

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 973**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61Q 7/02 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2012 PCT/KR2012/003638**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13018976**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2012 E 12820306 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2740741**

54 Título: **Péptido derivado de la familia WNT y usos de este**

30 Prioridad:

04.08.2011 KR 20110077566

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

16.01.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CHUNG, YONG JI y
KIM, EUN MI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 649 973 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 la familia WNT y usos de este

ANTECEDENTES DE LA INVENCION**CAMPO DE LA INVENCION**

- 5 La presente invención se refiere a un péptido derivado de la familia WNT y usos de este.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

10 El folículo piloso es un órgano cutáneo particular de los mamíferos, que se desarrolla desde el fondo de la epidermis primitiva hacia una capa muy interna de la piel. El grupo de células conocido como folículo o papila dérmica está en la base del folículo piloso (Stenn y Paus, *Physiol. Rev.*, 81: 449 (2002)), y la papila es esencial para la circulación normal del folículo piloso (Oliver, *Embryol. Exp. Morph.* 15: 331 (1966); Oliver, *Embryol. Exp. Morph.* 16: 231 (1967)) y para el crecimiento del tallo del pelo. El tallo del pelo es un conjunto de células epiteliales en forma de hebra que están compuestas por filamentos de queratina y proteínas que se agregan a los filamentos firmemente unidas a ellos.

15 El cabello humano sigue un ciclo de crecimiento con tres fases diferenciadas: las fases anágena, catágena y telógena. El ciclo de crecimiento del cabello está regulado por hormonas o numerosos factores de crecimiento. La malnutrición o estrés agudos pueden adelantar las fases catágena y telógena, lo que deriva en una grave pérdida de cabello (alopecia) (Vladimir A. Botchkarev, *American Journal of Pathology*, 162 (3): 709-712 (2003)). En la calvicie de patrón masculino, los folículos pilosos en la parte delantera y superior del cuero cabelludo son sensibles al andrógeno, que provoca que los folículos se miniaturicen, lo que da como resultado la pérdida de cabello. Resumiendo, la secreción excesiva de andrógeno activa la 5- α -reductasa, que provoca que la testosterona se convierta 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 deriva en pérdida del cabello. Se ha supuesto que aproximadamente un 20% de mujeres con pérdida de cabello padecen unos pocos trastornos denominados "calvicie de patrón femenino", donde el cabello a menudo se vuelve más fino en la parte superior del cuero cabelludo. Además, la pérdida de cabello se vuelve más amplia con el envejecimiento. Por ejemplo, una grave pérdida de cabello puede estar causada por diversos trastornos tales como alopecia cicatricial o estados cicatriciales que incluyen quemaduras o lesión por compresión. Sea cual sea la causa, aunque la presencia de la mujer en la población activa se ha incrementado y los hombres se han preocupado por su aspecto, la pérdida de cabello puede tener marcados impactos psicológicos, sociales y sexuales, así como una pérdida de amor propio y orgullo. Aunque se han utilizado varios medicamentos para tratar la pérdida de cabello, estos son demasiado caros o provocan efectos adversos muy diferentes entre individuos. Además, es necesario tomar estos fármacos de manera constante. En este sentido, uno de los inconvenientes importantes es que la pérdida de cabello puede estar causada por la interrupción de su uso. Por su parte, otro demérito es que sus eficacias y efectos secundarios pueden ser bastante diferentes entre individuos.

- 35 Por lo tanto, en este campo industrial se necesita desarrollar principios activos novedosos más eficaces y baratos.

Las materias primas utilizadas en los productos cosméticos tienen la ventaja de ser asequibles, si bien no dan buenos resultados puesto que se componen de componentes derivados de extractos vegetales. Hasta la fecha se tiene constancia de que dos fármacos comerciales (minoxidil y finasterida) pueden retrasar solamente una pérdida de cabello adicional. Sin embargo, no se dispone de ningún medicamento concreto que haya podido ser útil para inducir la regeneración de folículos pilosos nuevos en la práctica. Muchos cosméticos del cuero cabelludo para prevenir la pérdida de cabello se han comercializado en el mercado, por ejemplo, incluidos: (a) un producto que incluye un extracto vegetal derivado de la sófora, pimiento picante, hierba *Swertia*, *Morus alba*, hoja de morera, ginseng, regaliz, peonía, dedalera, hinojo, *Cornus officinalis*, ajo y así sucesivamente; (b) una composición que contiene xantinas y hormonas de crecimiento no solo para mejorar el metabolismo celular suprimido por el exceso de dihidrotestosterona (DHT), sino también para facilitar el crecimiento de cabello mediante la inhibición de la pérdida de 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 al cabello para prevenir la pérdida de cabello y promover el crecimiento de cabello y (d) se ha desarrollado un producto para la calvicie de patrón masculino 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 del andrógeno y para contribuir al metabolismo del cabello. Sin embargo, estos tienen una escasa influencia en la producción de cabello nuevo. Como otro ejemplo, un grupo de investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Jikei en Tokio, Japón, ha desarrollado el producto utilizando ácido corosólico del que se tiene constancia que es eficaz en la diabetes, el cual inhibe las 5- α -reductasas y muestra un efecto excelente en el crecimiento del cabello.

Muchos factores están asociados entre sí en el crecimiento y la degeneración del cabello. Para la producción del

cabello, los investigadores de la presente han estudiado factores de crecimiento seriales que tienen actividad para: (a) promover la proliferación de queratinocitos, que es muy importante para la producción de la raíz capilar; (b) inducir la diferenciación del cabello; (c) suministrar nutrientes en las proximidades del cabello y (d) activar los factores de crecimiento endotelial vascular.

5 De estos, la WNT de origen humano afecta específicamente al desarrollo del cabello transfiriendo una señal a una célula. La vía de transducción de señales WNT se activa mediante una interacción entre la proteína WNT secretada y la proteína Frizzled que es un receptor de esta. En este sentido, las proteínas relacionadas con el receptor de LDL (LRP5 y LRP6) funcionan como correceptor (*Clin. Cancer Res.* 2007; 13 (14) 15 de julio, 2007, *WNT Signalling Pathway and Stem Cell Signalling Network*). Los efectos posteriores en la vía de transducción de señales WNT incluyen la participación del complejo Axina- β -catenina-GSK3 β mediante la activación de la proteína DVL (Dishevelled) y Akt (Fukumoto *et al.*, *J. Biol. Chem.*; 276: 17479-17483 (2001)). Posteriormente, el GSK3 β se inactiva mediante fosforilación, lo que da como resultado la inhibición de la fosforilación y degradación de la β -catenina. Las β -cateninas acumuladas se trasladan a un núcleo y a continuación interactúan con los factores de transcripción del factor potenciador linfoide-factor de células T (LEF-TCF), lo que permite inducir la transcripción de los genes objetivo. Las proteínas resultantes pueden tener una función crítica para el crecimiento y la diferenciación del cabello, y permiten que se produzcan nuevas células capilares. Además, estas disminuyen las actividades de la DHT producida por la hormona masculina (andrógeno) para suprimir la pérdida de cabello.

El documento WO2008093646 describe un péptido que comprende un aminoácido de: Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Arg Thr Arg Thr Gin Arg Val Thr Glu Arg Cys Asn Cys. Además, el efecto técnico del documento WO2008093646 es que dicha secuencia es útil para regular la proliferación o diferenciación de una célula madre tal como una célula madre neural y una célula madre hematopoyética, o el tratamiento del cáncer, una enfermedad neurológica u otras enfermedades tales como la diabetes.

El documento WO2004032838 describe un péptido Wnt-1 humano que se solapa con 12 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 de la presente solicitud. El efecto técnico del péptido Wnt-1 humano del documento WO2004032838 es que un anticuerpo que se une específicamente a una proteína Wnt humana es útil para inhibir la proliferación de células cancerosas que sobreexpresen una proteína Wnt.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE ESTA INVENCIÓN

Con el fin de desarrollar péptidos que tengan acciones idénticas a la proteína WNT humana de origen natural, así como que tengan una actividad, estabilidad y penetración cutánea más potenciadas en comparación con la proteína WNT de origen natural, los inventores de la presente han llevado a cabo investigaciones intensivas. Como resultado, los inventores de la presente han descubierto varios péptidos relacionados con la WNT que tienen las excelentes características descritas anteriormente basándose en la secuencia de aminoácidos de la proteína WNT de origen natural, con lo que han completado finalmente la presente invención.

Por consiguiente, es un objeto de esta invención proporcionar un péptido compuesto esencialmente por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo compuesto por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:1.

Es otro objeto de esta invención proporcionar una composición para mejorar las afecciones cutáneas que contiene el péptido mencionado anteriormente de esta invención como principio activo.

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

En un aspecto de esta invención, se proporciona un péptido compuesto esencialmente por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo compuesto por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:1.

