 5a y en la Fig. 5b, se pudo demostrar que la proliferación celular en queratinocitos y fibroblastos tratados con complejo de péptido estuvo mucho más potenciada que en aquellos tratados con cada péptido.

Ejemplo experimental 2: Influencia de péptidos sobre la cantidad elevada de β -Catenina

Queratinocitos HaCaT cultivados durante 48 h se incubaron con los péptidos sintetizados en el Ejemplo 1 de preparación durante 5 h. Se examinó el nivel de expresión de la β -catenina, que es una molécula de señalización esencial para promover el crecimiento del cabello como señalización representativa de la proteína WNT. Se midió la cantidad de β -catenina mediante el análisis de transferencia Western utilizando un anticuerpo dirigido contra la β -catenina (SantaCruz, EE.UU.). Además, se ha observado mediante un ensayo inmunohistoquímico que utiliza la misma que la β -catenina se transloca a un núcleo. El péptido de la presente invención elevó significativamente el nivel de expresión de la β -catenina en queratinocitos. En primer lugar, se ha mostrado que se ha observado la actividad de la β -catenina mediante tratamiento con el péptido de la presente invención a pesar de la presencia de DKK-1 como inhibidor de WNT e inhibidor de la señalización de la β -catenina (Fig. 6a). En el ensayo inmunohistoquímico para evaluar si el péptido funciona para transferir la β -catenina al núcleo, se pudo demostrarse que el presente péptido contribuye a la translocación de la β -catenina desde el citosol al núcleo. Además, se han observado también las actividades de la β -catenina en el citosol ya que la β -catenina sigue estando presente en el citosol (Fig. 6b).

La Fig. 6a representa la potenciación de la expresión de la β -catenina añadiendo el presente péptido y muestra el reaumento de la expresión de la β -catenina incluso en el tratamiento con la proteína DKK-1 y el presente péptido.

La Fig. 6b es un resultado observado utilizando un ensayo inmunohistoquímico, que representa la translocación de la β -catenina a un núcleo.

Tal como se muestra en las Figs. 7 y 8, la expresión de la β -catenina por un complejo de péptido se elevó mucho más que por cada péptido.

Tomando en su conjunto los resultados de los Ejemplos experimentales 1 y 2, se pudo apreciar que los péptidos de la presente invención ejercen excelentes efectos sobre la promoción del crecimiento del cabello y la inhibición de la pérdida del cabello, y tienen también una actividad antienvjecimiento.

Ejemplo experimental 3: Influencia de los péptidos sobre la producción de fibronectina

Para verificar si los péptidos sintetizados en el Ejemplo de preparación 1 potencian la expresión de la fibronectina como una proteína diana de WNT, se añadieron fibroblastos NIH3T3 (4×10^3) a cada pocillo de placas de 96 pocillos y se cultivaron con un 5% de CO₂ durante 24 h a 37 °C. Tras 24 h de cultivo, el medio se cambió por un medio reciente sin suero y las células se trataron con una muestra vacía (para la normalización), tres péptidos sintetizados (1 μ g/ml) y el complejo de péptido (1 μ g/ml) se disolvieron asépticamente en DMSO al 10% durante 3 h, 10 h, 24 h o 48 h en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Tras 72 h de incubación, se extrajo el cultivo celular y se midió el nivel de expresión de la fibronectina utilizando el kit ELISA de la fibronectina (R&D systems, EE.UU.).

Como se ha demostrado en la Fig. 9a, se reveló que los péptidos de la presente invención elevan el nivel de fibronectina en los fibroblastos con el paso del tiempo. Además, una vez tratada la proteína DKK-1 y cultivada en las mismas condiciones, se examinó el nivel de expresión de la fibronectina. Como se muestra en la Fig. 9b, el nivel de expresión de la fibronectina se restauró y potenció incluso mediante el tratamiento con la proteína DKK-1 y el presente péptido.

La Fig. 9a es una gráfica que mide la expresión de la fibronectina mediante tratamiento con el péptido de la presente invención durante un tiempo determinado, demostrando que cada péptido ha elevado la expresión de la fibronectina gradualmente en el tiempo.

La Fig. 9b muestra que la expresión de la fibronectina inhibida por DKK-1 (un inhibidor de WNT y un gen de pérdida del cabello) se recuperó mediante la adición del presente péptido. En consecuencia, se restauró la expresión de la fibronectina con el tratamiento del péptido de la presente invención en las mismas condiciones que se describen en la Fig. 9a.

Como se ilustra en la Fig. 10, el nivel de expresión de la fibronectina en un tratamiento de 72 h con péptidos se elevó en comparación con el grupo del control, respectivamente, y se observó la expresión de la fibronectina más elevada en el grupo tratado con el complejo de péptido.

En su conjunto, estos resultados demuestran que los péptidos de la presente invención inducen la ruta de

señalización de WNT- β -catenina a pesar de la presencia de una proteína DKK-1 conocida para un inhibidor de WNT y un gen de pérdida de cabello, contribuyendo a la promoción de la pérdida del cabello, la inhibición de la pérdida del cabello y el antienvjecimiento.

Ejemplo experimental 4: Evaluación de la estabilidad térmica de los péptidos preparados

- 5 Cada péptido preparado en el Ejemplo 1 de Preparación y un producto normalizado del factor de crecimiento (WNT10; NIBSC, Reino Unido) se disolvieron en tampón fosfato hasta una concentración de 0,1 mg/ml. Las soluciones preparadas (1 ml) se introdujeron en viales de vidrio y se mantuvieron en reposo a 37 °C. Posteriormente, se extrajeron soluciones los días 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 70, y se centrifugaron para la extracción de los péptidos o las proteínas desnaturalizadas, seguido por centrifugación utilizando HPLC (Fig. 11).

10 Ejemplo experimental 5: Análisis de los efectos de los péptidos sobre el crecimiento de pelo de ratón

- El péptido sintetizado en el Ejemplo de preparación 1 se formuló en un nanosoma. Posteriormente, se retiró parcialmente la piel de la espalda de un ratón C57BL/6 y se administró a continuación por vía tópica a la piel el nanosoma dos veces al día durante 15 días. A los 9 días de tratamiento se observó pelo en crecimiento en la piel de la espalda del ratón, y la cantidad de pelo en la piel de la espalda del ratón se potenció muy significativamente a los 15 días de tratamiento en comparación con un grupo del control (Fig. 12).

Ejemplo experimental 6: Análisis de los efectos del complejo de péptido sobre la expresión de proteínas en el folículo piloso

Durante el cultivo del folículo pilosa

- 20 Se sometió a disección el folículo piloso procedente de pelo de ratón Balb/C con una malla quirúrgica y se lavó con etanol, seguido por un lavado adicional con PBS y solución de cultivo DMEM. A continuación de lo anterior, los folículos pilosos se incubaron con 5 μ g/ml de cada complejo de péptido disuelto en solución de cultivo de DMEM, y se cultivó con un 5% de CO₂ durante 5 días a 37 °C. Después de 5 días de cultivo, se prepararon los folículos pilosos como un bloque de parafina y se trató cada tejido con control, complejo de péptido, DKK-1, y DKK-1 y el complejo de péptido se tiñeron y se compararon usando la tinción H y E (Figs. 13a-13d).

