(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 677 698**

(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

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2012** **E 15198599 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018** **EP 3037433**

(54) Título: **Péptidos derivados de la familia WNT y usos de estos**

(30) Prioridad:

04.08.2011 KR 20110077566

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.08.2018

(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 2 677 698 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos derivados de la familia WNT y usos de estos

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un uso de un péptido derivado de la familia WNT.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

El folículo piloso es un órgano cutáneo particular de los mamíferos, que se desarrolla desde el fondo de la epidermis primitiva hacia una capa cutánea muy interna. El cúmulo de células conocidas 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, Embryo/. *Exp. Morph.* 15: 331 (1966), Oliver, *Embryol. Exp. Moph.* 16: 231 (1967)) y en el crecimiento del tallo capilar. El tallo capilar es un conjunto de células epiteliales con forma de hilo que se componen de filamentos de queratina y proteínas que se agregan a los filamentos estrechamente adheridas a ellos.

El cabello humano sigue un ciclo de crecimiento con tres fases diferenciadas: las fases anágena, catágena y telógena. El ciclo de crecimiento capilar está regulado por hormonas o muchos factores de crecimiento. La malnutrición o estrés graves pueden hacer avanzar las fases catágena y telógena, lo que da lugar a una pérdida de cabello grave (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, el cual provoca la miniaturización de los folículos, lo que da como resultado la pérdida de cabello. En resumen, una secreción excesiva de andrógeno activa la 5-*α* reductasa, que hace que la testosterona se convierta en dihidrotestosterona (DHT). Posteriormente, la DHT reduce el número de cabellos terminales oscuros gruesos acortando un periodo de crecimiento capilar y miniaturizando los folículos pilosos, lo que da lugar a la pérdida del cabello. Se ha supuesto que aproximadamente un 20% de las mujeres con pérdida de cabello padecen unos pocos trastornos denominados “calvicie de patrón femenino”, en los que a menudo el cabello 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, la pérdida de cabello grave puede estar causada por diferentes trastornos tales como alopecia cicatrizal o estados cicatrizales que incluyen las quemaduras o la lesión por compresión. Sea cual sea la causa, aunque la presencia de las mujeres en la población activa se ha aumentado y los hombres se han preocupado por su aspecto, la pérdida de cabello puede tener impactos psicológicos, sociales y sexuales notables, así como una pérdida de amor propio y orgullo. Si bien se han utilizado varios medicamentos para tratar la pérdida de cabello, estos son demasiado caros o producen efectos adversos muy diferentes entre individuos. Además, es necesario tomar estos fármacos de forma constante. En este sentido, uno de los inconvenientes importantes es que el cese de su uso puede provocar pérdida de cabello. A la vez, otra desventaja es que sus eficacias y efectos secundarios pueden ser bastante diferentes entre individuos.

Por lo tanto, en este campo industrial es necesario el desarrollo de principios activos novedosos más eficaces y baratos.

Las materias primas utilizadas en los productos cosméticos tienen la ventaja de que son baratas, si bien no proporcionan buenos resultados, ya que están compuestas por componentes derivados de extractos vegetales. Se ha tenido constancia hasta la fecha de que dos fármacos comerciales (minoxidil y finasterida) pueden retrasar solamente la pérdida de cabello adicional. Sin embargo, no se dispone de medicamentos concretos que puedan ser útiles para inducir la regeneración de nuevos folículos pilosos en la práctica. Muchos productos 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 *Sophora*, pimiento picante, hierba *Swertia*, *Morus alba*, hoja de morera, ginseng, regaliz, peonía, *Digitalis*, hinojo, *Cornus officinalis*, ajo y así sucesivamente; (b) una composición que contiene xantinas y hormonas de crecimiento para no solo mejorar el metabolismo celular suprimido por el exceso de dihidrotestosterona (DHT), sino también para facilitar el crecimiento capilar mediante la inhibición de la pérdida de cabello y la regeneración capilar inducida por hormonas del crecimiento; (c) un producto que contiene minerales, vitaminas y extractos de té verde, romero, artemisa o regaliz, que proporciona nutrientes al cuero cabelludo y al cabello para prevenir la pérdida de cabello y promover el crecimiento capilar y (d) se ha desarrollado un producto para la calvicie de patrón masculino que mezcla las sustancias tales como vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E, ácido nicotínico, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico, etc., con extractos vegetales, que inhibe 5-*α*-reductasas para suprimir la producción de DHT durante el metabolismo androgénico y para contribuir al metabolismo capilar. Sin embargo, apenas han tenido influencia en la producción de cabello nuevo. Como otro ejemplo, un grupo de investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Jikei de Tokio, Japón, ha desarrollado el producto utilizando ácido corosólico, del que se tiene constancia que es eficaz en la diabetes, que inhibe las 5-*α*-reductasas y muestra un efecto excelente en el crecimiento capilar.

Muchos factores se asocian 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 una actividad para: (a) promover la proliferación de queratinocitos, que es de suma importancia para la producción de la raíz capilar; (b) inducir diferenciación capilar; (c) suministrar nutrientes a las proximidades del cabello y (d) activar factores de crecimiento endotelial vascular.

De estos, el WNT de origen humano afecta de forma específica al desarrollo del cabello transfiriendo una señal a una célula. La vía de transducción de señales de 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 receptores 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 posteriores en la vía de transducción de señales de WNT incluyen la participación del complejo axina-β-catenina-GSK3 β mediante la activación de la proteína DVL (Disheveled) y Akt (Fukumoto *et al., J. Biol. Chem.* 276: 17479-17483 (2001)). Posteriormente, GSK3 β se inactiva mediante fosforilación, lo que da como resultado la inhibición de la fosforilación y la degradación de β-catenina. Las β-cateninas acumuladas se traslocan a un núcleo y posteriormente interaccionan con factores de transcripción del factor potenciador linfoide-factor de linfocitos T (LEF-TCF), lo que permite inducir la transcripción de genes diana. Las proteínas resultantes pueden desempeñar una función crítica para el crecimiento y la diferenciación capilar, y permiten que se produzcan células capilares nuevas. Además, disminuyen las actividades de DHT producida por la hormona masculina (andrógeno) para suprimir la pérdida de cabello.

El documento WO2011/088127 divulga agentes de unión a WNT y su uso en, por ejemplo, el crecimiento de células tumorales cancerosas.

El documento KR20110023991A divulga péptidos derivados de WNT10, una composición para mejorar la pérdida de cabello y las condiciones cutáneas.

El documento WO2008/093646 divulga péptidos que tienen al menos una actividad de activación de la señalización de WNT útil para la regulación de 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 patología neurológica u otras patologías tales como la diabetes.

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 que 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 WNT que tienen las características excelentes descritas anteriormente sobre la base de la secuencia de aminoácidos de la proteína WNT de origen natural, con lo cual han conseguido en última instancia la presente invención.

Por consiguiente, es un objeto de esta invención proporcionar un péptido que conste esencialmente de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

Es otro objeto de esta invención proporcionar el uso de una composición para promover el crecimiento capilar o mejorar la producción capilar que contenga el péptido mencionado anteriormente de esta invención como un principio activo.

Es otro objeto más de esta invención proporcionar el uso de una composición para mejorar la pérdida de cabello que contenga el péptido mencionado anteriormente de esta invención como un principio activo.

Es otro objeto más de esta invención proporcionar el uso de una composición para mejorar las condiciones cutáneas que contenga el péptido mencionado anteriormente de esta invención como un 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 que consta esencialmente de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo compuesto por secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

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 que 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 WNT que tienen las características excelentes descritas anteriormente sobre la base de la secuencia de aminoácidos de la proteína WNT de origen natural, con lo cual han conseguido en última instancia la presente invención.

El término utilizado en la presente “péptido” se refiere a una molécula lineal formada por la unión entre residuos

aminoacídicos mediante enlaces peptídicos.

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar mediante procesos de síntesis química convencional conocidos para 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 ed., *Pierce Chem. Co*.: Rockford, 111 (1984)).

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar prediciendo en primer lugar una parte que pueda unirse a una proteína receptora mediante síntesis parcial aleatoria de varias partes en la proteína WNT y posteriormente optimizando una secuencia aminoacídica de la parte predicha. Posteriormente, los péptidos candidatos que tengan la actividad más excelente se criban para aislar los péptidos de esta invención.

El péptido de la SEQ ID NO: 3 (péptido-3) no solo tiene actividades 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 en su extremo N-terminal un grupo protector seleccionado a partir del grupo compuesto por un grupo acetilo, un grupo fluorenilmetoxicarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoílo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y polietilenglicol (PEG).

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

En otro aspecto de esta invención, se proporciona el uso de una composición para promover el crecimiento capilar o mejorar la producción capilar que contenga el péptido de esta invención como un principio activo.

En otro aspecto más de esta invención, se proporciona un método para promover el crecimiento capilar o mejorar la producción capilar que comprende administrar a un sujeto el péptido de esta invención.

Como la presente composición comprende los péptidos relacionados con factores de crecimiento de esta invención como principios activos descritos anteriormente, las descripciones comunes entre ellos se omiten para evitar una redundancia excesiva que diese lugar a la complejidad de esta memoria descriptiva.

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

En otro aspecto de esta invención, se proporciona el uso de una composición para mejorar la pérdida de cabello que contiene el péptido de esta invención como un principio activo.

En otro aspecto más de esta invención, se proporciona un método para mejorar la pérdida de cabello que comprende administrar a un sujeto el péptido de esta invención.