Con el fin de desarrollar péptidos que tengan acciones idénticas a la proteína WNT humana de origen natural, así como que tengan una actividad, estabilidad y penetración cutánea más potenciadas en comparación con la proteína WNT de origen natural, los inventores de la presente han llevado a cabo investigaciones intensivas. Como resultado, los inventores de la presente han descubierto varios péptidos relacionados con la WNT que tienen las excelentes características descritas anteriormente basándose en la secuencia de aminoácidos de la proteína WNT de origen natural, con lo que han completado finalmente la presente invención.

El péptido de la presente invención provenía de la proteína WNT humana y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo compuesto por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. Preferentemente, el péptido de esta invención está compuesto esencialmente por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo compuesto por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. El término "péptido" utilizado en la presente se refiere a una molécula lineal formada por la unión entre residuos de aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar por procesos de síntesis química convencionales conocidos por un experto 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*, 2.^a edición, Pierce Chem. Co.: Rockford, 111 (1984)).

5 Los péptidos de la presente invención se pueden preparar prediciendo en primer lugar una parte de una proteína que pueda unirse a un receptor mediante síntesis parcial aleatoria de varias partes de la proteína WNT y a continuación optimizando una secuencia de aminoácidos de la parte predicha. Posteriormente, se criban los péptidos candidatos que tienen la actividad más excepcional para aislar los péptidos de esta invención.

10 El péptido de la SEQ ID NO:1 (péptido-1) no solo tiene acciones similares a la proteína WNT de origen natural, sino que también muestra actividades de factor de crecimiento mediante la unión a un receptor.

Los péptidos de esta invención de por sí tienen una estabilidad superior a la proteína WNT de origen natural.

De acuerdo con una realización preferible, los péptidos de esta invención tienen un grupo protector en su extremo N-terminal seleccionado del grupo compuesto por un grupo acetilo, grupo fluorenilmetoxicarbonilo, grupo formilo, grupo palmitoilo, grupo miristilo, grupo estearilo y polietilenglicol (PEG).

15 Las modificaciones de los péptidos descritos anteriormente aumentan enormemente la estabilidad de los péptidos de esta invención. El término "estabilidad" utilizado en la presente se refiere a la estabilidad *in vivo* y también a la estabilidad de almacenamiento (p. ej., estabilidad de almacenamiento a temperatura ambiente). El grupo protector descrito anteriormente protege a los péptidos del ataque de proteasas *in vivo*.

20 Como se demuestra en los Ejemplos expuestos más adelante, los péptidos relacionados con factores de crecimiento de la presente invención tienen una actividad estimuladora de la proliferación celular en queratinocitos, fibroblastos o folículos pilosos y siguen la señalización de β -cateninas como vía de señalización representativa de la proteína WNT. Se pudo verificar que el péptido de la presente invención permite que la vía de señalización WNT se encuentre activa a pesar de la presencia de DKK-1 como inhibidor de WNT. Además, la expresión de la fibronectina como gen objetivo de la WNT fue aumentada por el péptido de la presente. Además, se pudo demostrar que el péptido de la presente invención contribuye a la expresión de la fibronectina aumentada incluso en presencia de DKK-1. De acuerdo con los experimentos en animales basados en los resultados mencionados anteriormente, se pudo apreciar que el péptido de la presente invención promueve de forma significativa el crecimiento de cabello.

En otro aspecto de esta invención, se proporciona una composición para mejorar las afecciones cutáneas que contiene el péptido de esta invención como principio activo.

30 En otro aspecto más de esta invención, se proporciona un método para mejorar las afecciones cutáneas que comprende administrar a un sujeto el péptido de esta invención.

De acuerdo con una realización preferible, la mejora en las afecciones cutáneas con el péptido de la presente es una mejora en las arrugas o elasticidad de la piel, prevención del envejecimiento cutáneo, mejora en la hidratación de la piel o regeneración de la piel.

35 En otro aspecto de esta invención, se proporciona una composición para prevenir o tratar un trastorno relacionado con la vía de transducción de señales WNT, que contiene el péptido de esta invención como principio activo.

En otro aspecto más de esta invención, se proporciona un método para prevenir o tratar un trastorno relacionado con la vía de transducción de señales WNT, que comprende administrar a un sujeto el péptido de esta invención.

40 En otro aspecto adicional más de esta invención, se proporciona un uso del péptido de esta invención para fabricar un medicamento con el fin de prevenir o tratar un trastorno relacionado con la vía de transducción de señales WNT.

45 De acuerdo con una realización preferible, el trastorno relacionado con la vía de transducción de señales WNT incluye un trastorno óseo, una enfermedad asociada con el desarrollo óseo, una fractura ósea, una osteoporosis senil, condrodistrofia, hipercalcemia, hiperostosis, osteogénesis imperfecta, osteomalacia, osteomielitis, osteoporosis, enfermedad ósea de Paget, osteoartritis, raquitismo u obesidad. Más preferentemente, el trastorno relacionado con la vía de transducción de señales WNT incluye la osteoporosis, enfermedad ósea u obesidad.

En otro aspecto de esta invención, se proporciona una composición para prevenir o tratar un trastorno relacionado con la proteína DKK-1 (un antagonista de la vía de señalización WNT) que contiene el péptido de esta invención como principio activo.

50 En otro aspecto más de esta invención, se proporciona un método para prevenir o tratar un trastorno relacionado con la proteína DKK-1 (un antagonista de la vía de señalización WNT) que comprende administrar a un sujeto el péptido de esta invención.

En otro aspecto adicional más de esta invención, se proporciona un uso del péptido de esta invención para fabricar un medicamento con el fin de prevenir o tratar un trastorno relacionado con la proteína DKK-1 (un antagonista de la vía de señalización WNT).

5 De acuerdo con una realización preferible, el trastorno relacionado con la proteína DKK-1 incluye la resistencia a la insulina, hipoinsulinemia, hiperinsulinemia, diabetes u obesidad.

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

10 La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" utilizada en la presente se refiere a una cantidad suficiente para mostrar y lograr eficacias y actividades del péptido relacionado con factores de crecimiento de esta invención.

15 El portador farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente invención, que se utiliza comúnmente en las formulaciones farmacéuticas, pero sin carácter limitante, incluye lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato potásico, arginato, gelatina, silicato potásico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabes, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato magnésico y aceites minerales. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede incluir además un lubricante, un humectante, un edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión y un conservante. Los detalles sobre las formulaciones y portadores farmacéuticamente aceptables se pueden encontrar en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19.^a edición, 1995), que se incorpora a la presente por referencia.

20 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede administrar oral o parenteralmente y preferentemente se administra parenteralmente, p. ej., mediante administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, local o transdérmica.

25 Una cantidad posológica adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar en función de los métodos de formulación farmacéutica, métodos de administración, la edad del paciente, peso corporal, sexo, estado patogénico, dieta, tiempo de administración, vía de administración, tasa de excreción y sensibilidad a una composición farmacéutica utilizada. Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar con una posología diaria de 0.001-1000 mg/kg.

30 De acuerdo con las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede formular con un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable según se ha descrito anteriormente, para proporcionar finalmente varias formas, una forma de dosis unitaria y una forma de dosis múltiple. Algunos ejemplos no limitantes de las formulaciones incluyen, sin carácter limitante, 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 pueden comprender además un agente dispersante o un estabilizante.

35 De acuerdo con la presente divulgación, la composición es una composición cosmética que contiene: (a) una cantidad cosméticamente eficaz del péptido relacionado con factores de crecimiento de la presente invención y (b) un portador cosméticamente aceptable.

La expresión "cantidad cosméticamente eficaz" utilizada en la presente se refiere a una cantidad suficiente para lograr eficacias o mejoras en las afecciones cutáneas descritas anteriormente en la presente.

40 Las composiciones cosméticas de esta divulgación se pueden formular en una amplia variedad de formas, por ejemplo, que incluyen una disolución, una suspensión, una emulsión, una pasta, un ungüento, un gel, una crema, una loción, un polvo, un jabón, un limpiador que contiene surfactantes, un aceite, una base de maquillaje en polvo, una base de maquillaje en emulsión, una base de maquillaje en cera y un aerosol. De forma específica, las composiciones cosméticas de esta divulgación se pueden formular en forma de suavizante para la piel, líquido nutritivo, crema nutritiva, crema de masaje, esencia, crema de ojo, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, compresa, aerosol o polvo.

Cuando 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 zinc o mezclas de estas sustancias.

50 En la formulación del polvo o aerosol, puede incluir lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio, poliamida en polvo y mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden comprender además los propelentes habituales, por ejemplo, clorofluorohidrocarburos, propano/butano o éter dimetílico.

La formulación de la disolución y la emulsión puede incluir 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 y glicerol, polietilenglicol y ésteres de ácidos grasos y sorbitán.

5 La formulación de la suspensión puede contener diluyentes líquidos, por ejemplo, agua, etanol o propilenglicol, agentes de suspensión, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de polioxietilensorbitol y ésteres de polioxietilensorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias.