- 25 La Fig. 13a representa que DKK-1 indujo que se suprimiera la degeneración de folículos pilosos con el complejo de péptido de la presente invención. Se pudo confirmar que los folículos pilosos en el control son degenerados por DKK-1, mientras que los folículos pilosos tratados con DKK-1 y el presente complejo de péptido no degeneraron sino que produjeron.

- 30 La Fig. 13b muestra que la inhibición inducida por DKK-1 de la β -catenina se recuperó mediante el tratamiento con el complejo de péptido de la presente invención. Se pudo confirmar que la expresión de la β -catenina en el control se inhibió mediante DKK-1, mientras que la expresión de la β -catenina tratada con DKK-1 y el presente complejo de péptido no se suprimieron sino que se elevó bruscamente.

- 35 Como se muestra en la Fig. 13c, la expresión de la proteína WNT se inhibió tratando DKK-1 con el control. Sin embargo, se potenció la expresión de la proteína WNT mediante el tratamiento simultáneo con DKK-1 y el presente complejo de péptido. Estos resultados sugieren que el complejo de péptido de la presente invención facilita eficazmente no solo la proliferación de células adyacentes al pelo sino también la producción de folículos pilosos.

Como se ilustra en la Fig. 13d, se suprimió la expresión de la proteína Ki-67 en el folículo piloso tratando DKK-1 con el control. Mientras tanto, se elevó la expresión de ki-67 mediante el tratamiento simultáneo con DKK-1 y el presente complejo de péptido.

- 40 En su conjunto, estos resultados representan que DKK-1 inhibe el crecimiento celular en los folículos pilosos y produce incluso la muerte celular para inducir la degeneración del folículo piloso. Por tanto, la degeneración del folículo piloso inducida por DKK-1 puede superarse mediante el complejo de péptido de la presente invención. En consecuencia, se pudo apreciar que el presente complejo de péptido puede promover la proliferación y la producción de las células del folículo piloso.

45 Ejemplo 1: Preparación de nanopéptidos

- 50 mg de cada péptido sintetizado en los Ejemplos de preparación se disolvieron en 500 ml de agua destilada con agitación suficiente. La solución de péptido se mezcló con 5 g de lecitina, 0,3 ml de oleato de sodio, 50 ml de etanol y una pequeña cantidad de aceites, y su volumen se ajustó con agua destilada hasta 1 l. La solución resultante se sometió a un microfluidizador bajo presión elevada para emulsión, proporcionando de esta forma nanosomas que tienen un tamaño aproximado de 100 nm. Los nanosomas se prepararon para tener una concentración final de aproximadamente 50 ppm y se usaron como ingredientes para cosmética.

Ejemplo de formulación 1: Suavizante de la piel

Se formuló un suavizante de la piel que comprendía nanosomas que contenían los péptidos preparados en el

Ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

TABLA 2

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma con péptido	2,5
1,3-butilenglicol	6,0
Glicerina	4,0
PEG 1500	1,0
Hialuronato de sodio	1,0
Polisorbato 20	0,5
Etanol	8,0
Conservante, pigmento	Cantidad adecuada
Benzofenona-9	0,05
Perfume	Cantidades mínimas
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de formulación 2: Crema nutritiva

- 5 Se formuló una crema nutritiva que comprendía nanosomas que contenían los péptidos preparados en el Ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

TABLA 3

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma con péptido	2,5
Aceite de hierba de la pradera	3,0
Alcohol cetearílico	1,5
Ácido esteárico	1,5
Estearato de glicerilo	1,5
Parafina líquida	10,0
Cera	2,0
Polisorbato 60	0,6
Sesquioleato de sorbitán	2,5
Escualano	3,0
1,3-butilenglicol	3,0
Glicerina	5,0
Trietanolamina	0,5
Acetato de tocoferilo	0,5
Conservante, pigmentos	Cantidad adecuada
Perfume	Cantidad adecuada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de formulación 3: Líquido nutritivo

- 10 Se formuló un líquido nutritivo que comprendía nanosomas que contenían péptidos preparados en el Ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

TABLA 4

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma con péptido	2,5
1,3-butilenglicol	4,0
Glicerina	4,0
Alcohol cetearílico	0,8
Estearato de glicerilo	1,0
Trietanolamina	0,13
Acetato de tocoferilo	0,3
Parafina líquida	5,0
Escualano	3,0
Aceite de nuez de macadamia	2,0

(continuación)

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Polisorbato 60	1,5
Sesquioleato de sorbitán	0,5
Polímero de carboxivinilo	1,0
Conservante, pigmentos	Cantidad adecuada
Perfume	Cantidad adecuada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de formulación 4: Esencia

Se formuló una esencia que comprendía nanosomas que contenían péptidos preparados en el Ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

5

TABLA 5

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma con péptido	2,5
Glicerina	10,0
1,3-butilenglicol	5,0
PEG 1500	2,0
Alantoína	0,1
DL-pantenol	0,3
EDTA-2Na	0,02
Hidroxietilcelulosa	0,1
Hialuronato de sodio	8,0
Polímero de carboxivinilo	0,2
Trietanolamina	0,18
Octildodeceth-16	0,4
Etanol	6,0
Perfume, conservante, pigmentos	Cantidad adecuada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de formulación 5: Suero capilar

Se formuló un suero capilar que comprendía nanosomas que contenían los péptidos preparados en el Ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

10

TABLA 6

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma con péptido	1
Glicerina	10,0
1,3-butilenglicol	5,0
PEG 1500	2,0
Alantoína	0,1
DL-pantenol	0,3
EDTA-2Na	0,02
Hidroxietilcelulosa	0,1
Hialuronato de sodio	8,0
Polímero de carboxivinilo	0,2
Trietanolamina	0,18
Octildodeceth-16	0,4
Etanol	6,0
Perfume, conservante, pigmentos	Cantidad adecuada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

Ejemplo de formulación 6: Tónico capilar

Se formuló un tónico capilar que comprendía nanosomas que contenían los péptidos preparados en el Ejemplo 1 de acuerdo con la siguiente composición:

TABLA 6

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma con péptido	1
Glicerina	2,0
1,3-butilenglicol	2,0
PEG 1500	2,0
Alantoína	0,1
DL-pantenol	0,3
EDTA-2Na	0,02
Hialuronato de sodio	8,0
Polímero de carboxivinilo	0,2
Trietanolamina	0,18
Octildodeceth-16	0,4
Etanol	10,0
Perfume, conservante, pigmentos	Cantidad adecuada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 1.
2. El péptido de acuerdo a la reivindicación 1, en el que el péptido facilita la proliferación celular en queratinocitos y fibroblastos.
- 5 3. El péptido de acuerdo a la reivindicación 1, en el que el péptido transfiere la β -catenina a un núcleo.
4. Una composición para tratar o prevenir la pérdida del cabello, que comprende el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como principio activo.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la composición comprende además el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 2 o SEC ID N.º:3, o ambos péptidos.
- 10 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el tratamiento o la prevención de la mejora de la pérdida del cabello es la promoción del crecimiento del cabello o la producción de cabello.
7. Una composición para mejorar las afecciones cutáneas, que como principio activo comprende el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición comprende además el péptido que tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID N.º: 2 o SEC ID N.º:3, o ambos péptidos.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la mejora en las afecciones cutáneas es la mejora en las arrugas o en la elasticidad de la piel, prevención del envejecimiento de la piel, mejora en la humedad de la piel, eliminación de heridas o regeneración de la piel.
- 20 10. Una composición para prevenir o tratar un trastorno relacionado con la ruta de transducción de la señal de WNT10, que comprende el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como principio activo.
11. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la composición comprende además el péptido que tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID N.º: 2 o SEC ID N.º:3, o ambos péptidos.
- 25 12. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el trastorno relacionado con la ruta de transducción de la señal de WNT10 comprende un trastorno óseo o un trastorno tumoral.
13. Una composición para prevenir o tratar un trastorno inducido por la proteína DKK-1, que como principio activo comprende el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
14. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la composición comprende además el péptido que tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID N.º: 2 o SEC ID N.º 3, o ambos péptidos.
- 30 15. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el trastorno inducido por la proteína DKK-1 comprende diabetes o recuperación o regeneración muscular.