El péptido de esta invención induce la proliferación y diferenciación de células madre en folículos pilosos de la piel y permite además que migren hacia la raíz capilar y se conviertan en folículos nuevos. Además, el péptido de esta invención puede aumentar la expresión de un gen que estimula la producción capilar mediante la activación de la señalización de β-catenina incluso en la condición en la que la señalización de WNT esté inhibida por la presencia del gen DKK-1 (Dickkopf-1) estimulador de la pérdida de cabello, cuya expresión ha sido inducida por DHT (dihidrotestosterona). Además, el péptido de esta invención tiene una función de promover la fase de crecimiento del ciclo capilar, en la cual se genera cabello y crece, e impide que el ciclo de crecimiento capilar entre en la fase telógena, que es inducida por varios factores medioambientales desfavorables. Mediante las acciones mencionadas anteriormente, el péptido de esta invención tiene la función de prevenir la pérdida de cabello, estimular el crecimiento capilar y proporcionar un cabello sano más nutrido. Por consiguiente, la composición de la presente invención es muy eficaz en el crecimiento capilar y la mejora de las condiciones cutáneas.

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

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

De acuerdo con una realización preferida, la mejora en las condiciones cutáneas por parte del péptido de la presente es una mejora en las arrugas o la elasticidad cutánea, prevención del envejecimiento cutáneo, mejora en la hidratación cutánea, eliminación de heridas o regeneración cutáneas.

De acuerdo con una realización preferible, 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 utilizada en la presente “cantidad cosméticamente eficaz” se refiere a una cantidad suficiente para conseguir eficacias en mejoras en las condiciones cutáneas descritas anteriormente en la presente.

Las composiciones cosméticas de esta invención se pueden formular en una amplia variedad de formas, por ejemplo, que incluyen una solución, una suspensión, una emulsión, una pasta, un ungüento, un gel, una crema, una loción, un polvo, un jabón, un limpiador que contiene tensioactivos, 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 invención se pueden formular en forma de suavizante para la piel, líquido nutritivo, crema nutritiva, crema de masaje, esencia, crema oftálmica, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, compresa, aerosol o polvo.

Cuando la composición cosmética se encuentra 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.

En la formulación de polvo o aerosol, puede incluir lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio, polvo poliamídico y mezclas de estas sustancias. El aerosol puede comprender adicionalmente los propelentes habituales, por ejemplo, clorofluorohidrocarburos, propano/butano o éter dimetílico.

La formulación de la solución y la emulsión puede incluir disolvente, solubilizante y emulsificante, 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 ácidos grasos de sorbitán.

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

La formulación de composiciones limpiadoras con tensioactivo puede contener sulfato de alcoholes alifáticos, éter sulfato de alcoholes alifáticos, monoéster de sulfosuccinato, isotinato, derivados de imidazol, metiltaurato, sarcocinato, éter sulfato de ácidos grasos y amida, alquilamidobetaína, alcohol alifático, glicérido de ácidos grasos, dietanolamida de ácidos grasos, aceite vegetal, derivados de lanolina, éster de ácidos grasos y glicerol etoxilado o mezclas de estos ingredientes.

Además, las composiciones cosméticas de esta invención pueden contener auxiliares, así como péptidos como principios activos y portadores. 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:

(i) el péptido derivado de WNT de la presente invención posee actividades idénticas o similares al WNT de origen natural;

(ii) los péptidos de la presente invención tienen una estabilidad y potencia de penetración cutánea muy superiores al WNT de origen natural;

(iii) por lo tanto, la composición que contiene el péptido de la presente no solo muestra efectos excelentes sobre la mejora en la pérdida de cabello (por ejemplo, promoción de crecimiento capilar o producción capilar), sino que también tiene eficacias superiores en el tratamiento de un trastorno relacionado con la vía de transducción de señales de WNT; y

(iv) la destacada 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

La Fig. 1 representa los resultados del análisis por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) de los péptidos 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) 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 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. 2b es un gráfico que representa un efecto estimulador en el crecimiento de fibroblastos tratados con los péptidos 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) preparados en el Ejemplo de Preparación.

La Fig. 2b es un gráfico que representa un efecto estimulador en el crecimiento de células de folículos pilosos tratadas con los péptidos 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) preparados en el Ejemplo de Preparación.

La Fig. 3a es una imagen de microscopio que demuestra los efectos de los péptidos de la presente invención [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.

La Fig. 3b es una imagen de microscopio que demuestra los efectos de los péptidos de la presente invención [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 los péptidos de la presente invención [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.

La Fig. 4 son datos que demuestran el aumento de la fosforilación de LRP5 mediante el tratamiento con los péptidos de la presente invención [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 de β-catenina mediante el tratamiento con los péptidos de la presente invención [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 de inmunotransferencia de Western 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) mediante el tratamiento con los péptidos de la presente invención [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 mediante el tratamiento con los péptidos de la presente invención [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. 7a es un gráfico que representa que la expresión de fibronectina se eleva gradualmente mediante el tratamiento con los péptidos de la presente invención [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 paso del tiempo.

La Fig. 7b representa un gráfico que mide los cambios de expresión de fibronectina mediante el presente péptido. Se mostró que la expresión de fibronectina inhibida por DKK-1 (un inhibidor de WNT y gen de la pérdida de cabello) se restituía y aumentaba mediante la adición de los péptidos de la presente invención [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 inmunotinción que representa la presencia del péptido en las células cuando se tratan con los péptidos de la presente invención [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. 8 representa que el péptido de la presente invención [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 capilar 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

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 retiró el disolvente. Se añadieron 10 mL de diclorometano al reactor y después 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 con agitación durante 1 h. Después de lavar, el metanol y la DIEA (2:1) disueltos en DCM (diclorometano) se hicieron reaccionar con la resina durante 10 min, y a continuación el resultante se lavó utilizando un exceso de DCM/DMF (1:1). Después de retirar la disolución, se añadieron 10 mL de DMF al resultante y se agitó durante 3 minutos y después se retiró el disolvente. Se añadieron 10 mL de una solución de desprotección (20% de piperidina/DMF) al reactor y se agitaron durante 10 min a temperatura ambiente y después se retiró la solución. Tras añadir el mismo volumen de la solución de desprotección, se llevó a cabo la reacción durante 10 min y se retiró la solución y después se lavó secuencialmente con DMF (3 veces), MC (1 vez) y DMF (1 vez) para proporcionar resinas CTL-Arg(pbf). Se añadieron 10 mL de solución de DMF a un reactor nuevo y posteriormente 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 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 retirar la solución de reacción, el resultante se agitó tres veces (cada una durante 5 min) con solución de DMF para eliminar componentes residuales que no hubieran reaccionado. 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 solución de desprotección, la desprotección se llevó a cabo dos veces de la misma manera tal como se ha descrito anteriormente para proporcionar la resina CTL-Arg(pbf)-Gln(trt). Tras lavar con DMF y MC, se llevó a cabo una prueba de la ninhidrina adicional y los acoplamientos secuenciales de los aminoácidos a continuación se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente. Basándose en la secuencia de aminoácidos diseñada por los inventores de la presente, 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 se acoplaron secuencialmente a las resinas. El grupo protector Fmoc se eliminó mediante una incubación exhaustiva con la solución de desprotección dos veces durante 10 min. Para la acetilación, se incubaron anhídrido acético, DIEA y HoBt con Las resinas peptidílicas durante 1 h. Las resinas peptidílicas preparadas se lavaron tres veces con DMF, MC y metanol, respectivamente, y se secaron gradualmente en atmósfera de nitrógeno, tras lo cual se secaron al vacío completamente con P_2O_5. Las resinas secadas se hicieron reaccionar con 30 mL de una solución de salida [que contenía un 95% de ácido trifluoroacético (TFA), un 2.5% de agua destilada, un 2.5% de tioanisol] durante 2 h a temperatura ambiente con agitación intermitente. La resina se filtró y lavó con un volumen pequeño de solución de TFA, tras lo cual el filtrado se combinó con las aguas madre. Tras una destilación a presión reducida para reducir el volumen total a la mitad, se indujo la precipitación utilizando 50 mL de éter frío y se recogieron los precipitados formados por centrifugación, seguida de lavado dos veces con éter frío. Tras retirar las aguas madre, el resultante se secó completamente 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 demás péptidos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4 también se sintetizaron mediante el proceso descrito anteriormente (Fig. 1).

TABLA 1

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos	Valores analizados (analizador de masas)	
		Valores analizados	Valores téoricos
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

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

Con el fin de evaluar los tres péptidos preparados en los Ejemplos de Preparación 1-2 en cuanto a si tienen actividades similares de factores de crecimiento, se llevó a cabo un ensayo colorimétrico de SRB (sulforodamina B;

Sigma-Aldrich) utilizando queratinocitos HaCaT (banco de líneas celulares coreano) y fibroblastos NIH3T3 (banco de líneas celulares coreano) de acuerdo con el método de Rizzino *et al*. (Rizzino, *et al. Cancer Res*., 48: 4266 (1988)).