10 La formulación de las composiciones limpiadoras con surfactante puede contener un sulfato de alcohol alifático, éter sulfato de alcohol alifático, monoéster de sulfosuccinato, isotinato, derivados de imidazolio, taurato de metilo, sarcocinato, éter sulfato de amida de ácido graso, alquilamidobetaína, alcohol alifático, glicérido de ácido graso, dietanolamida de ácido graso, aceite vegetal, derivados de lanolina, éster de ácido graso y glicerol etoxilado o mezclas de estos ingredientes.

Además, las composiciones cosméticas de esta divulgación pueden contener auxiliares, así como también péptidos como portadores y principios activos. Los ejemplos no limitantes de auxiliares incluyen conservantes, antioxidantes, estabilizantes, solubilizantes, vitaminas, colorantes, agentes para mejorar el olor o mezclas de estas sustancias.

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

- 15 (i) el péptido derivado de WNT de la presente invención posee actividades idénticas o similares a la WNT de origen natural;
- (ii) los péptidos de la presente invención tienen una estabilidad y potencia de penetración cutánea muy superiores a la WNT de origen natural;
- 20 (iii) la sobresaliente actividad y estabilidad del péptido de la presente descrito anteriormente puede ser enormemente ventajosa en la aplicación a composiciones farmacéuticas, cuasifármacos y cosméticos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La Fig. 1 representa los resultados de los análisis por HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento, por sus siglas en inglés) de los péptidos de la SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4) preparados en el Ejemplo de preparación.

La Fig. 2a es un gráfico que representa un efecto estimulador en el crecimiento de queratinocitos tratados con los péptidos de la SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4) preparados en el Ejemplo de preparación.

30 La Fig. 2b es un gráfico que representa un efecto estimulador en el crecimiento de fibroblastos tratados con los péptidos de la SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4) preparados en el Ejemplo de preparación.

La Fig. 2c es un gráfico que representa un efecto estimulador en el crecimiento de células en los folículos pilosos tratados con los péptidos de la SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4) preparados en el Ejemplo de preparación.

35 La Fig. 3a es una imagen de microscopio que demuestra los efectos de los péptidos de la [SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4)] para promover el crecimiento de los queratinocitos.

40 La Fig. 3b es una imagen de microscopio que demuestra los efectos de los péptidos de la [SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4)] para promover el crecimiento de los fibroblastos.

La Fig. 3c es una imagen de microscopio que demuestra los efectos de [SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4)] para promover el crecimiento de células en los folículos pilosos.

45 La Fig. 4 son datos que demuestran el aumento de la fosforilación de LRP5 por el tratamiento con los péptidos de la [SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4)].

La Fig. 5a son datos que demuestran el aumento de la actividad β -catenina por el tratamiento con los péptidos de la [SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4)].

La Fig. 5b es un análisis por inmunoelectrotransferencia que representa la expresión de β -catenina a pesar de la presencia de DKK-1 (un inhibidor de WNT y gen de la pérdida de cabello) por el tratamiento con los péptidos de la

[SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4)].

La Fig. 6 son datos que representan la actividad del factor de transcripción LEF-1 por el tratamiento con los péptidos de la [SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4)].

5 La Fig. 7a es un gráfico que representa que la expresión de fibronectina se eleva gradualmente por el tratamiento con los péptidos de la [SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4)] con el lapso de tiempo.

10 La Fig. 7b representa un gráfico que mide los cambios en la expresión de fibronectina por el péptido de la presente. Se mostró que la expresión de la fibronectina inhibida por la DKK-1 (un inhibidor de la WNT y gen de la pérdida de cabello) fue restablecida y aumentada por la adición de los péptidos de la [SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4)].

La Fig. 7c es una imagen de una inmunotinción que representa la presencia del péptido en las células cuando se tratan con los péptidos de la [SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4)].

15 La Fig. 8 representa que el péptido de la [SEQ ID NO:1 (péptido-1), SEQ ID NO:2 (péptido-2), SEQ ID NO:3 (péptido-3) y SEQ ID NO:4 (péptido-4)] tiene una actividad para promover el crecimiento de cabello en la piel del lomo de ratón.

EJEMPLOS

EJEMPLO DE PREPARACIÓN 1: Síntesis de Leu-Cys-Cys-Gly-Arg-Gly-His-Arg-Thr-Arg-Thr-Gln-Arg (SEQ ID NO:1) y otros péptidos

20 Se introdujeron 700 mg de resina de cloruro de clorotritilo (resina CTL, Nova Biochem. N.º de cat. 01-64-0021) en un reactor, al que se añadieron 10 mL de cloruro de metileno (MC), y después se agitó durante 3 min. Después de retirar la disolución, se añadieron 10 mL de dimetilformamida (DMF) al resultante y a continuación se agitó durante 3 min, tras lo cual se eliminó el disolvente. Se añadieron 10 mL de disolución de diclorometano al reactor y a continuación se añadieron 200 mmol de Fmoc-Arg(pbf)-OH (Bachem, Suiza) y 400 mmol de DIEA (*N,N'*-diisopropiletilamina) al reactor, tras lo cual la mezcla se disolvió mediante agitación y la reacción se llevó a cabo entonces con agitación durante 1 h. Después de lavar, se hicieron reaccionar metanol y DIEA (2:1) disueltos en DCM (diclorometano) con la resina durante 10 min y a continuación el resultante se lavó utilizando un exceso de DCM/DMF (1:1). Tras retirar la disolución, se añadieron 10 mL de DMF al resultante, se agitó durante 3 minutos y después se retiró el disolvente. Se añadieron 10 mL de una disolución de desprotección (20% de piperidina/DMF) al reactor, se agitaron durante 10 min a temperatura ambiente y después se eliminó la disolución. Después de añadir el mismo volumen de disolución de desprotección, se llevó a cabo la reacción durante 10 min y se retiró la disolución, a lo que siguió un lavado secuencial con DMF (3 veces), MC (1 vez) y DMF (1 vez) para proporcionar las resinas Arg(pbf)-CTL. Se añadieron 10 mL de disolución de DMF a un nuevo reactor y a continuación se añadieron 200 mmol de Fmoc-Gln(trt)-OH (Bachem, Suiza), 200 mmol de HOBt y 200 mmol de Bop, seguidos de agitación para su solubilización. Se añadieron 400 mmol de DIEA al reactor dos veces como una fracción y se agitó durante al menos 5 min para disolver todos los contenidos sólidos. La disolución de aminoácidos disueltos se introdujo en el reactor que contenía la resina desprotegida y la reacción se llevó a cabo con agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Tras retirar la disolución de reacción, el resultante se agitó tres veces (cada una durante 5 min) con una disolución de DMF para retirar los componentes residuales no reaccionados. Se tomó una pequeña cantidad de la resina que había reaccionado para evaluar el grado de las reacciones con la prueba de la ninhidrina. Utilizando la disolución de desprotección, se llevó a cabo la desprotección dos veces de la misma manera que se ha descrito anteriormente para proporcionar la resina Gln(trt)-Arg(pbf)-CTL. Tras lavar con DMF y MC, se llevó a cabo una prueba adicional de la ninhidrina y se realizaron las uniones secuenciales de los siguientes aminoácidos según se ha descrito anteriormente. Basándose en la secuencia de aminoácidos diseñada por los inventores de la presente, se unieron secuencialmente Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Arg(pbf), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Arg(pbf), Fmoc-His(trt), Fmoc-Gly, Fmoc-Arg(pbf), Fmoc-Gly, Fmoc-Cys, Fmoc-Cys y Fmoc-Leu a las resinas. El grupo protector Fmoc se eliminó mediante incubación exhaustiva con la disolución de desprotección dos veces durante 10 min. Para la acetilación, se incubaron anhídrido acético, DIEA y HOBt con las resinas peptídicas durante 1 h. Las resinas peptídicas preparadas se lavaron tres veces con DMF, MC y metanol, respectivamente, y se secaron gradualmente en atmósfera de nitrógeno, tras lo cual se secaron completamente al vacío con P₂O₅. Las resinas secadas se hicieron reaccionar con 30 mL de disolución de salida [que contenía un 95% de ácido trifluoroacético (TFA), 2.5% de agua destilada, 2.5% de tioanisol] durante 2 h a temperatura ambiente con agitación intermitente. La resina se filtró y lavó con un pequeño volumen de disolución de TFA, tras lo cual el filtrado se combinó con las aguas madre. Después de la destilación a presión reducida para reducir el volumen total por dos, se indujo la precipitación utilizando 50 mL de éter frío y los precipitados formados se recolectaron por centrifugación, seguida de lavado dos veces con éter frío. Después de retirar las aguas madre, el resultante se secó por completo en atmósfera de nitrógeno para proporcionar 0.65 g de péptido no purificado 1, Leu-Cys-Cys-Gly-Arg-Gly-His-Arg-Thr-Arg-Thr-Gln-Arg (tasa de rendimiento,

92.6%). Se determinó que el peso molecular del producto final era 1543.8 (PM teórico: 1543.81) utilizando un analizador de masas. Los otros péptidos de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4 se sintetizaron también mediante el proceso descrito anteriormente (Fig. 1).