Fig. 1

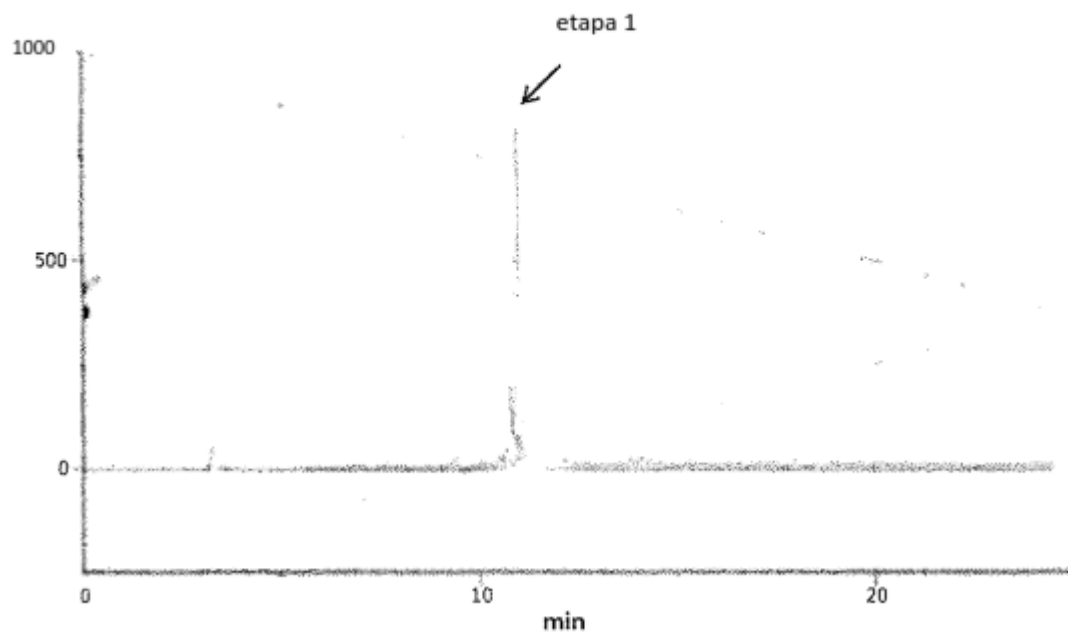


Fig. 2a

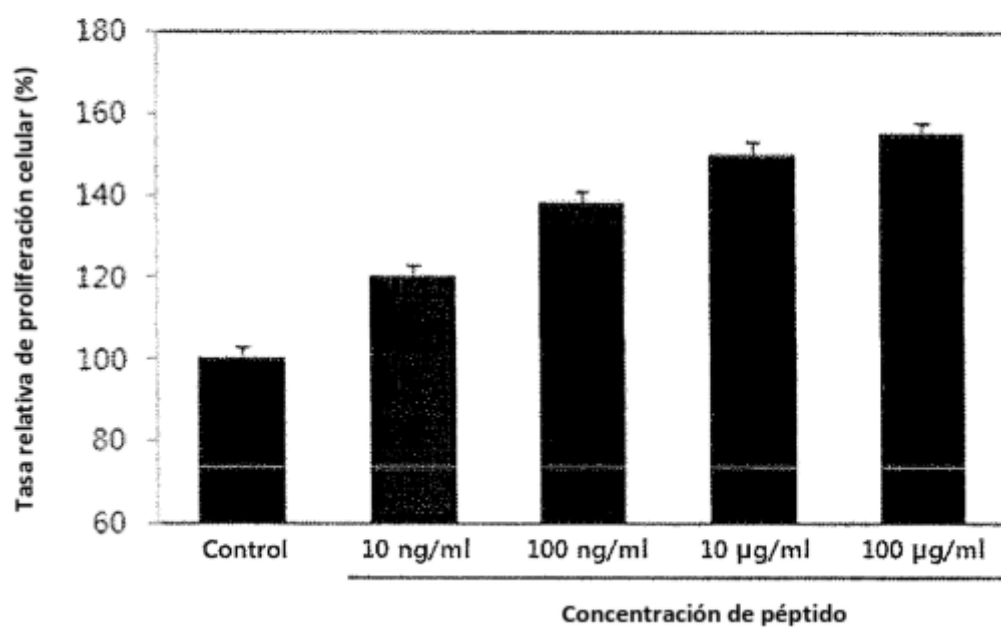


Fig. 2b

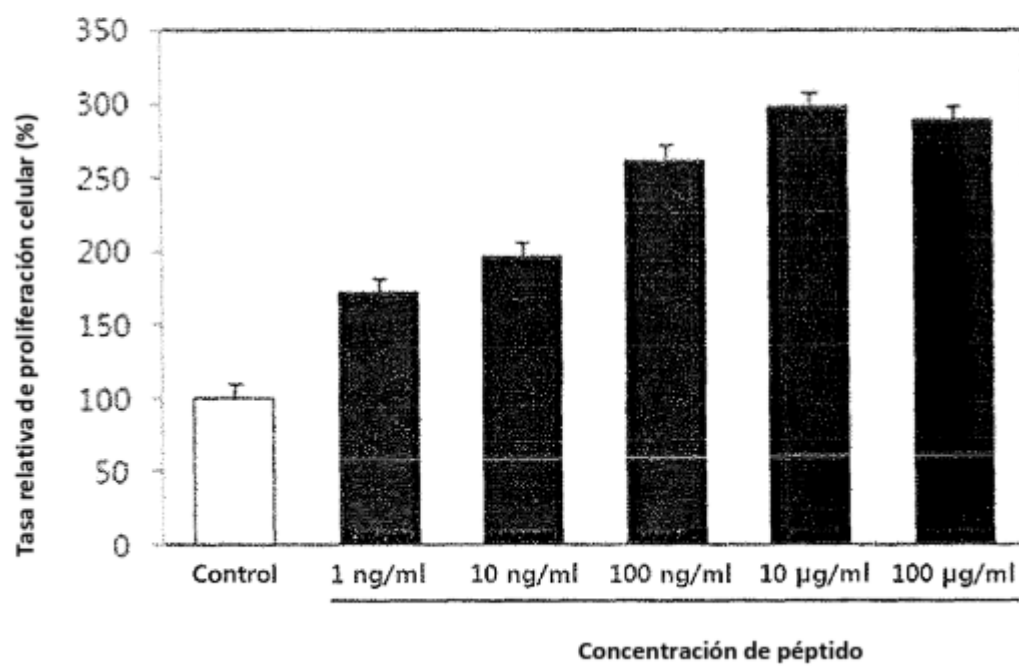


Fig. 3

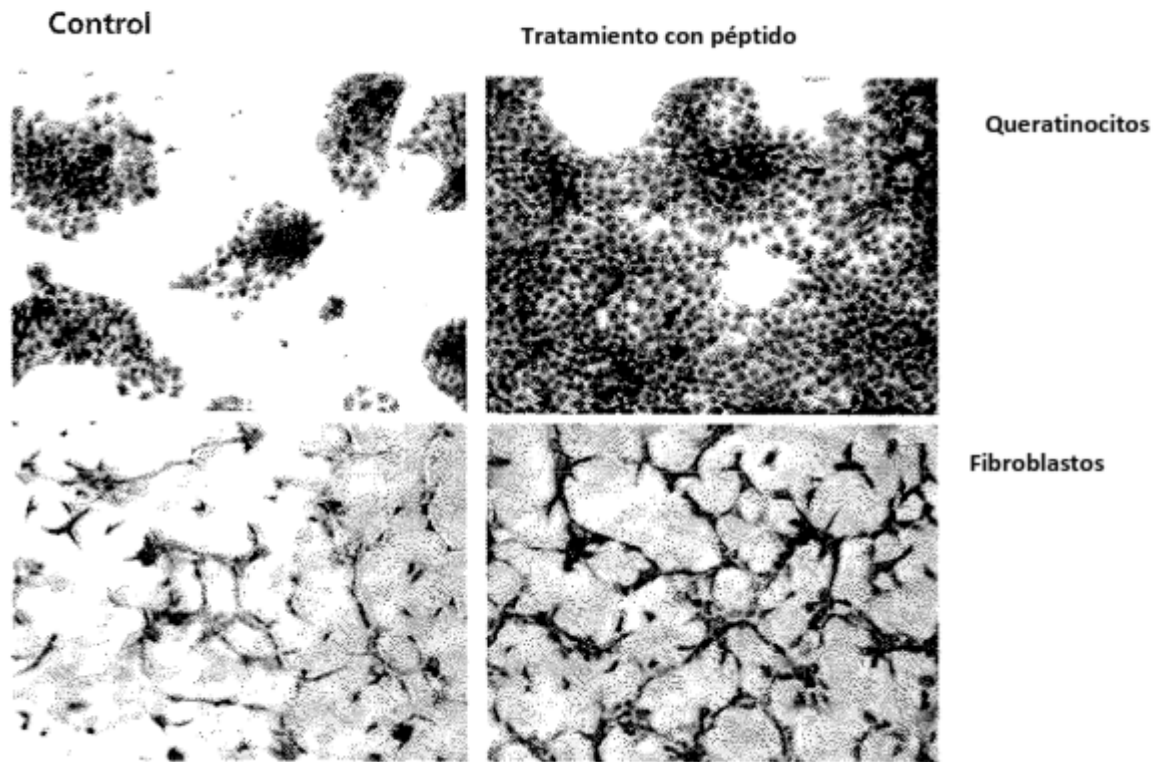
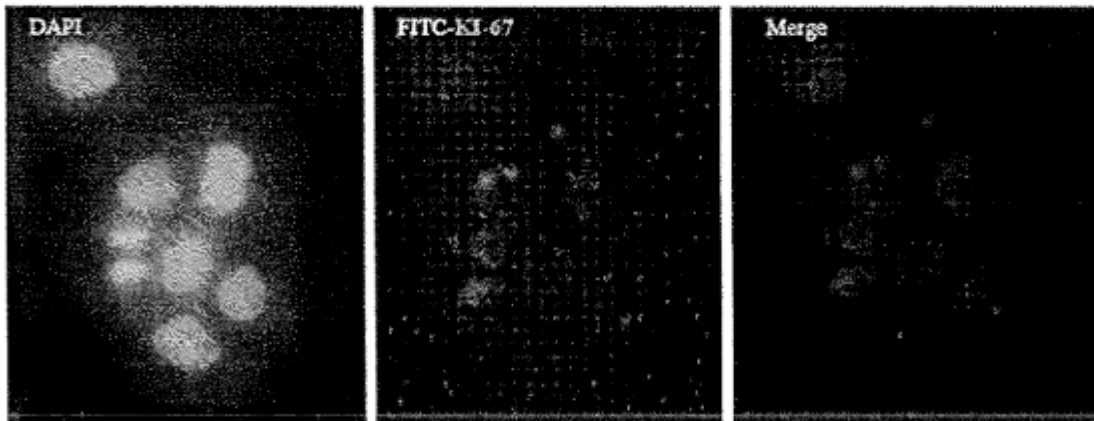