Se cultivaron queratinocitos HaCaT, fibroblastos NIH3T3 y células de folículo piloso HHFDPC (Cell science) 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 bovino fetal; Sigma). Las células cultivadas se trataron con un 1% de solución de tripsina para desprender las células del fondo de los matraces de cultivo y se centrifugaron para recoger los sedimentos celulares. Después de que las células se resuspendieran en DMEM que no contenía FBS, su alícuota (3 x 10^3 células) se añadió a cada pocillo de placas de 96 pocillos y se cultivó con un 5% de CO_2 durante 24 h a 37 ºC. Tras un cultivo de 24 h, el medio se cambió por medio fresco sin suero y las células se incubaron con muestra vacía (para su normalización) y los péptidos sintetizados (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1µg/ml y 10 µg/ml) se disolvieron de forma aséptica en un 10% de DMSO durante 72 h en las mismas condiciones descritas anteriormente. Tras retirar los sobrenadantes, las células se fijaron con etanol y a continuación se lavaron tres veces utilizando PBS (solución salina tamponada con fosfato), y después se incubaron con solución de SRB. Las células se lavaron lo suficiente con ácido acético al 1% y se observaron con un microscopio para determinar la condición de células vivas. Además, se midió la absorbancia a 590 nm para analizar la viabilidad celular. Mientras tanto, tras un cultivo en las mismas condiciones, el tejido se inmunotiñó mediante un ensayo inmunohistoquímico con anticuerpo para ki-67 (SantaCruz, EE. UU.) y se observó la cantidad de proteína ki-67 como un marcador de la proliferación celular.

La Fig. 2 demuestra que el péptido de la presente invención aumenta notablemente el crecimiento de queratinocitos (Fig. 2a), fibroblastos (Fig. 2b) y células de folículos pilosos (Fig. 2c). La Fig. 3 es un resultado que representa que se observa un cambio en la forma celular al microscopio después de que las células se traten con el péptido de la presente durante 72 h.

Tal como se muestra en las Figs. 2 y 3, se podría apreciar que los péptidos de la presente invención promueven la proliferación de queratinocitos, fibroblastos y células de folículos pilosos, y modifican sus formas morfológicas.

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

Se incubaron queratinocitos HaCaT cultivados durante 48 h con los péptidos sintetizados en el Ejemplo de preparación 1 durante 5 h. Se examinaron respectivamente el nivel de fosforilación de LRP5, que es el receptor de la proteína WNT y el nivel de expresión de la β-catenina, que es la molécula de señalización de la proteína WNT. Las cantidades de fosfo-LRP5 y β-catenina se midieron mediante análisis por inmunotransferencia de Western utilizando un anticuerpo contra fosfo-LRP5 (Cell signaling) y β-catenina (SantaCruz, 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 significativamente el nivel de fosforilación de LRP5 (Fig. 4) y también aumentó significativamente el nivel de expresión de β-catenina (Fig. 5a). En primer lugar, se mostró que se observa activdad de β-catenina mediante el 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 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 presentes péptidos (Fig. 6).

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 capilar y la inhibición de la pérdida de cabello y también tienen una actividad antienvejecimiento.

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

Con el fin de comprobar si los péptidos sintetizados en el Ejemplo de preparación 1 aumentan la expresión de fibronectina como proteína diana de WNT, se añadieron fibroblastos NIH3T3 (4 x 10^3 células) a cada pocillo de placas de 96 pocillos y se cultivaron con un 5% de CO_2 durante 24 h a 37 ºC. Después de un cultivo de 24 h, el medio se cambió por un medio nuevo sin suero y las células se trataron con muestra vacía (para su normalización), los tres péptidos sintetizados (1 µg/mL) y complejo peptídico (1 µg/mL) se disolvieron asépticamente en un 10% de DMSO durante 3 h, 10 h, 24 h o 48 h en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Tras 72 h de incubación, el cultivo celular se recogió y se midió el nivel de expresión de fibronectina utilizando un kit ELISA para fibronectina (R&D systems, EE. UU.).

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

La Fig. 7c es una imagen de 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 presentes péptidos en las células se

demostró mediante la tinción de los péptidos.

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

EJEMPLO EXPERIMENTAL 4: Análisis de los efectos de los péptidos en el crecimiento capilar del ratón

Los péptidos sintetizados en el Ejemplo de preparación 1 se formularon en un nanosoma. Posteriormente, se eliminó parcialmente el lomo de un ratón C57BL/6 y a continuación se administró a la piel el nanosoma por vía tópica dos veces cada día durante 15 días. A los 10 días de tratamiento, se observó crecimiento capilar en la piel del lomo del ratón y la cantidad de pelo en la piel del lomo del ratón aumentó de forma muy significativa a los 15 días de tratamiento, en comparación con un grupo de control (Fig. 8).

EJEMPLO 1: Preparación de nanopéptidos

Se disolvieron 50 mg de cada péptido sintetizado en los Ejemplos de preparación en 500 mL de agua destilada mediante una agitación suficiente. La solución 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 con agua destilada hasta 1 L. La solución resultante se sometió a un microfluidizador a presión elevada para su emulsificación, lo que proporcionó así nanosomas que tenían aproximadamente 100 nm de tamaño. Los nanosomas se prepararon de forma que tuvieran una concentración final de aproximadamente 50 ppm y se utilizaron como ingredientes para cosméticos.

EJEMPLO DE FORMULACIÓN 1: Suavizante para la piel

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

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 comprendía los nanosomas que contenían péptidos preparados en el Ejemplo 1 se formuló de acuerdo con la siguiente composición:

TABLA 3

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	2.5
Aceite de *Limnanthes alba*	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 apropiada
Perfume	Cantidad apropiada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

EJEMPLO DE FORMULACIÓN 3: Líquido nutritivo

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

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 carboxivinílico	1.0
Conservante, pigmentos	Cantidad apropiada
Perfume	Cantidad apropiada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

EJEMPLO DE FORMULACIÓN 4: Esencia

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

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 carboxivinílico	0.2
Trietanolamina	0.18
Octildodecet-16	0.4
Etanol	6.0
Perfume, conservante, pigmentos	Cantidad apropiada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

EJEMPLO DE FORMULACIÓN 5: Sérum para el cabello

Un sérum para el cabello que comprendía los nanosomas que contenían péptidos preparados en el Ejemplo 1 se formuló de acuerdo con la siguiente composición:

TABLA 6

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	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 sódico	8.0
Polímero carboxivinílico	0.2
Trietanolamina	0.18
Octildodecet-16	0.4
Etanol	6.0
Perfume, conservante, pigmentos	Cantidad apropiada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

EJEMPLO DE FORMULACIÓN 6: Tónico para el cabello

Un tónico para el cabello que comprendía los nanosomas que contenían péptidos preparados en el Ejemplo 1 se formuló de acuerdo con la siguiente composición:

TABLA 6

Ingredientes	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	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 sódico	8.0
Polímero carboxivinílico	0.2
Trietanolamina	0.18
Octildodecet-16	0.4

Etanol	10.0
Perfume, conservante, pigmentos	Cantidad apropiada
Agua destilada	Cantidad residual
Total	100

REIVINDICACIONES

1. Uso de un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3 para promover el crecimiento capilar y mejorar la producción capilar, 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 a partir del grupo compuesto por grupo acetilo, grupo fluorenilmetoxicarbonilo, grupo formilo, grupo palmitoílo, grupo miristilo, grupo estearilo y polietilenglicol (PEG).

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, queratinocitos o células de folículo piloso.

5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el péptido promueve la señalización de β-catenina.

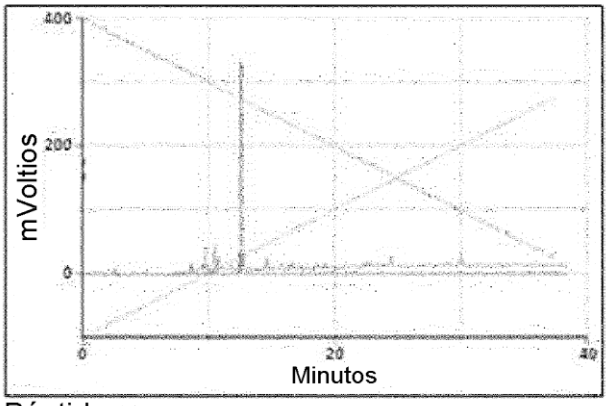
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el péptido promueve la señalización de β-catenina a pesar de la presencia de la proteína DKK-1 (Dickkopf-1), que está implicada en un proceso de pérdida de cabello.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el péptido promueve la expresión de fibronectina, que es una diana de la proteína WNT e importante para el crecimiento capilar.

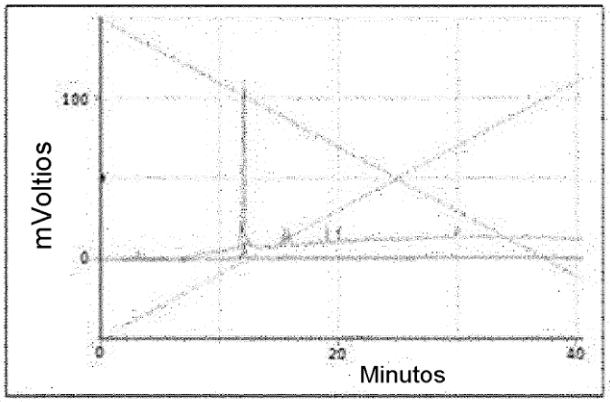
8. Uso de un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3 para prevenir la pérdida de cabello, con la condición de que el uso no sea un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

9. Uso de un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3 para mejorar las condiciones cutáneas, donde la mejora en las condiciones cutáneas es una mejora en la elasticidad cutánea, mejora en la hidratación cutánea o regeneración cutánea, con la condición de que el uso no sea un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