TABLA 1

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos	Valores analizados (analizador de masas)	
		Valores analizados	Valores teóricos
1 (Péptido-1)	LCCGRGHRTRTQR	1240.4	1239.5
2 (Péptido-2)	LCCGRGHNAR	1447.6	1446.5
3 (Péptido-3)	AERRRELCRC	1240.4	1239.5
4 (Péptido-4)	LCCGRGHNVL	1447.6	1446.5

5

EJEMPLO EXPERIMENTAL 1: Influencia de los péptidos en el crecimiento celular

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

10

Los queratinocitos HaCaT, los fibroblastos NIH3T3 y las células del folículo piloso HHFDPC (cell science) se cultivaron en matraces de 250 mL que contenían DMEM (medio esencial mínimo de Eagle modificado de Dulbecco; Gibco, EE. UU.) suplementado con un 10% de FBS (suero fetal bovino, por sus siglas en inglés, Sigma). Las células cultivadas se trataron con un 1% de disolución de tripsina para desprender las células del fondo de los matraces de cultivo y se centrifugaron para recolectar los sedimentos celulares. Después de que las células se resuspendieran en DMEM que no contenía FBS, su alícuota (3×10^3 células) se añadió a cada pocillo de las placas de 96 pocillos y se cultivó con un 5% de CO₂ durante 24 h a 37 °C. Después del cultivo de 24 h, el medio se cambió por un medio fresco sin suero y las células se incubaron con una muestra vacía (para su normalización) y se disolvieron los péptidos sintetizados de forma aséptica (1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL y 10 µg/mL) en un 10% de DMSO durante 72 h en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Después de retirar los sobrenadantes, se fijaron las células con etanol y a continuación se lavaron tres veces utilizando PBS (disolución salina tamponada con fosfato), seguido de la incubación con disolución de SRB. Las células se lavaron lo suficiente con ácido acético al 1% y se observaron con un microscopio para determinar la condición de las células vivas. Además, se midió la absorbancia a 590 nm para analizar la viabilidad de las células. Por su parte, después de un cultivo en las mismas condiciones, el tejido se inmunotizó mediante un ensayo inmunohistoquímico con anticuerpo ki-67 (Santa Cruz, EE. UU.) y se observó la cantidad de proteína ki-67 como marcador de la proliferación celular.

15

20

25

La Fig. 2 demuestra que el péptido de la presente divulgación aumenta considerablemente el crecimiento de los queratinocitos (Fig. 2a), fibroblastos (Fig. 2b) y células del folículo piloso (Fig. 2c). La Fig. 3 es un resultado que representa que se observa un cambio de la forma de las células con un microscopio después de que se trataran las células con el péptido de la presente durante 72 h.

30

Como se muestra en las Fig. 2 y 3, se pudo apreciar que los péptidos de la presente divulgación promueven la proliferación de los queratinocitos, fibroblastos y células del folículo piloso y cambian sus formas morfológicas.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 2: Influencia de los péptidos en la cantidad elevada de receptor y gen de señalización

Se incubaron los queratinocitos HaCaT cultivados durante 48 h con los péptidos sintetizados en el Ejemplo de preparación 1 durante 5 h. El nivel de fosforilación del LRP5, que es el receptor de la proteína WNT, y el nivel de expresión de β -catenina, que es la molécula de señalización de la proteína WNT, se examinaron respectivamente. Las cantidades de fosfo-LRP5 y β -catenina se midieron mediante análisis de inmunoelectrotransferencia utilizando un anticuerpo contra fosfo-LRP5 (señalización celular) y β -catenina (Santa Cruz, EE. UU.). Además, también se observó el nivel de expresión del factor de transcripción LEF-1, que es aumentado por la β -catenina. El péptido de la presente invención elevó de forma significativa el nivel de fosforilación de LRP5 (Fig. 4) y también aumentó de forma significativa el nivel de expresión de la β -catenina (Fig. 5a). En primer lugar, se mostró que la actividad de la β -catenina se observa por el tratamiento con el péptido de la presente invención a pesar de la presencia de DKK-1 como inhibidor de la WNT e inhibidor de la señalización de β -catenina (Fig. 5b). También se observó que el nivel de expresión del factor de transcripción LEF-1 fue aumentado por el tratamiento de los péptidos de la presente (Fig. 6).

35

40

45

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

EJEMPLO EXPERIMENTAL 3: Influencia de los péptidos en la producción de fibronectina

5 Con el fin de verificar si los péptidos sintetizados en el Ejemplo de preparación 1 aumentan la expresión de fibronectina como proteína objetivo de la WNT, se añadieron fibroblastos NIH3T3 (4x10³ células) a cada pocillo de las placas de 96 pocillos y se cultivaron con un 5% de CO₂ durante 24 h a 37 °C. Después del cultivo de 24 h, se cambió el medio por un medio fresco sin suero y se trataron las células con una muestra vacía (para su normalización), los tres péptidos sintetizados (1 µg/mL) y un complejo peptídico (1 µg/mL) disueltos de forma
10 aséptica en un 10% de DMSO durante 3 h, 10 h, 24 h o 48 h en las mismas condiciones descritas anteriormente. Después de una incubación de 72 h, el cultivo celular se recolectó y se midió el nivel de expresión de la fibronectina utilizando un kit ELISA para fibronectina (R&D systems, EE. UU.).

Como se ha demostrado en la Fig. 7a, se reveló que los péptidos de la presente invención elevan el nivel de fibronectina en los fibroblastos con el lapso de tiempo. Además, después de que la proteína DKK-1 se tratara y cultivara en las mismas condiciones, se examinó el nivel de fibronectina. Según se muestra en la Fig. 7b, el nivel de expresión de la fibronectina se restableció y aumentó incluso en el tratamiento con tanto la proteína DKK-1 como el péptido de la presente.
15

La Fig. 7c es una imagen de una inmunotinción que representa la presencia del péptido en las células cuando los fibroblastos se trataron con los péptidos de esta invención y la existencia de los péptidos de la presente en las células se demostró con la tinción de los péptidos.
20

Considerados en conjunto, estos resultados demuestran que los péptidos de la presente invención inducen la vía de señalización WNT-β-catenina a pesar de la presencia de la proteína DKK-1 conocida como inhibidor de la WNT y gen de la pérdida de cabello, lo que contribuye a la promoción del crecimiento de cabello, inhibición de la pérdida de cabello y antienviejecimiento.

25 EJEMPLO 1: Preparación de los nanopéptidos

Se disolvieron 50 mg de cada péptido sintetizado en los Ejemplos de preparación en 500 mL de agua destilada con suficiente agitación. La disolución peptídica se mezcló con 5 g de lecitina, 0.3 mL de oleato sódico, 50 mL de etanol y una pequeña cantidad de aceites, y su volumen se ajustó a 1 L con agua destilada. La disolución resultante se sometió a un microfluidizador a presión elevada para su emulsificación, lo que proporciona así nanosomas que
30 tienen un tamaño de aproximadamente 100 nm. Los nanosomas se prepararon para que tuvieran una concentración final de aproximadamente 50 ppm y se utilizaron como ingredientes para los cosméticos.

EJEMPLO DE FORMULACIÓN 1: Suavizante para la piel

Un suavizante para la piel que comprende los nanosomas que contienen péptidos preparados en el Ejemplo 1 se formuló de acuerdo con la siguiente composición:

35

TABLA 2

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	2.5
1,3-butilenglicol	6.0
Glicerina	4.0
PEG 1500	1.0
Hialuronato sódico	1.0
Polisorbato 20	0.5
Etanol	8.0
Conservante, pigmento	Cantidad apropiada
Benzofenona-9	0.05
Perfume	Cantidad mínima

Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

EJEMPLO DE FORMULACIÓN 2: Crema nutritiva

Una crema nutritiva que comprende los nanosomas que contienen péptidos preparados en el Ejemplo 1 se formuló de acuerdo con la siguiente composición:

5

TABLA 3

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	2.5
Aceite de <i>Limnanthes alba</i>	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
Sesquiolato 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

Un líquido nutritivo que comprende los nanosomas que contienen péptidos preparados en el Ejemplo 1 se formuló de acuerdo con la siguiente composición:

10

TABLA 4

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	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
Polisorbato 60	1.5
Sesquiolato 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

Una esencia que comprende los nanosomas que contienen péptidos preparados en el Ejemplo 1 se formuló de acuerdo con la siguiente composición:

5

TABLA 5

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	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 sódico	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

ES 2 649 973 T3

<110> CAREGEN CO., LTD.