Fig. 4

Control



Tratamiento con péptido

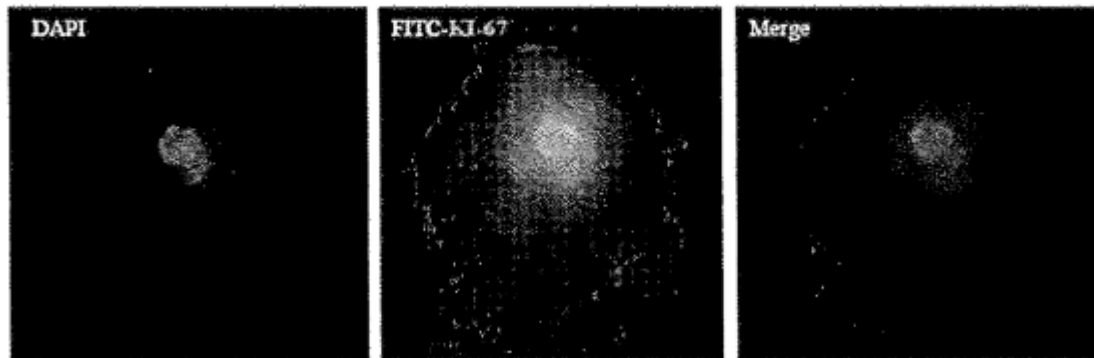


Fig. 5a

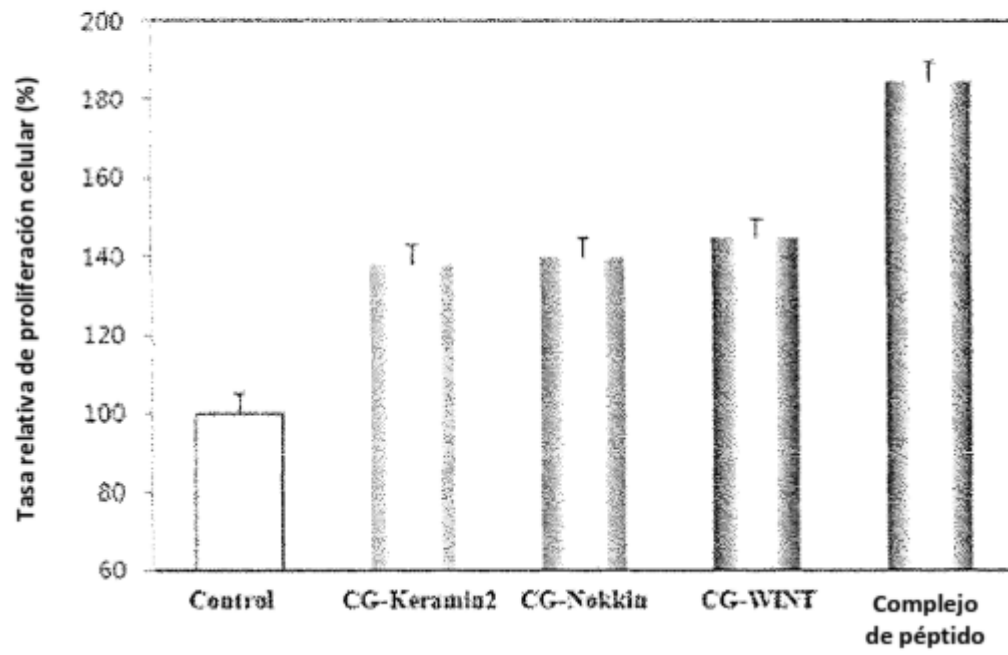


Fig. 5b

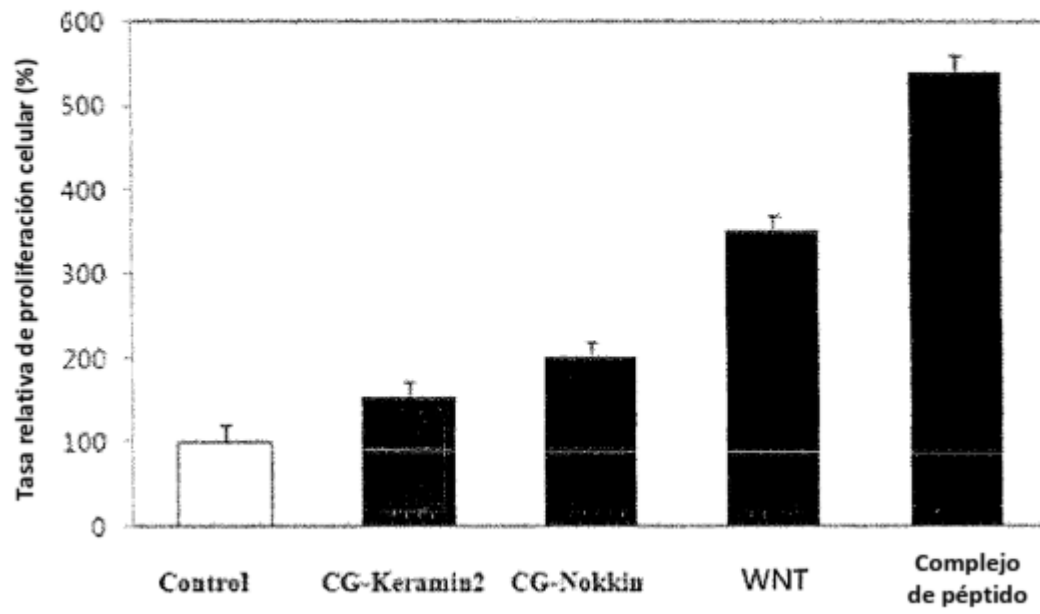


Fig. 6a

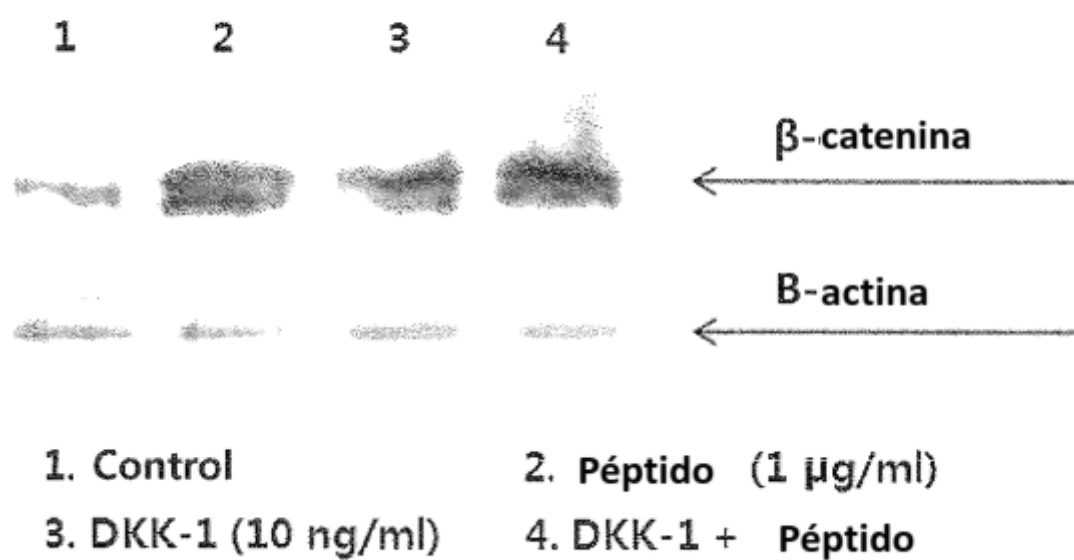