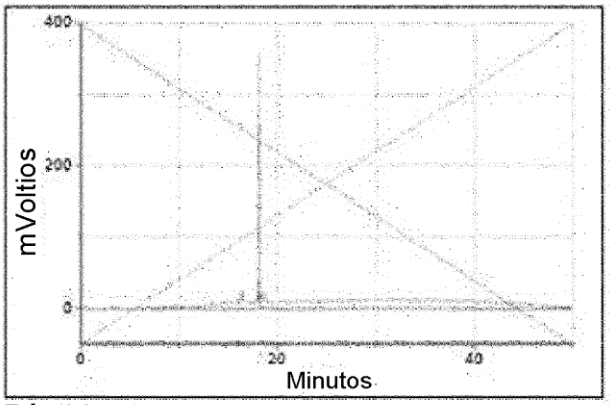
Fig. 1



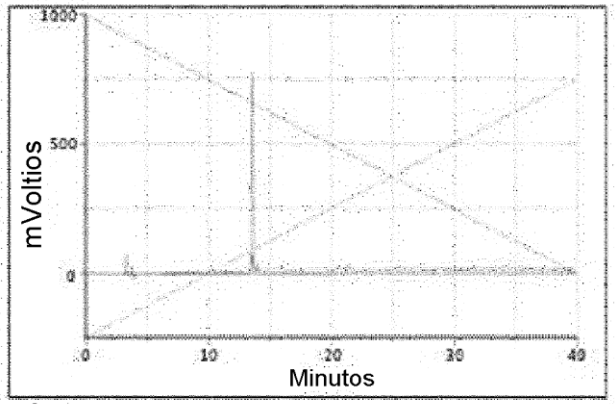
Péptido-1



Péptido-2



Péptido-1



Péptido-2

Fig. 2a

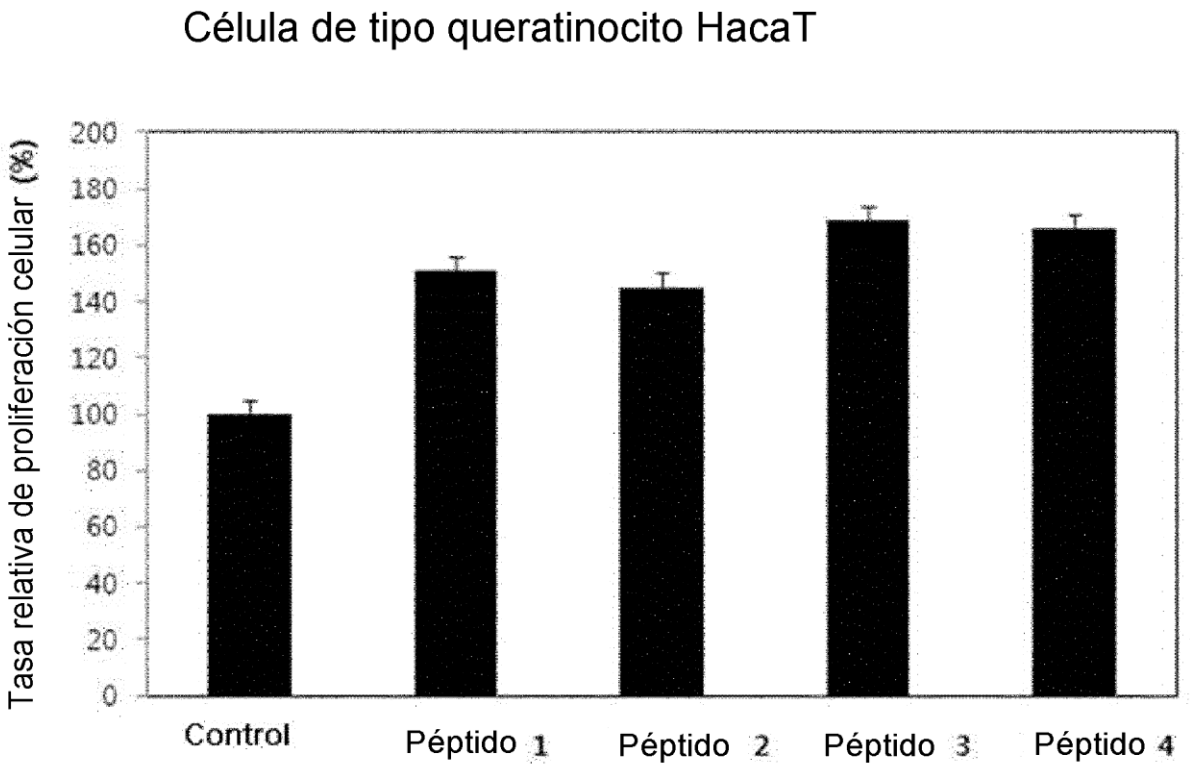

Célula de tipo queratinocito HacaT
Tasa relativa de proliferación celular (%)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
Péptido 1
Péptido 2
Péptido 3
Péptido 4

Fig. 2b

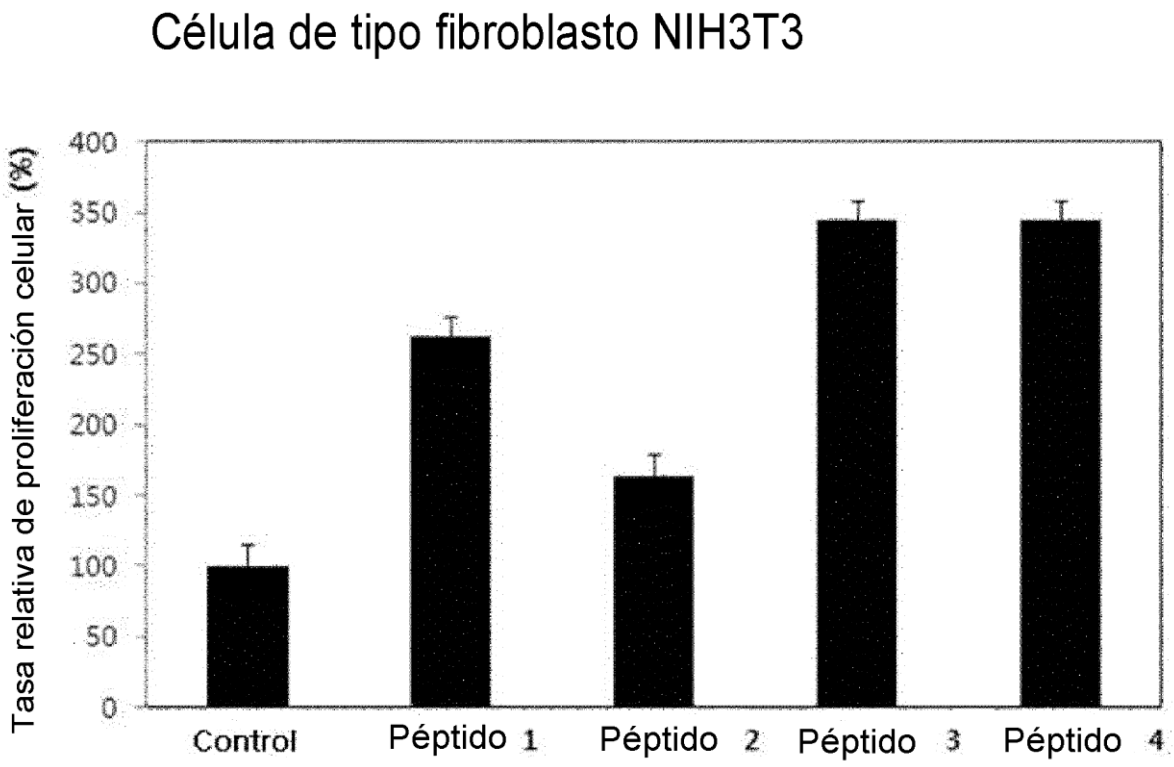

Célula de tipo fibroblasto NIH3T3
Tasa relativa de proliferación celular (%)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Control
Péptido 1
Péptido 2
Péptido 3
Péptido 4

Fig. 2c

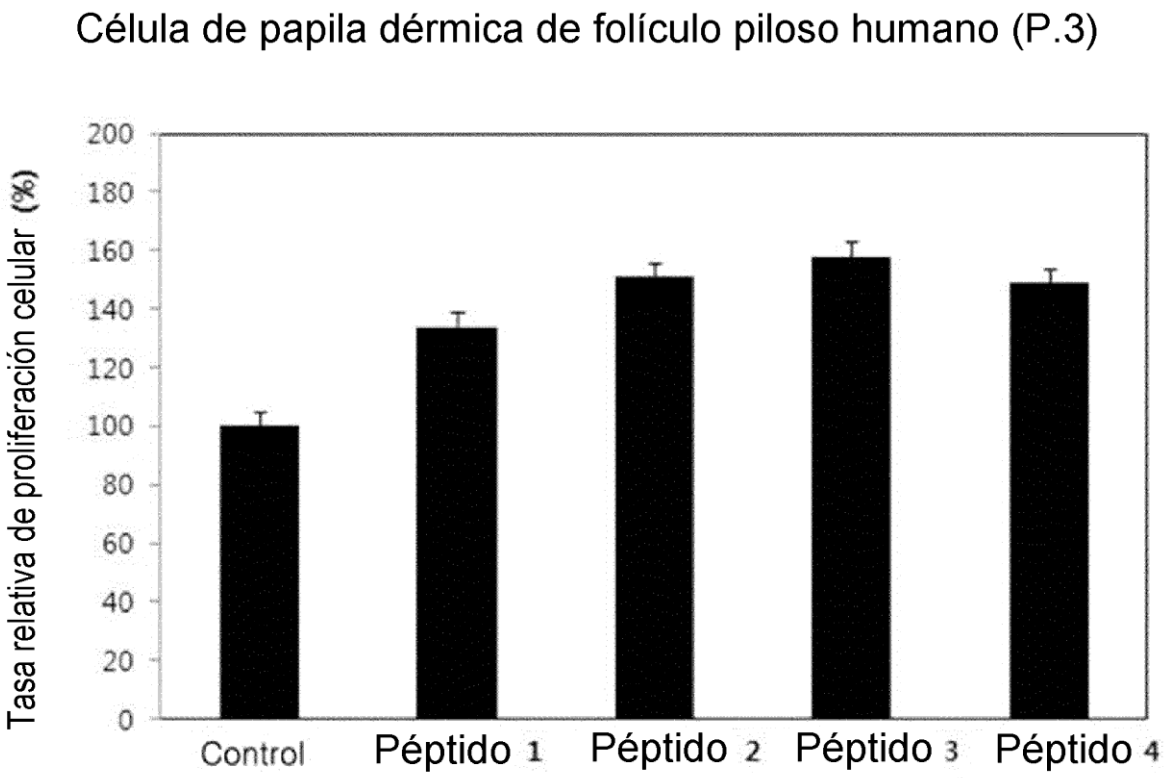

Célula de papila dérmica de folículo piloso humano (P.3)
Tasa relativa de proliferación celular (%)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
Péptido 1
Péptido 2
Péptido 3
Péptido 4