<120> Péptidos derivados de la familia WNT y usos de estos

<130> PP120050

5

<150> KR 10-2011-0077566

<151> 2011-08-04

<160> 4

10

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 1 derivado de la WNT

20

<400> 1

Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Arg Thr Arg Thr Gln
1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 2 derivado de la WNT

30

<400> 2

Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Asn Ala Arg
1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 3 derivado de la WNT

40

<400> 3

Ala Glu Arg Arg Arg Glu Leu Cys Arg Cys
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 4 derivado de la WNT

50

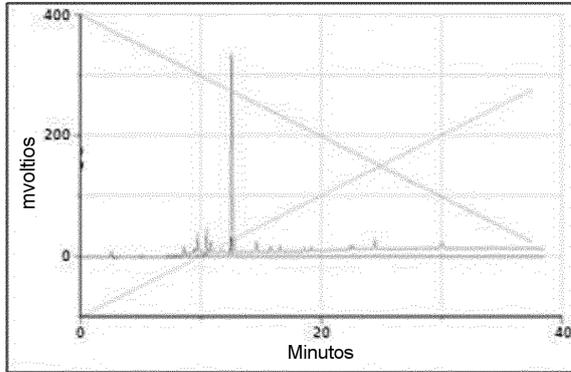
<400> 4

Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Asn Val Leu
1 5 10

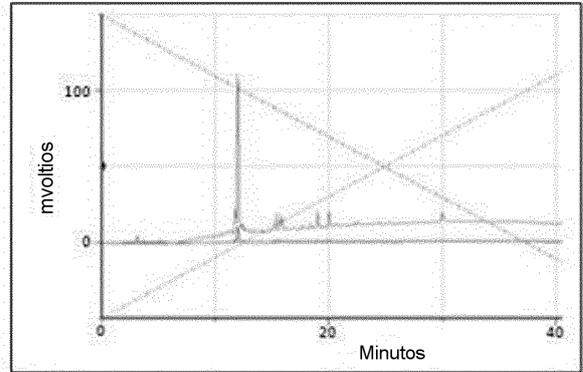
REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 para mejorar afecciones cutáneas en un sujeto, donde la mejora en las afecciones cutáneas es una mejora en las arrugas o en la elasticidad de la piel, mejora en la hidratación de la piel o regeneración de la piel, con la condición de que el uso no sea un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el péptido tiene en su extremo *N*-terminal un grupo protector seleccionado del grupo compuesto por un grupo acetilo, un grupo fluorenilmtoxycarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y un polietilenglicol (PEG).
- 10 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el péptido procede de una proteína WNT humana.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el péptido facilita la proliferación celular en fibroblastos o queratinocitos.

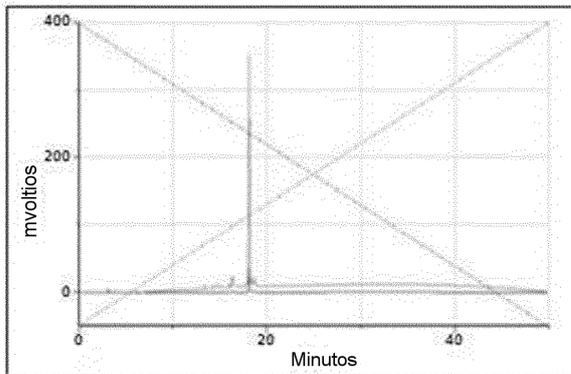
Fig. 1



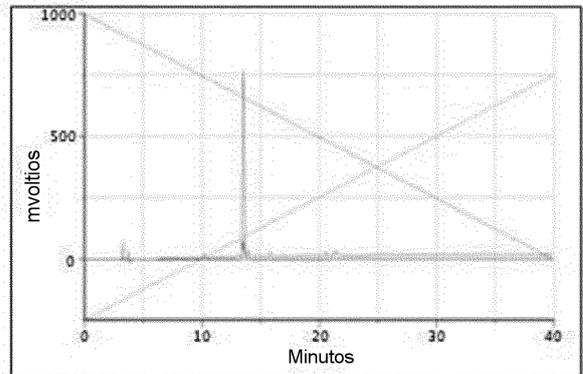
Péptido- 1



Péptido- 2



Péptido- 1



Péptido- 2

Fig. 2a

Célula queratinocítica HaCaT

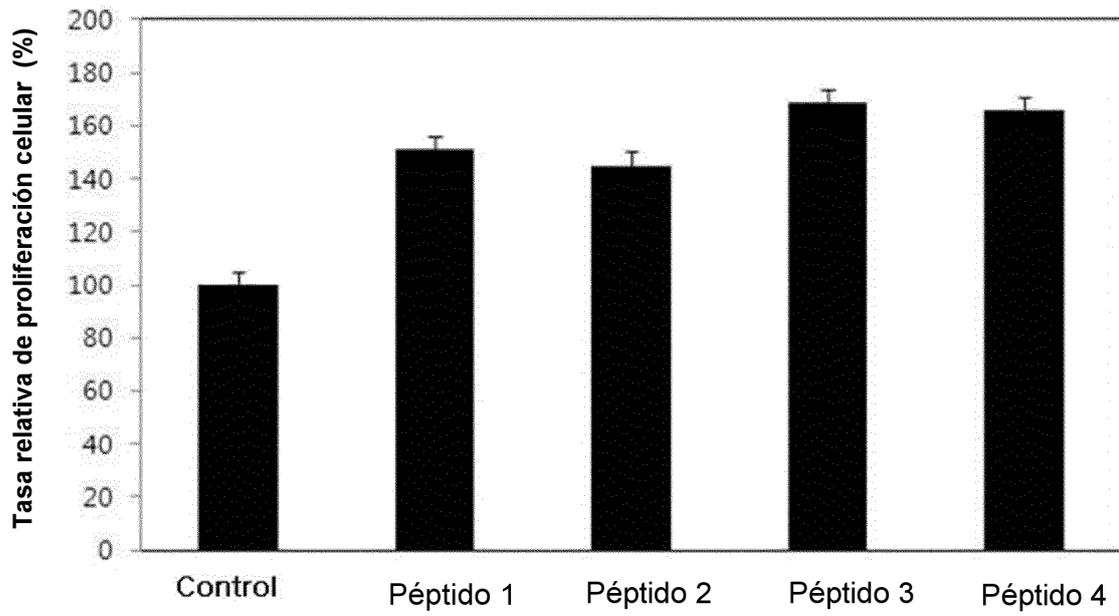


Fig. 2b

Célula fibroblástica NIH3T3

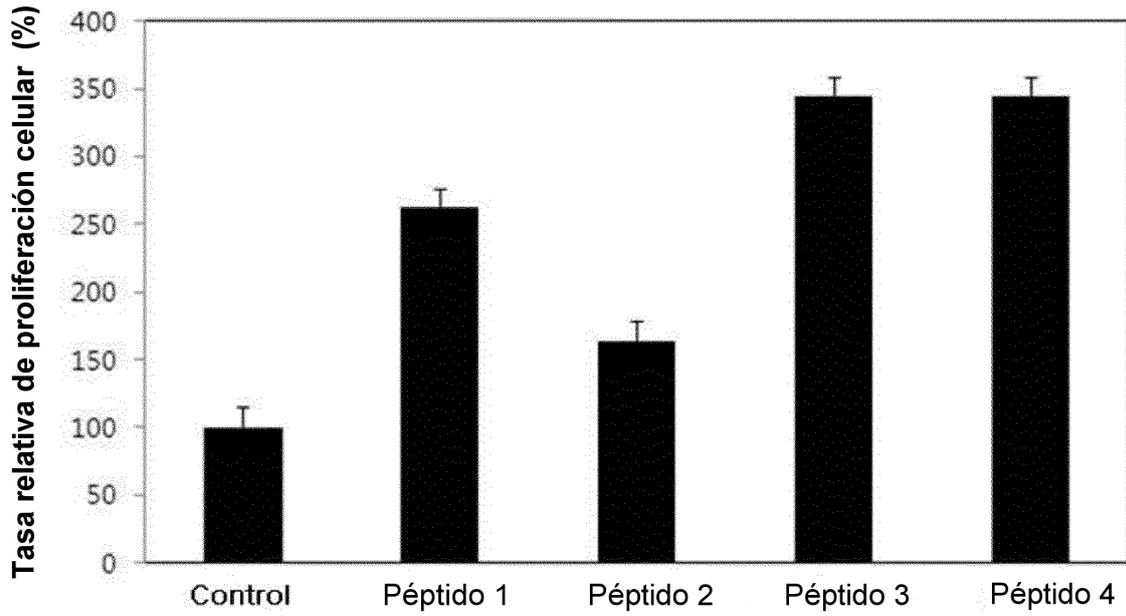


Fig. 2c

Célula de la papila dérmica del folículo piloso humano (P.3)