Fig. 6b

Control



Tratamiento con péptido

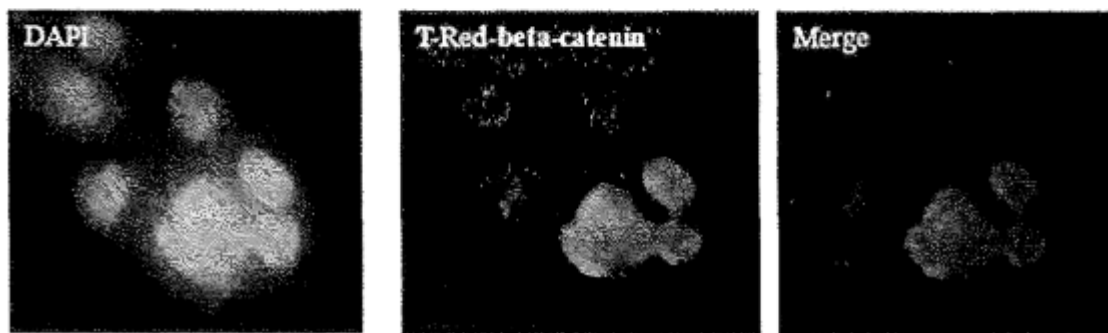


Fig. 7

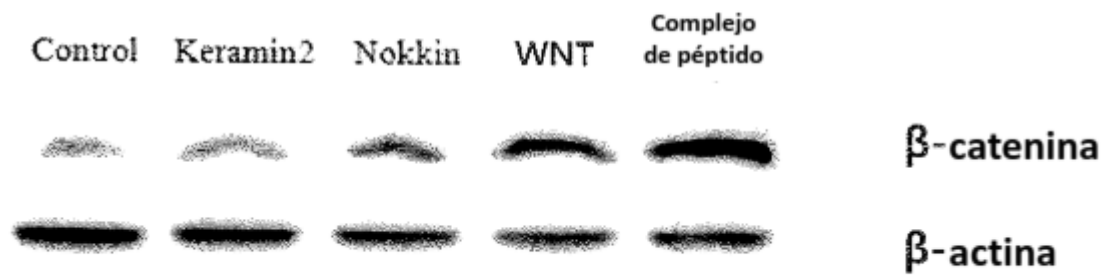


Fig. 8

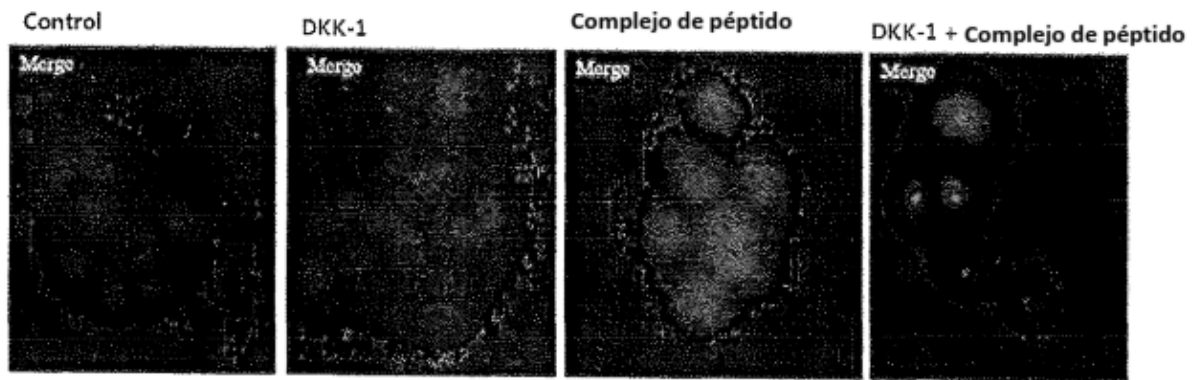


Fig. 9a