Fig. 3a

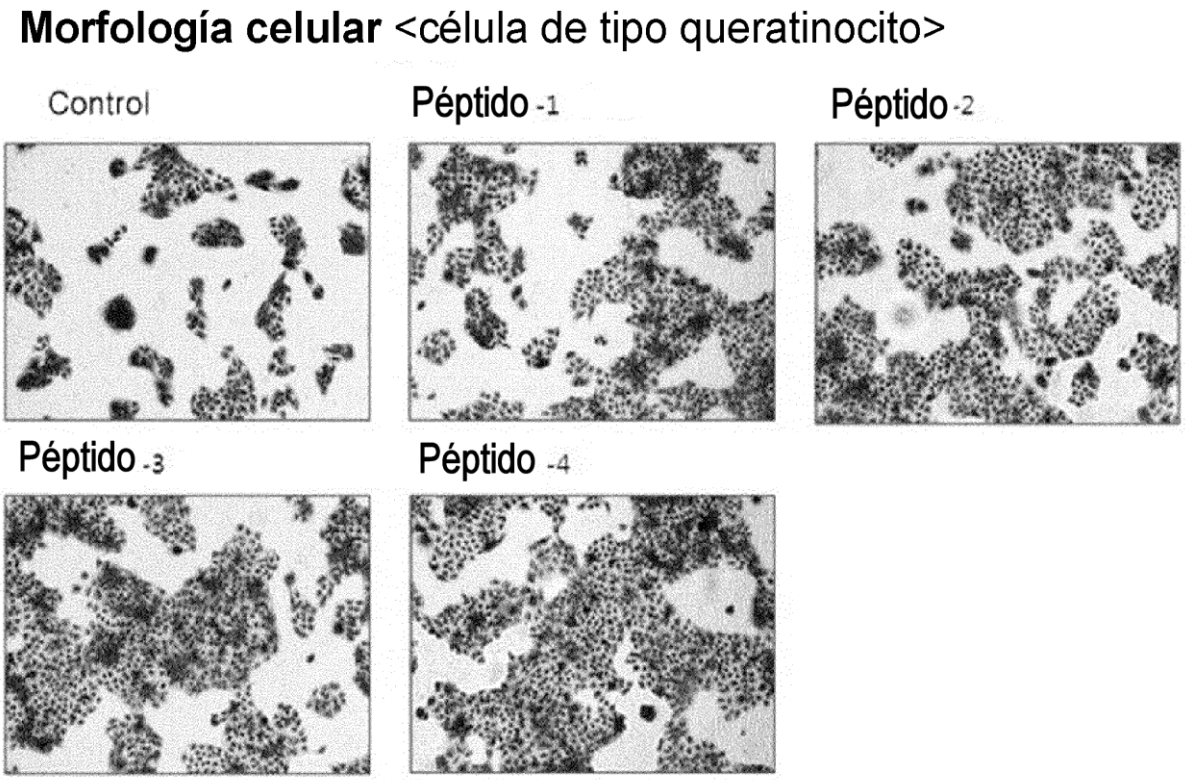

Morfología celular <célula de tipo queratinocito>
Control
Péptido -1
Péptido -2
Péptido -3
Péptido -4

Fig. 3b

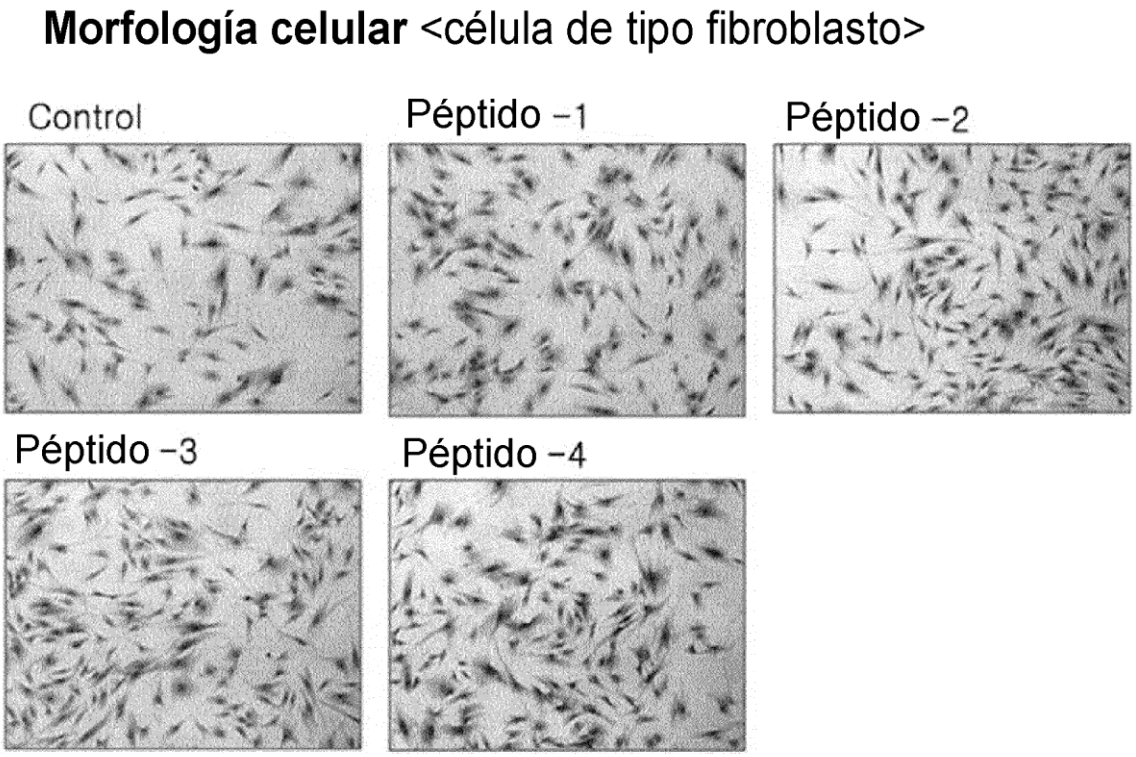

Morfología celular <célula de tipo fibroblasto>
Control
Péptido -1
Péptido -2
Péptido -3
Péptido -4