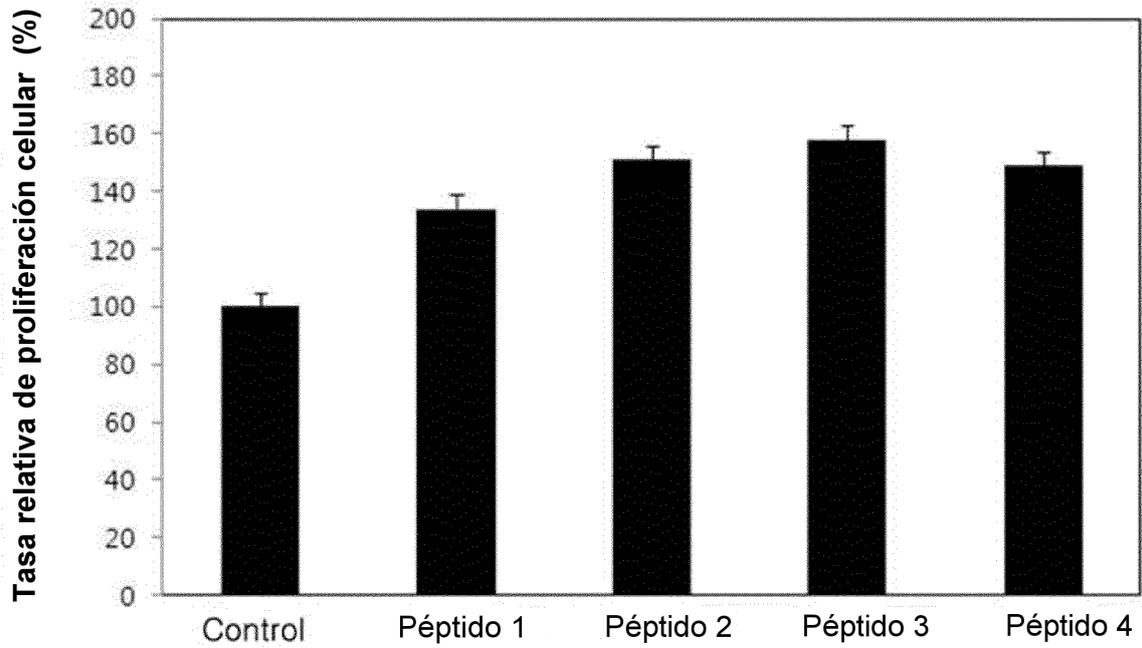


Fig. 3a

Morfología celular < Célula queratinocítica >

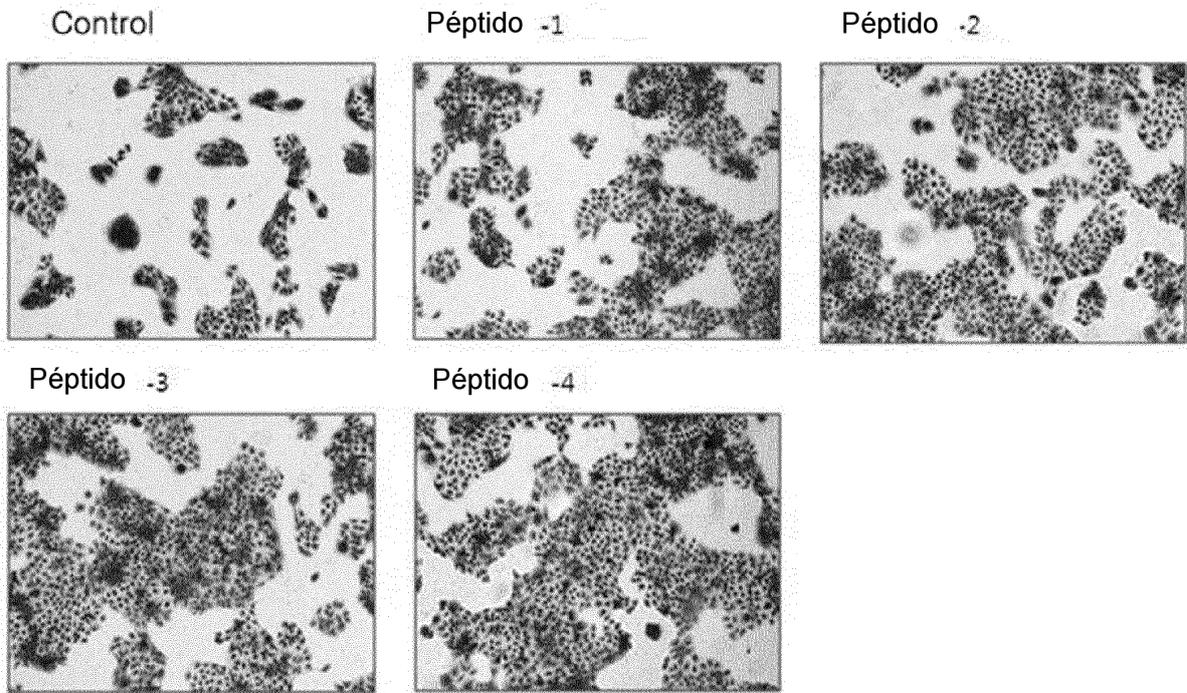


Fig. 3b

Morfología celular < Célula fibroblástica >

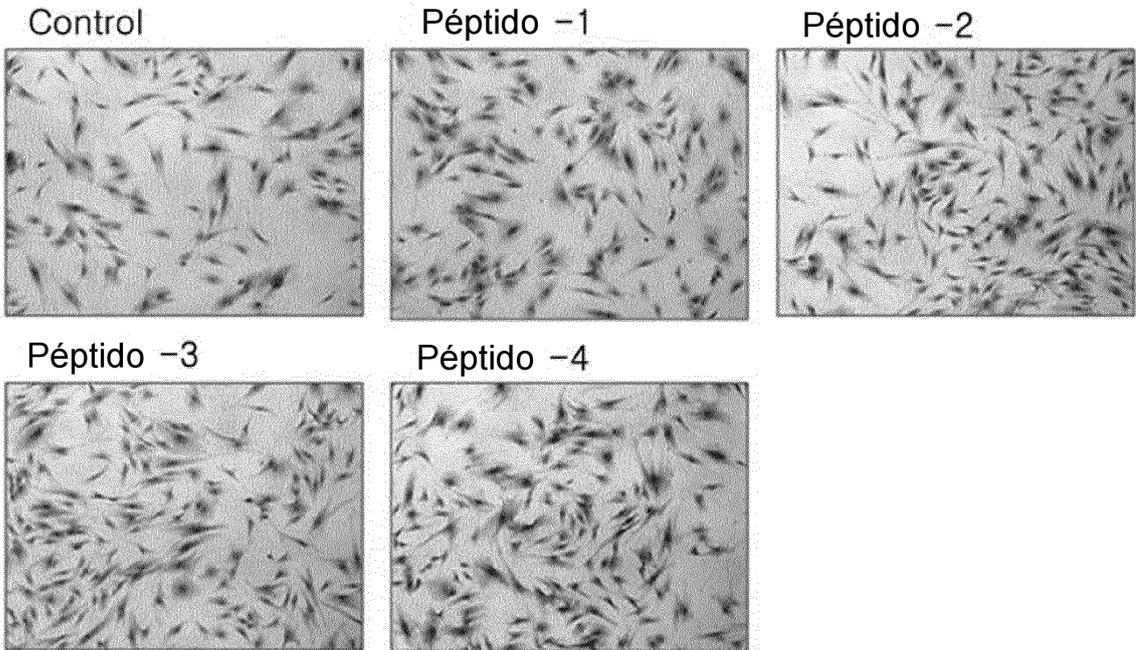


Fig. 3c

Morfología celular <Célula de la papila dérmica del folículo piloso>

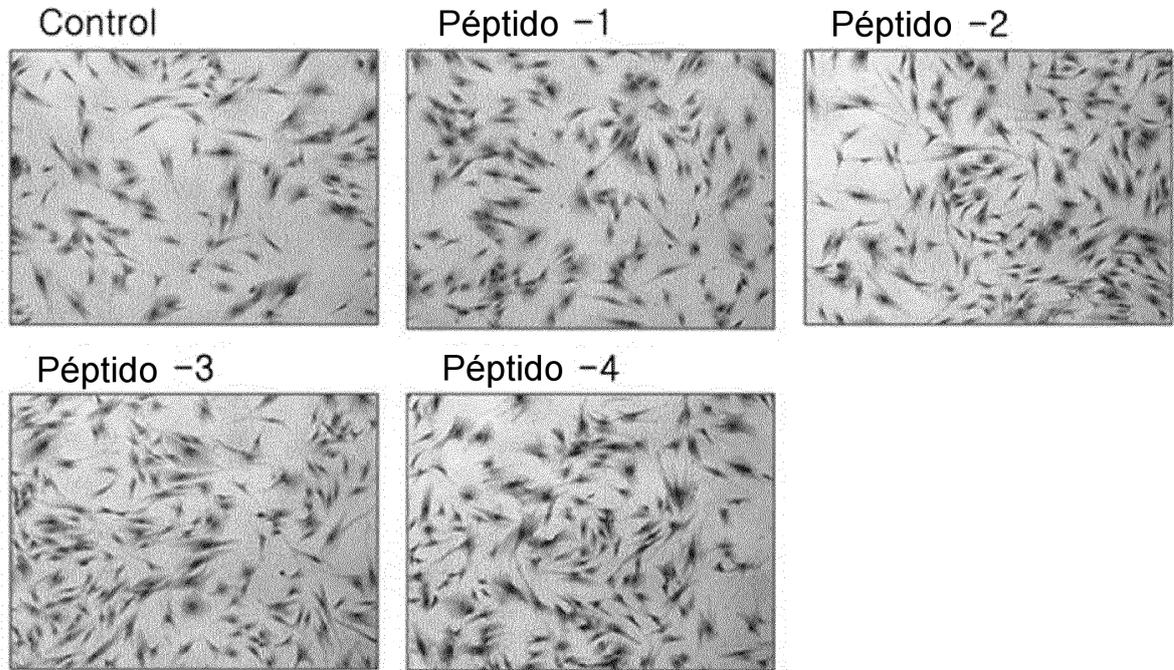
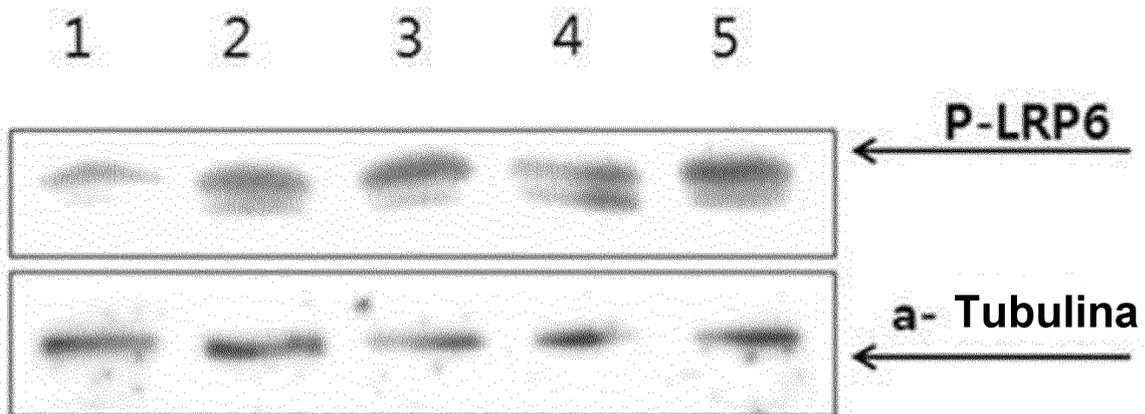


Fig. 4

Activación del receptor de p-LRP6 por el péptido

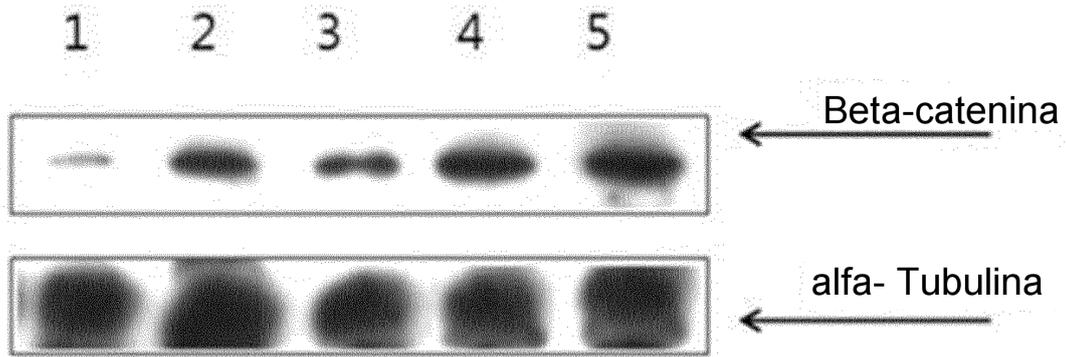


1: Control 2: Péptido -1 3: Péptido -2
4: Péptido -3 5: Péptido -4