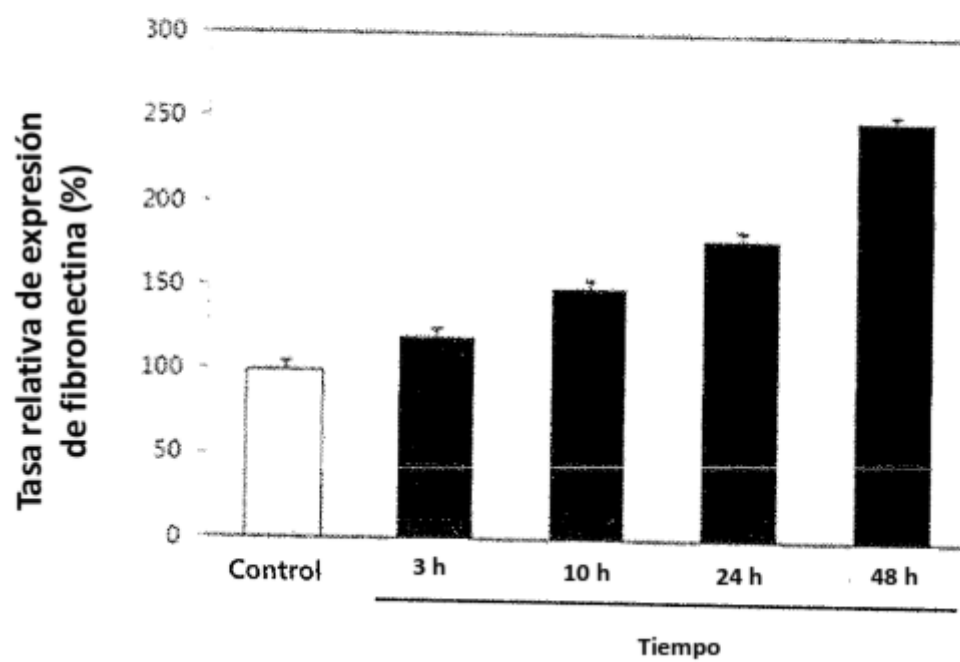


Fig. 9b

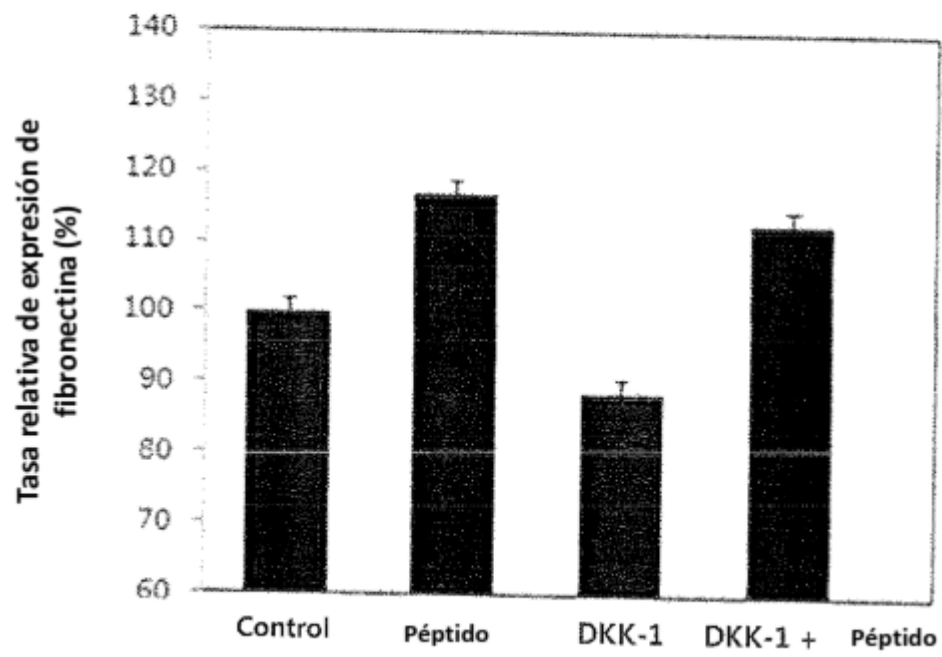


Fig. 10

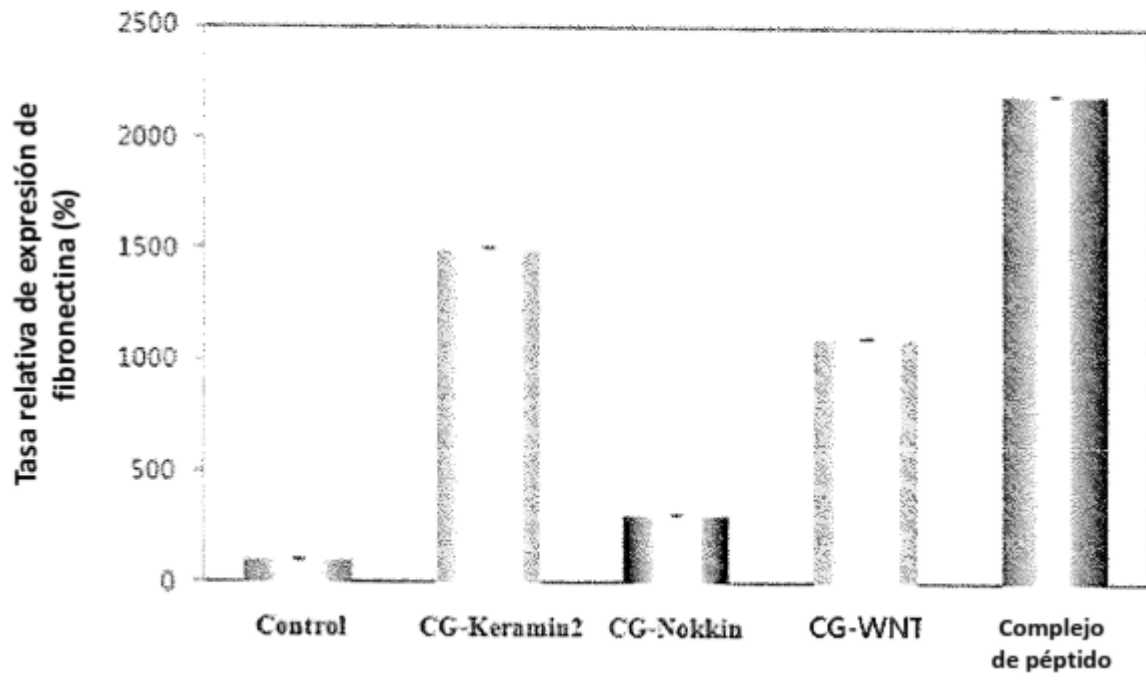


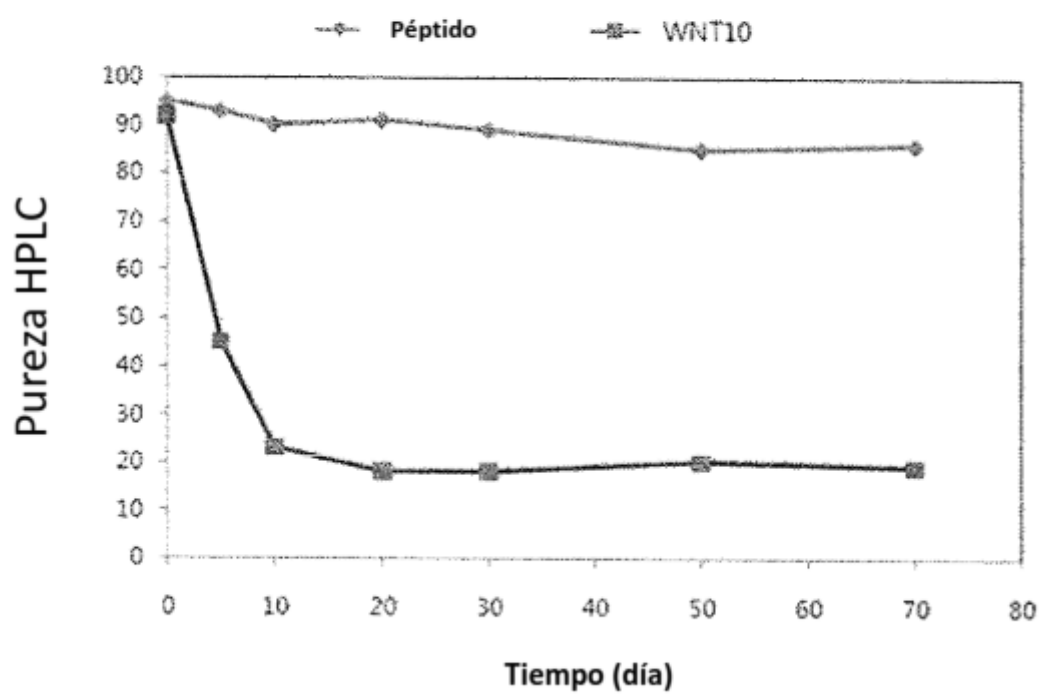
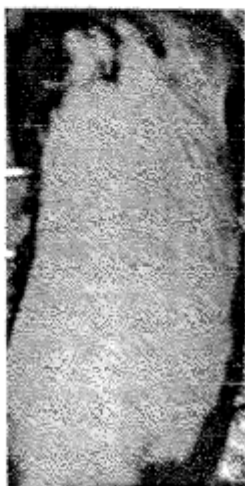
Fig. 11