Fig. 3c

Morfología celular <célula de papila dérmica de folículo piloso>

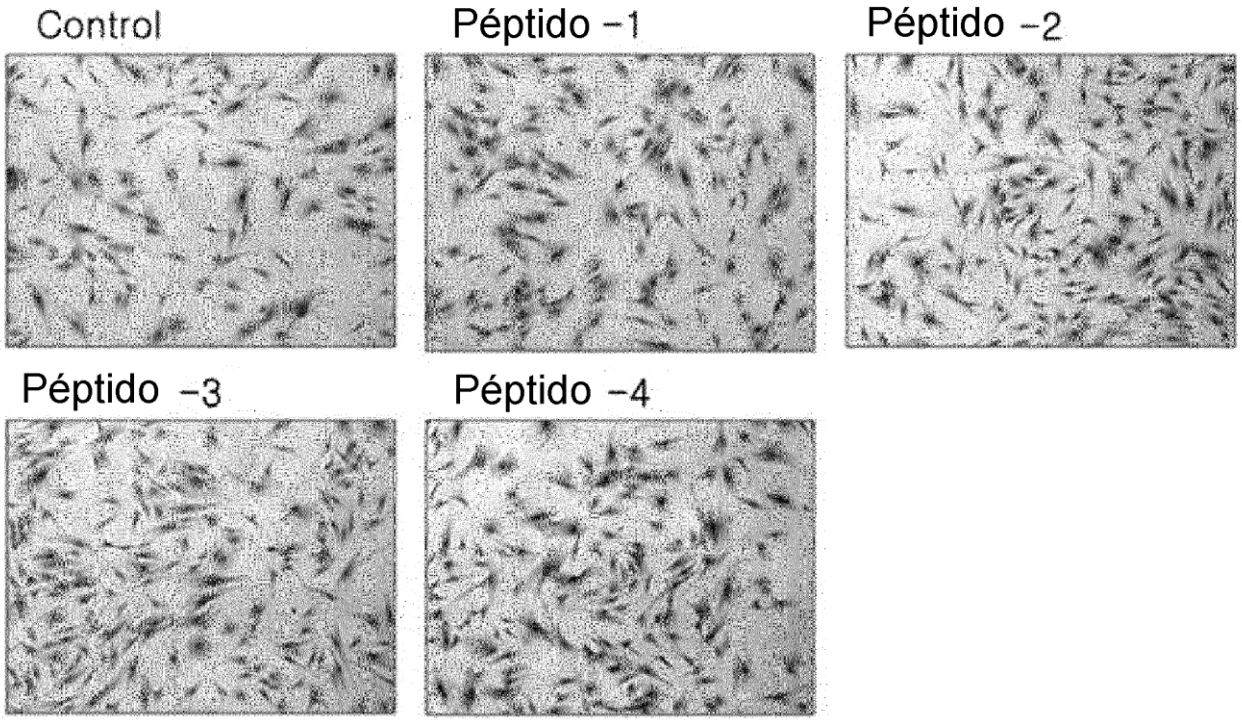


Fig. 4

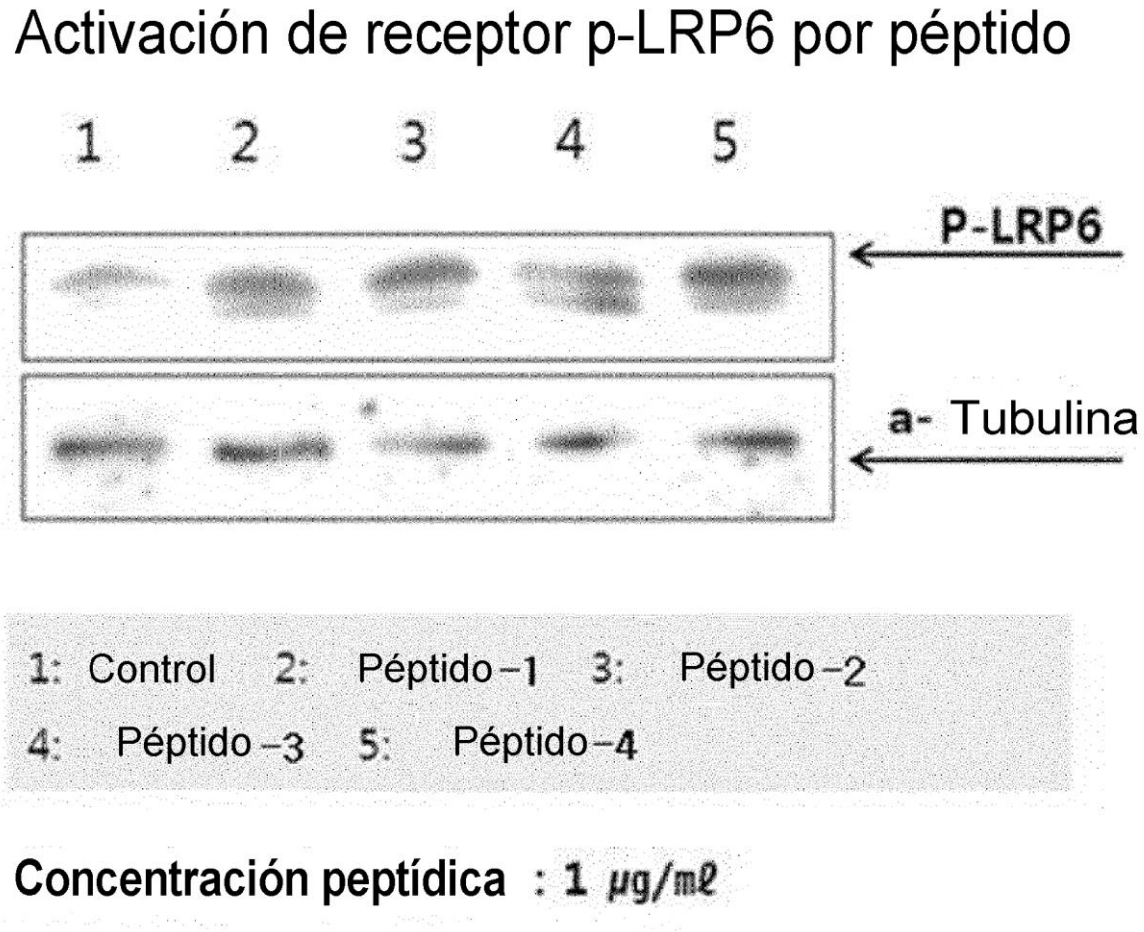
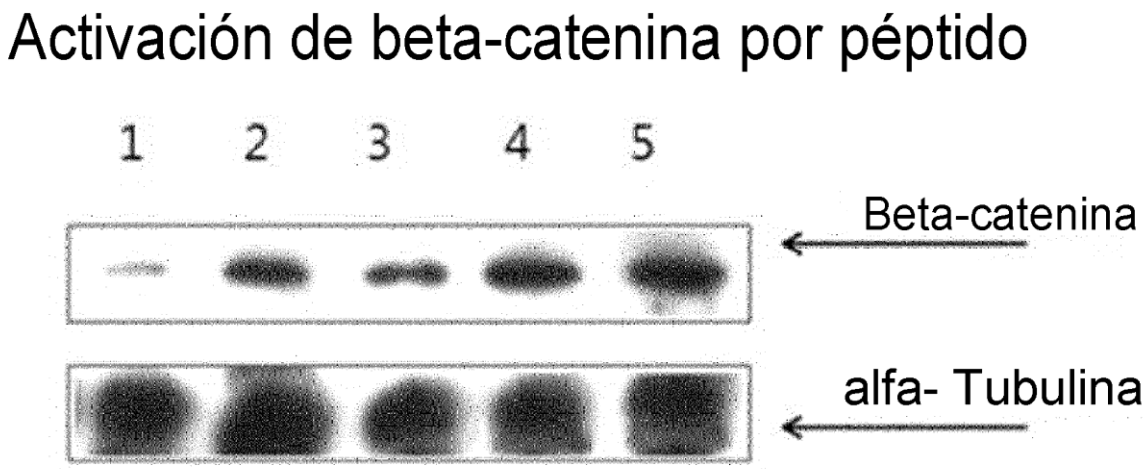

Activación de receptor p-LRP6 por péptido
1
2
3
4
5
P-LRP6
a- Tubulina
1: Control
2: Péptido-1
3: Péptido-2
4: Péptido-3
5: Péptido-4
Concentración peptídica : 1 μg/mℓ