Concentración peptídica: 1 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$

Fig. 5a

Activación de la beta-catenina por el péptido

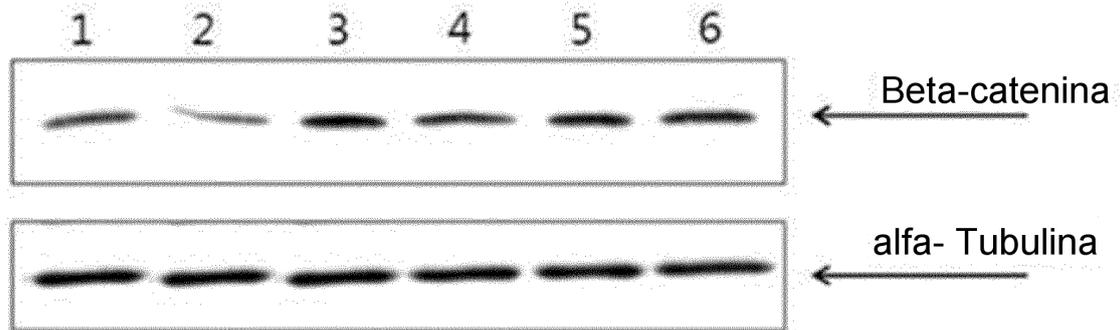


1: Control 2: Péptido -1 3: Péptido -2
4: Péptido -3 5: Péptido -4

Concentración peptídica : 1 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$

Fig. 5b

Activación de beta-catenina por el péptido



1: Control 2: DKK-1 3: DKK-1 + Péptido -1 4: DKK-1+ Péptido -2
5: DKK-1 +Péptido -3 6. DKK-1 +Péptido -4

Concentración peptídica : **1 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$**
Concentración de DKK-1: **10 $\text{ng}/\text{m}\ell$**