Fig. 12

Control

0 días



10 días

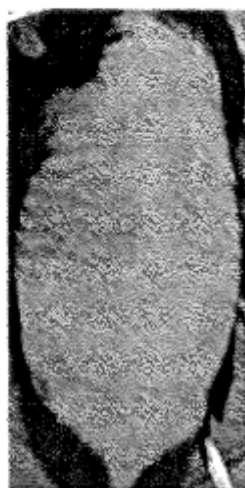


15 días



Tratamiento con péptido

0 días



10 días



15 días



Fig. 13a

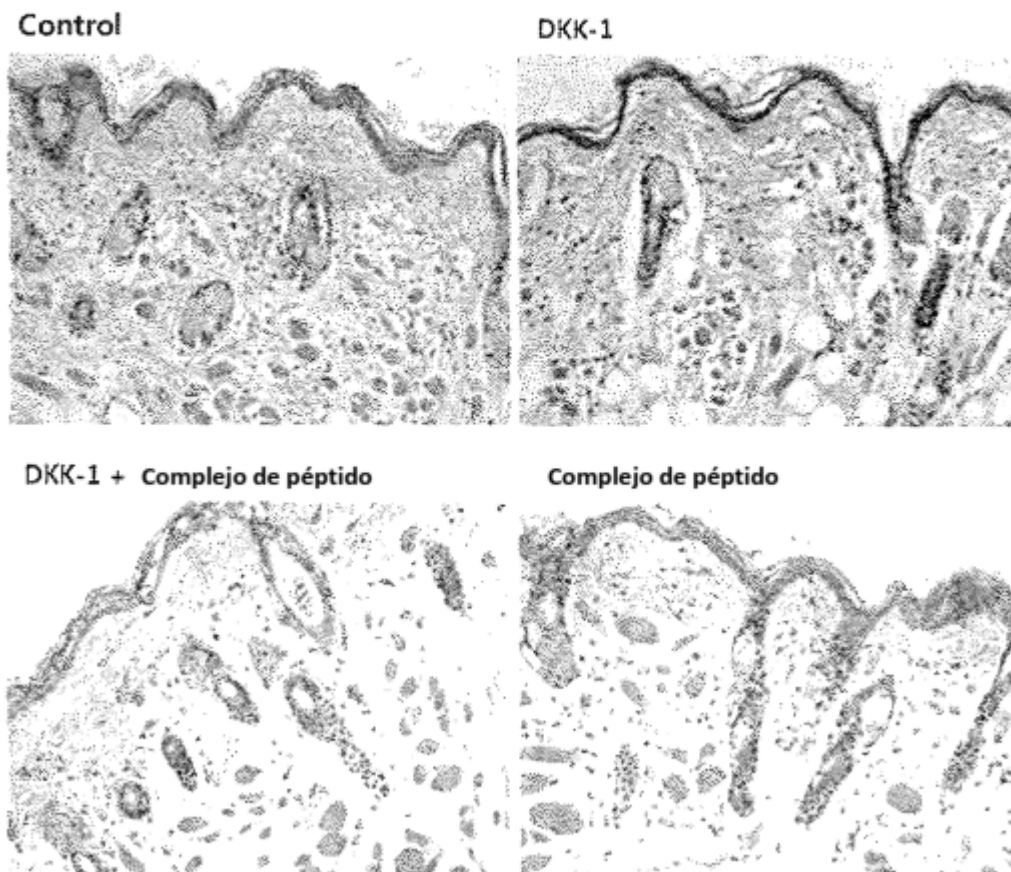


Fig. 13b

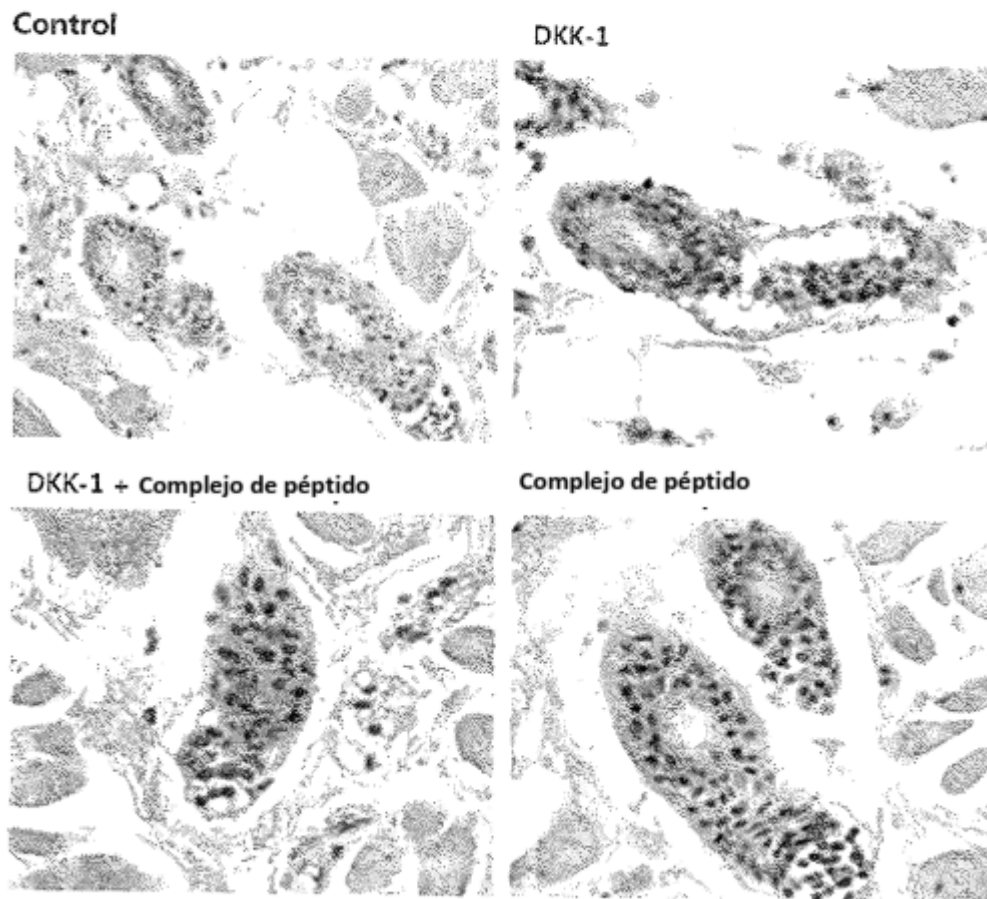


Fig. 13c

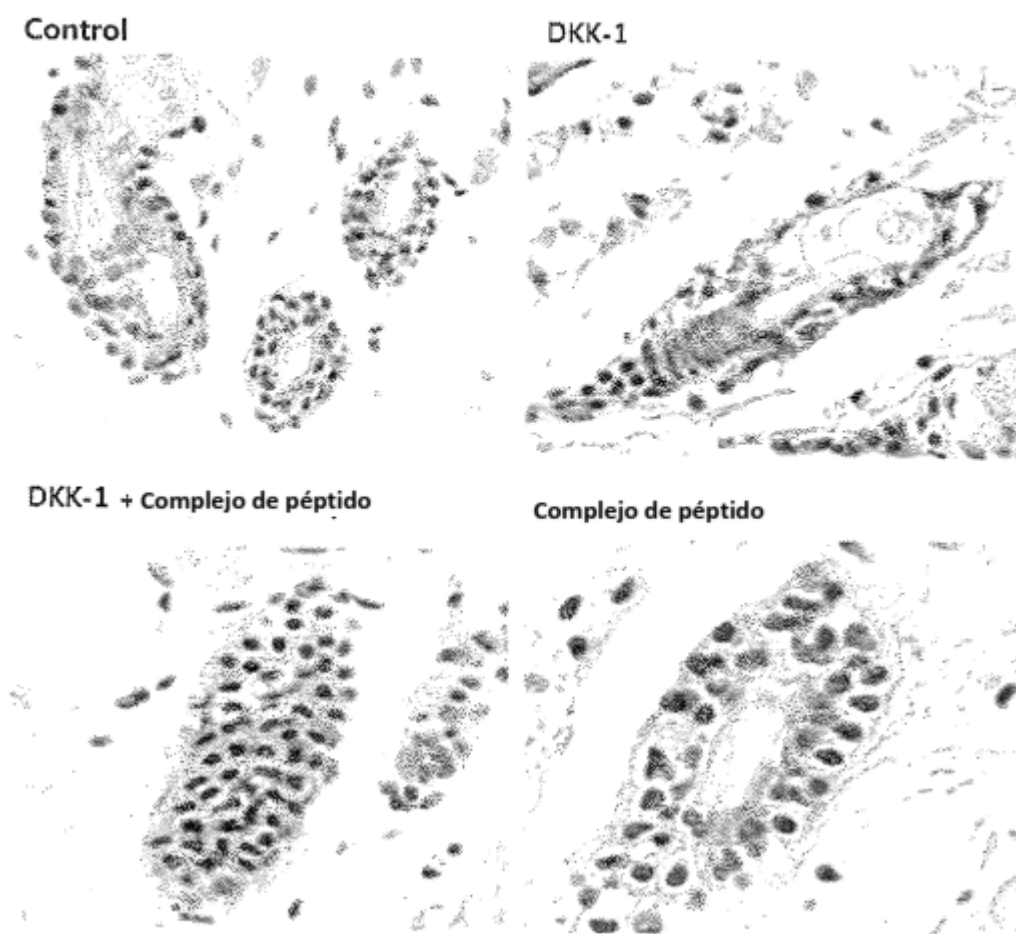


Fig. 13d