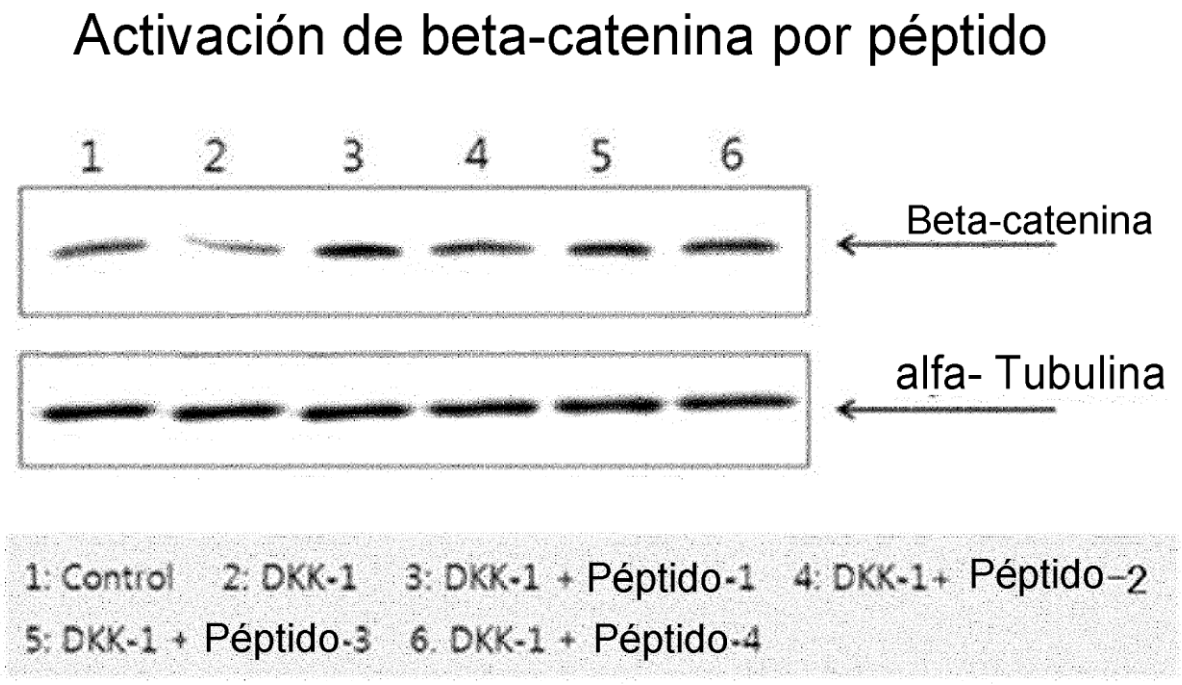
Fig. 5a



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

Concentración peptídica : 1 μg/mℓ

Fig. 5b



Concentración peptídica : 1 μg/mℓ
Concentración de DKK-1 : 10 ng/mℓ

Fig. 6

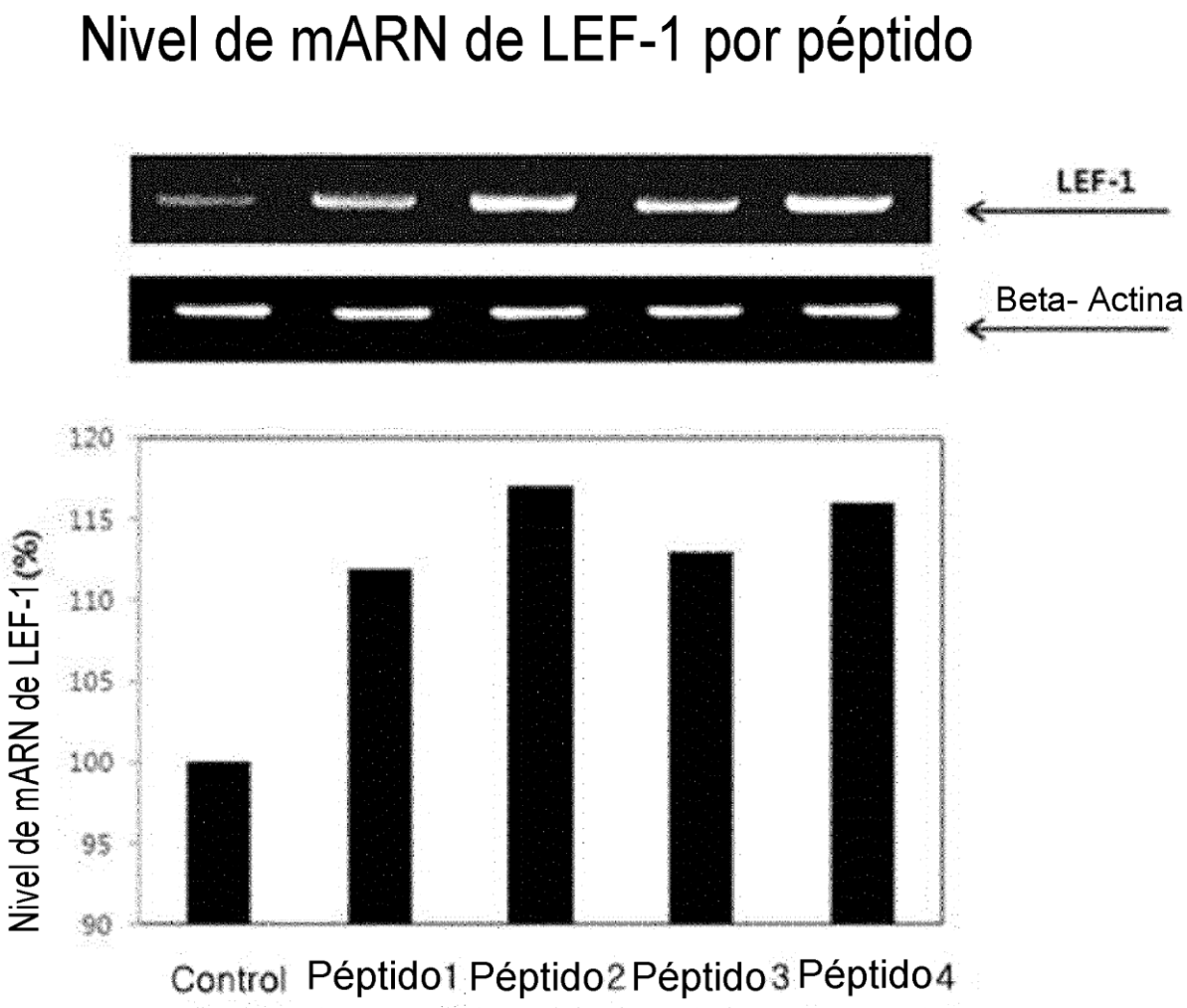

Nivel de mARN de LEF-1 por péptido
LEF-1
Beta- Actina
Nivel de mARN de LEF-1 (%)
120
115
110
105
100
95
90
Control
Péptido1
Péptido2
Péptido3
Péptido4

Fig. 7a

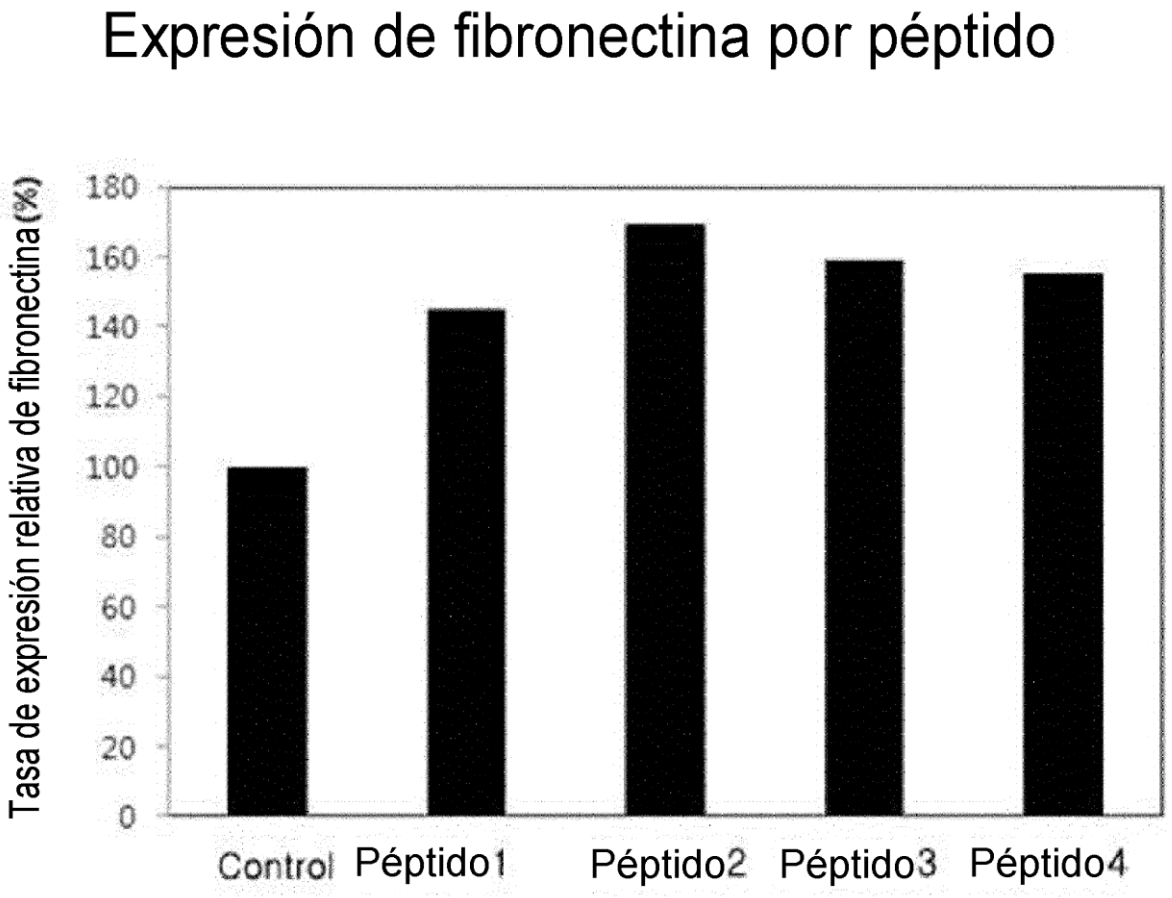

Expresión de fibronectina por péptido
Tasa de expresión relativa de fibronectina (%)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
Péptido1
Péptido2
Péptido3
Péptido4