Fig. 6

Nivel de ARNm de LEF-1 por el péptido

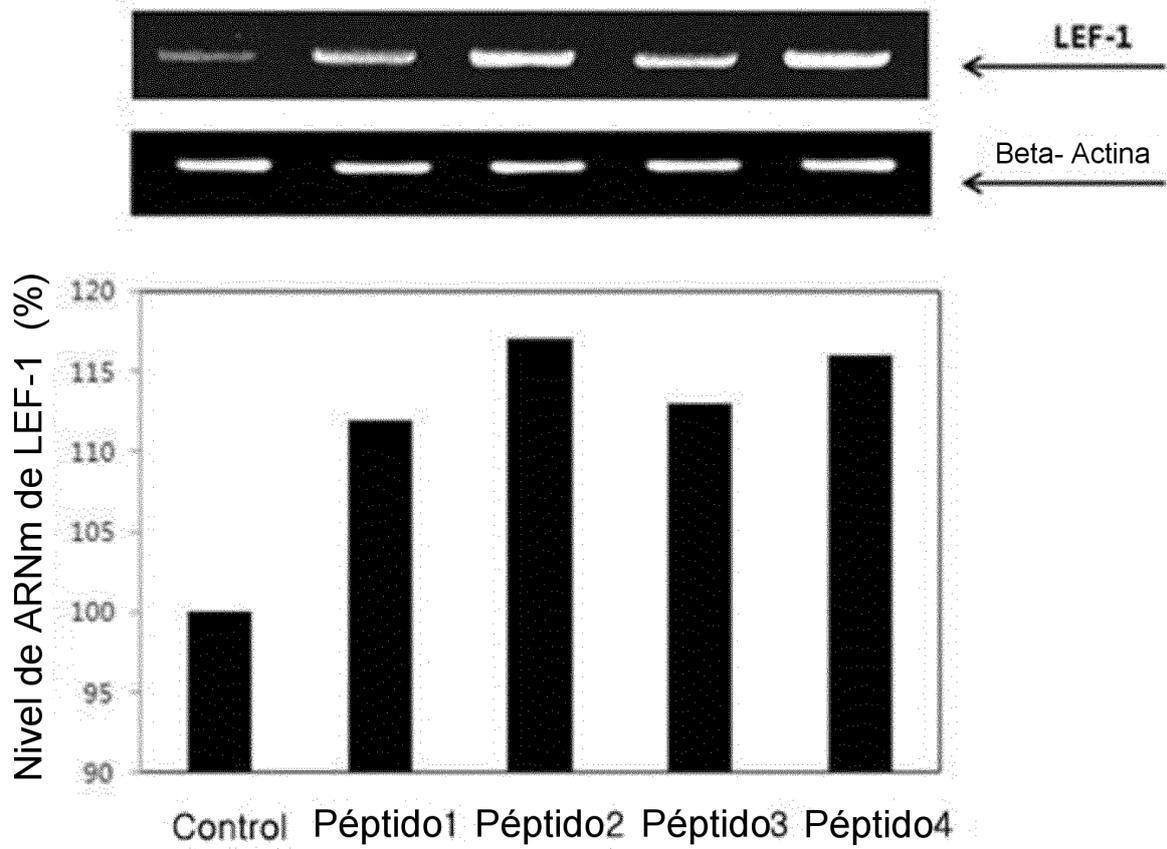


Fig. 7a

Expresión de fibronectina por el péptido

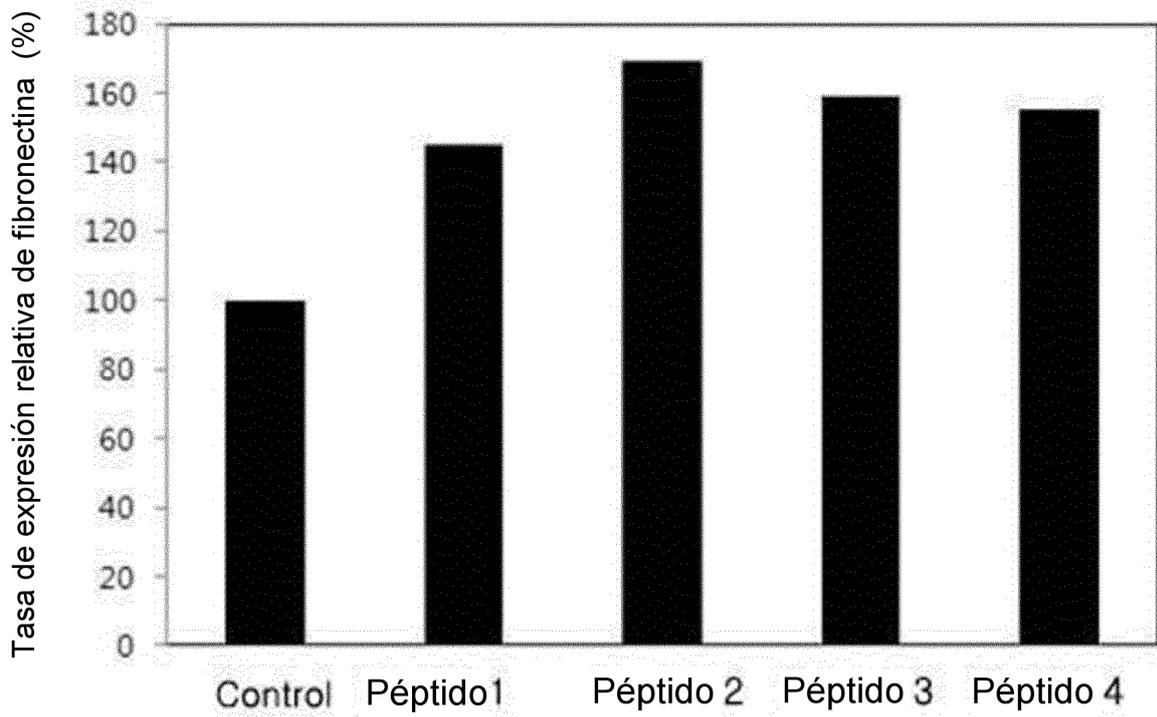


Fig. 7b

Expresión de fibronectina por el péptido

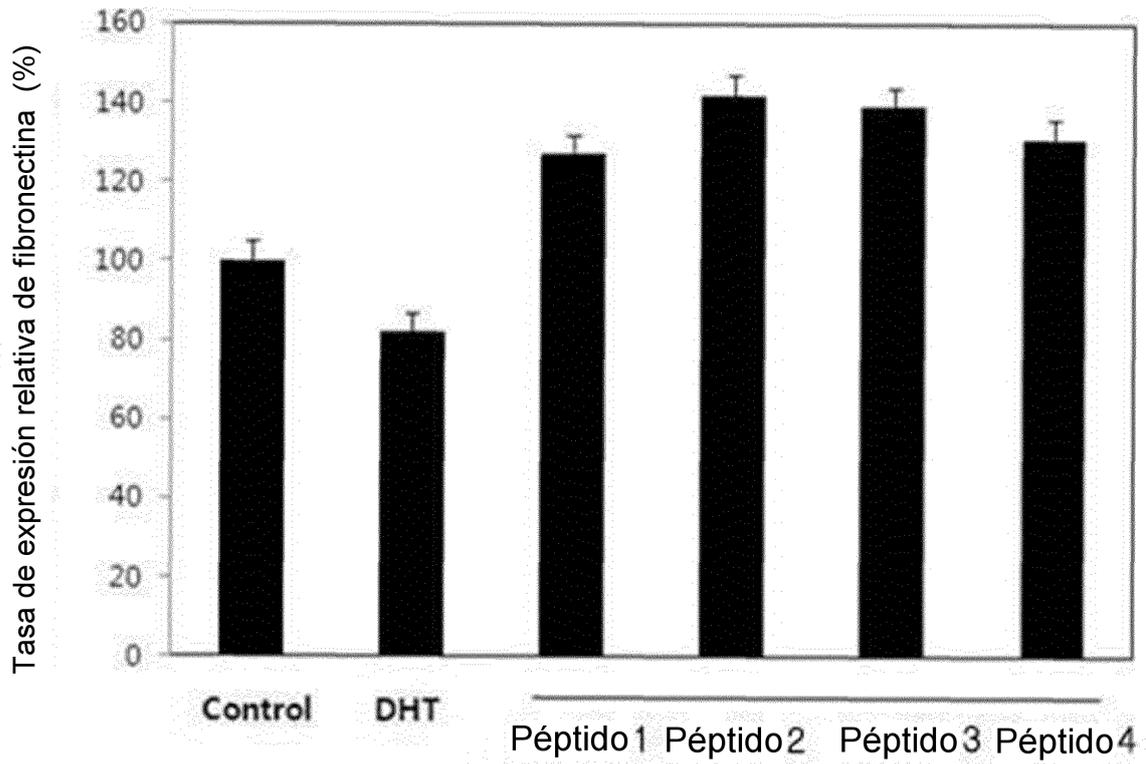


Fig. 7c

Expresión de fibronectina por el péptido

DAPI : Nuclear
T-Red : Fibronectina

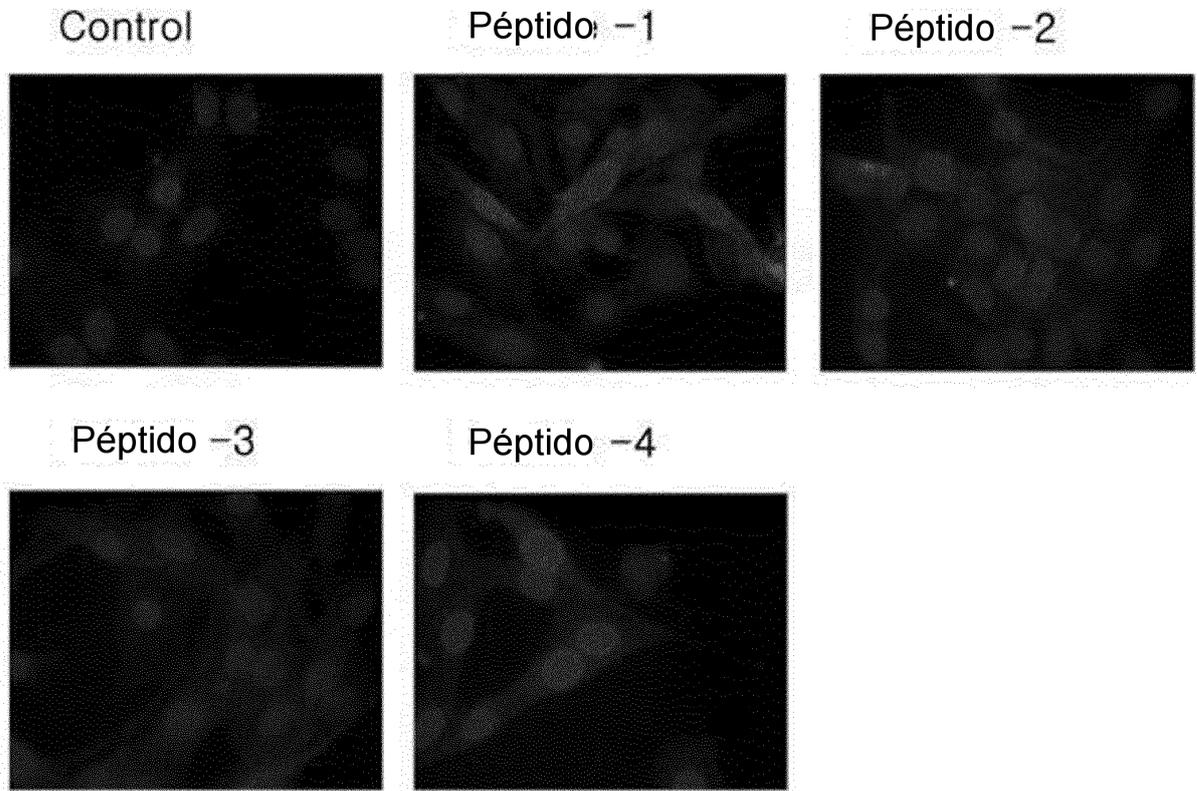


Fig. 8