Fig. 7b

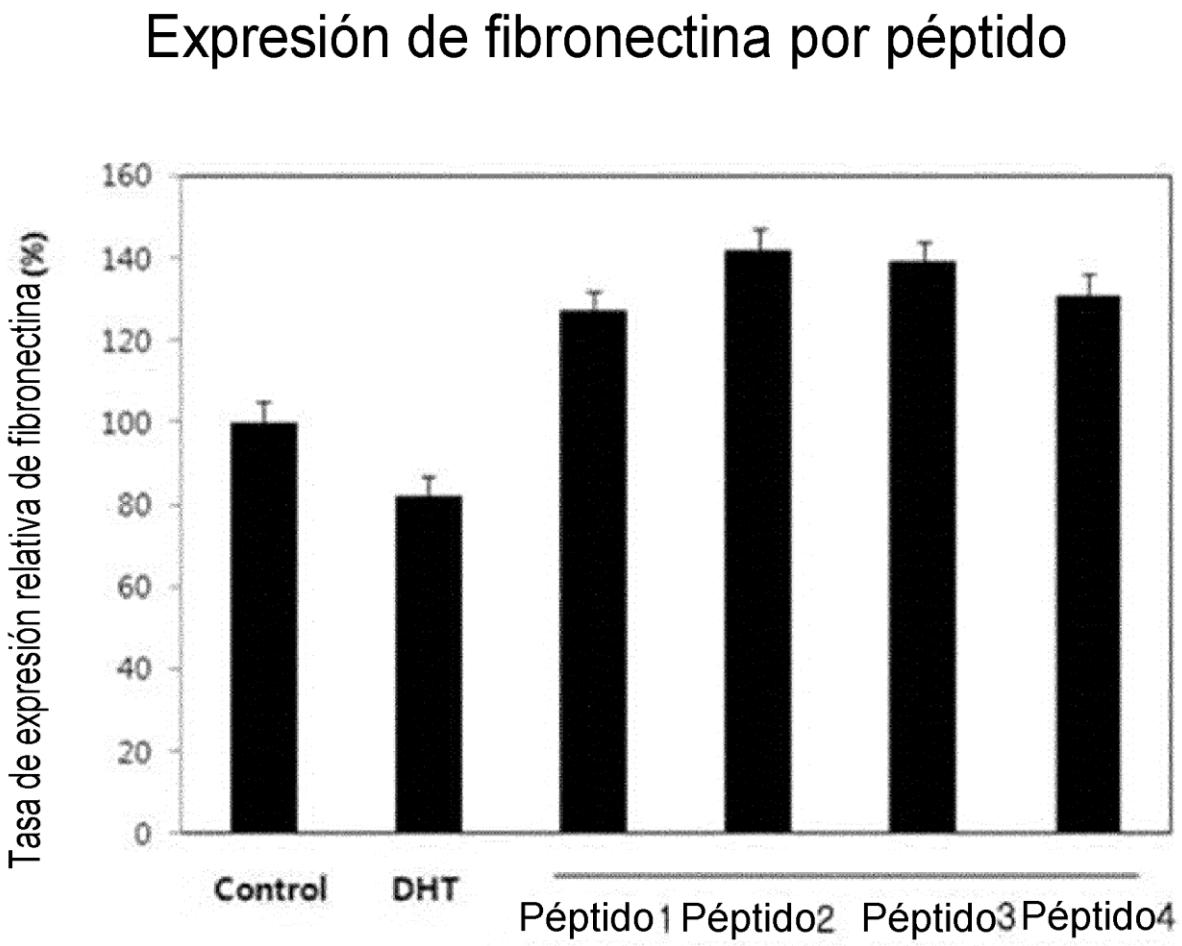

Expresión de fibronectina por péptido
Tasa de expresión relativa de fibronectina (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
DHT
Péptido1
Péptido2
Péptido3
Péptido4

Fig. 7c

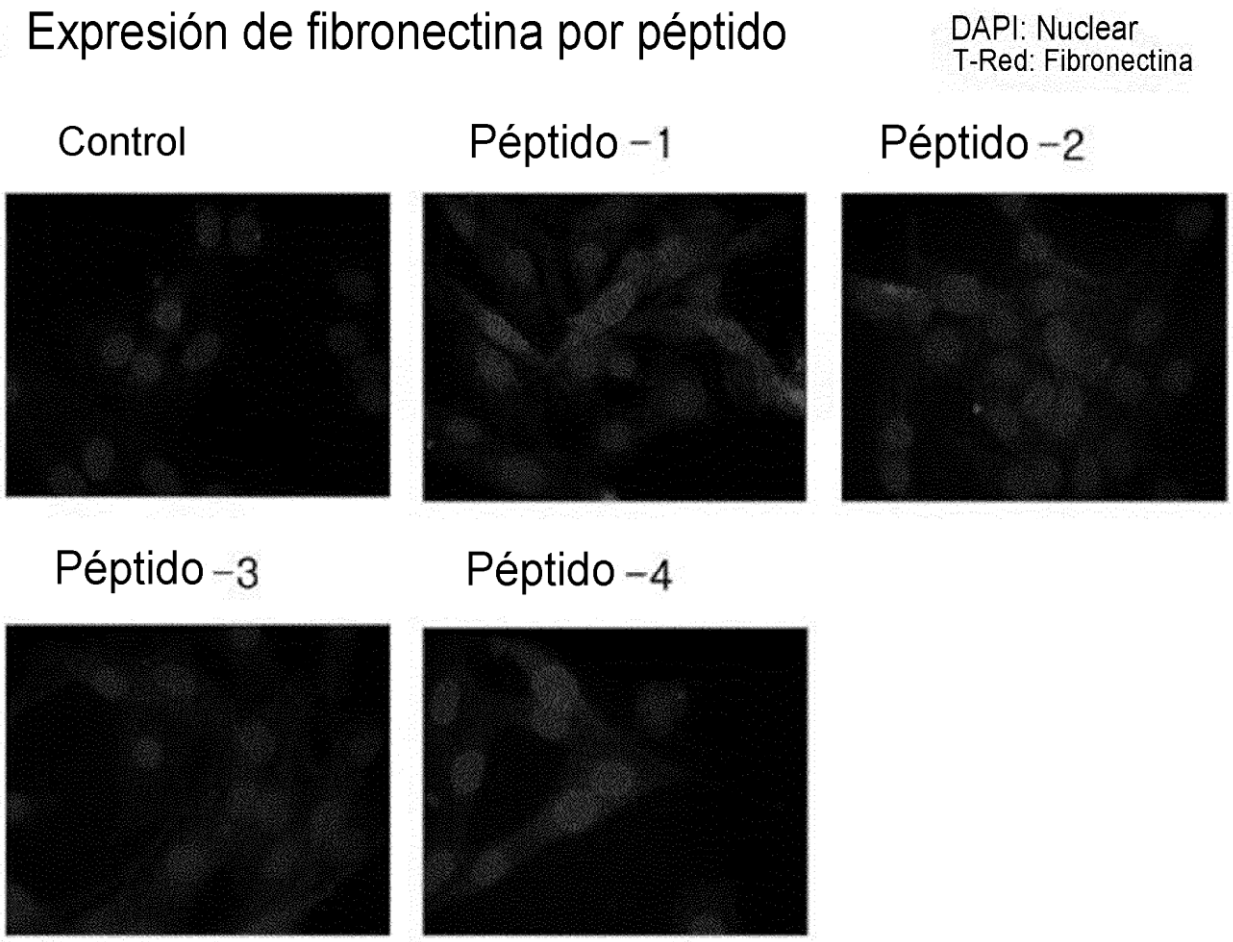
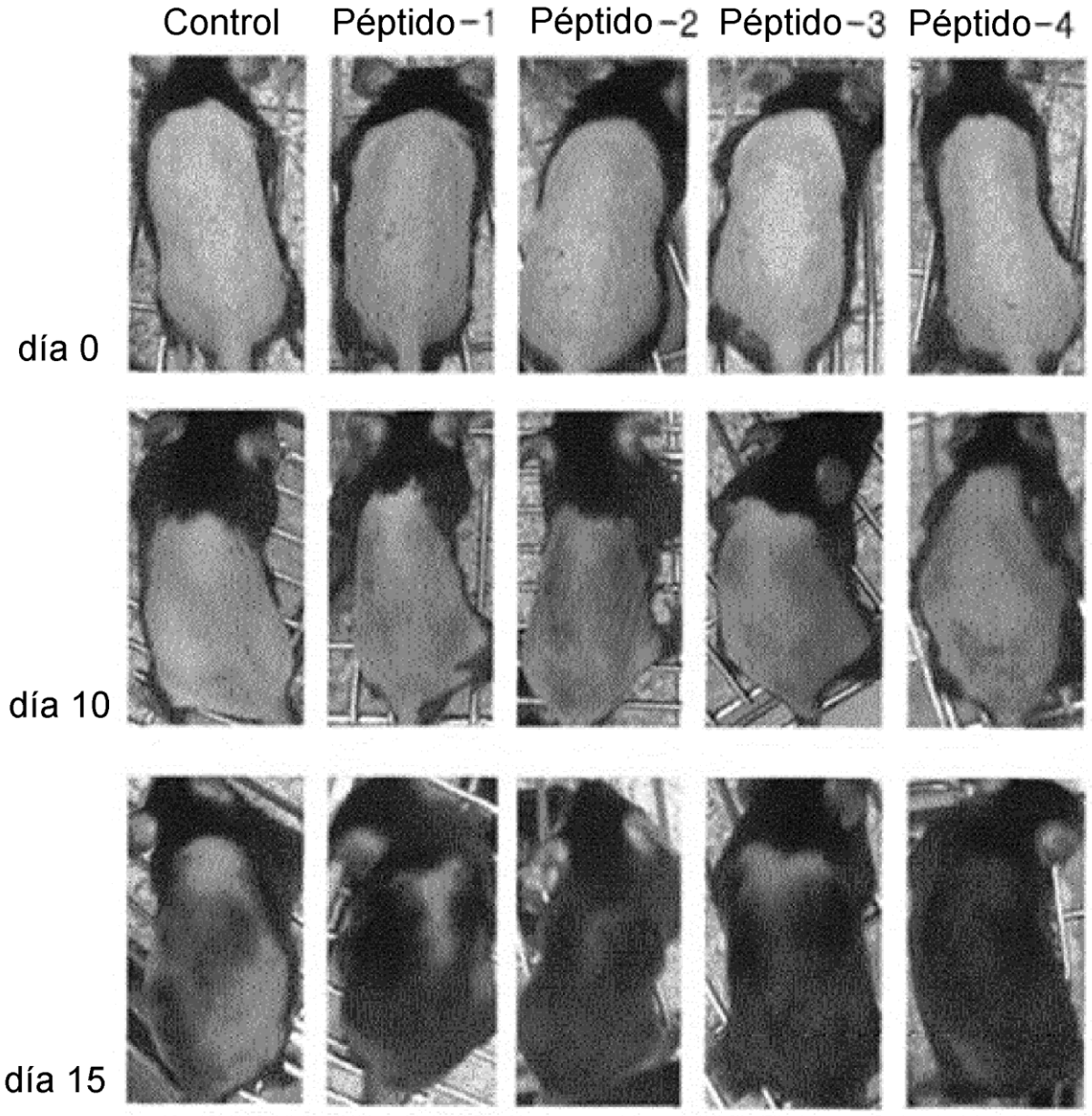

Expresión de fibronectina por péptido
DAPI: Nuclear
T-Red: Fibronectina
Control
Péptido -1
Péptido -2
Péptido -3
Péptido -4

Fig. 8


Control
Péptido-1
Péptido-2
Péptido-3
Péptido-4
día 0
día 10
día 15