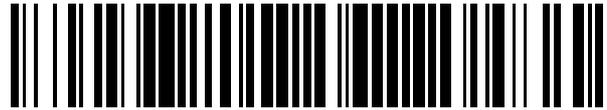


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 527**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/06** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 38/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2010 E 10808272 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2464656**

54 Título: **Péptido novedoso y uso del mismo**

30 Prioridad:

**14.08.2009 KR 20090075142**

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

**19.10.2015**

73 Titular/es:

**ENSOL BIOSCIENCES INC. (100.0%)  
51, Techno 10-ro, Yuseong-gu  
Daejeon 34036, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, HAE JIN;  
MOON, EUN JOUNG;  
KIM, YANG SEON y  
KWON, YOUNG JOON**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 548 527 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 novedoso y uso del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un péptido novedoso que es eficaz para tratar y/o prevenir discopatía degenerativa, tratar fibrosis de órganos del cuerpo, tratar cáncer, tratar glomeruloesclerosis, o similares.

10 **Antecedentes técnicos**

La discopatía degenerativa (DD), una causa de lumbalgia crónica, es un estado patológico que está acompañado por dolor lumbar resultante del agrietamiento y rotura de un disco intervertebral debido a degeneración discal o reducción de la altura del disco en respuesta a la deshidratación del disco (particularmente en el núcleo pulposo) con el envejecimiento. El disco degenerado se caracteriza por nervio anómalo aumentado y angiogénesis, y cambios en el número y función de las células (formación de grupos, necrosis, apoptosis, etc.). Una de las características moleculares del disco degenerado es una disminución de agregano. La pérdida de agregano, que desempeña un papel crucial en soportar la carga del disco, produce una caída de la presión osmótica del disco, que por tanto no es capaz ya de retener agua, lo que consecuentemente acelera la degeneración discal existente incluyendo el anillo fibroso existente, y tiene influencia significativa en otras estructuras y funciones medulares, tal como la degeneración e hipertrofia de la carilla articular y ligamento amarillo.

Como terapias actualmente disponibles para la lumbalgia crónica patológica incluyendo estas discopatías degenerativas, hay terapias médicas incluyendo terapias analgésicas, de rehabilitación con ejercicios, y similares. Desafortunadamente, estos enfoques terapéuticos padecen una recaída frecuente de la enfermedad, una necesidad para un periodo de tiempo largo y grandes esfuerzos para tratar la enfermedad concernida, y también riesgo de posibles complicaciones debido a la medicación prolongada.

Cuando no hay desenlace favorable de la enfermedad incluso después del tratamiento con tal terapia conservadora a largo plazo, el paciente recibirá inevitablemente terapia quirúrgica. Los tratamientos quirúrgicos representativos incluyen cirugía de fusión lumbar convencional que implica la eliminación completa de los tejidos discales afectados e inserción de injerto óseo en el sitio de lesión diana, y la recientemente inventada inserción de disco artificial. Sin embargo, estos métodos quirúrgicos tienen varias desventajas tal como que son relativamente caros y también el riesgo potencial de complicaciones quirúrgicas tempranas y tardías que surgen de la cirugía. Por ejemplo, la cirugía de fusión lumbar frecuentemente requiere cirugía de rehacer periódica debido a la degeneración de discos adyacentes. Un disco artificial desarrollado para reducir esta desventaja no proporciona resultados satisfactorios de estudio de seguimiento a largo plazo. Por tanto la cirugía de disco artificial no se realiza comúnmente hoy en día. Como se ha descrito anteriormente, hay una gran dificultad en tratar lumbalgia crónica debido a discopatías degenerativas. Para hacer frente a tales situaciones, como un enfoque alternativo a la terapia conservadora y terapia quirúrgica, se han intentado una variedad de terapias experimentales para alcanzar la regeneración discal al tiempo que se minimiza la degeneración del disco mismo.

En los últimos años, se han intentado varias terapias biológicas para tratar la degeneración discal, por ejemplo, un método, que aumenta la producción de proteínas de matriz importantes (por ejemplo, agregano), un método que disminuye el catabolismo inducido por citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, interlequina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ )) (Ahn, SH *et al.*, *Spine* 27:911-917, 2002; Burke JG *et al.*, *Spine* 28:2685-2693, 2003; Kang JD *et al.*, *Spine* 21:271-277, 1996; Weiler C *et al.*, *Spine* 30:44-53, 2005; Igarashi T *et al.*, *Spine* 25:2975-2980, 2000; Olmarker K *et al.*, *Spine* 23:2538-2544, 1998; Le Maitre CL *et al.*, *Arthritis Res Ther* 7:R732R745, 2005; y Seguin CA *et al.*, *Spine* 30:1940-1948, 2005).

Estos métodos terapéuticos biológicos se han realizado principalmente fuera del país. El método popular que atrae una gran cantidad de interés es la inyección directa de un factor de crecimiento óseo (proteína morfogenética ósea, BMP) en un disco o el trasplante de células de disco inyectadas con genes terapéuticos (Masuda K *et al.*, *Spine* 31:742-745, 2006; Imai Y *et al.*, *Spine* 32: 11971205, 2007; Zhang Y *et al.*, *Spine* 33:831-838, 2008). Sin embargo, este método es simplemente un método para alcanzar cambios físicos de una estructura de disco mediante regeneración física, que no proporciona alivio o eliminación del dolor en pacientes, y un crecimiento excesivo del disco, si hay alguno, puede producir el agravamiento de las afecciones neurológicas debido a la compresión de nervios.

Mientras tanto, se sabe que la señalización de TGF-beta1 está implicada en fibrosis, apoptosis, angiogénesis, invasión de células tumorales y metástasis, y la inhibición de la señalización de TGF-beta1 puede ser una medida factible para hacer el tratamiento de fibrosis de órganos del cuerpo, cáncer y/o glomeruloesclerosis (Prud'homme GJ, *Lab Invest* 87:1077-1091, 2007).

Para este fin, hay una necesidad para el desarrollo de un material biológico nuevo que sea eficaz para la discopatía degenerativa fomentando la regeneración discal al tiempo que minimiza la degeneración del disco mismo, y sea

capaz de tratar fibrosis de órganos corporales, cáncer, glomeruloesclerosis, o similares, mediante la inhibición de la señalización TGF-beta1.

5 El documento US 6.277.812 se refiere a un método para inhibir TGF-β con la ayuda de una secuencia de aminoácidos del dominio de unión a TGF-β de un miembro de la superfamilia de decorina de proteoglicanos de mamífero que tienen proteínas centrales de aproximadamente 40 kDa.

10 A. G. Nerlin et al (Eur. Spine J. 2005, 14:17-26) se refiere a un estudio sobre la distribución de fibronectina y TGF-β1 en el tejido de disco intervertebral de individuos de diferentes edades y varias evidencias histomorfológicas para la degeneración tisular.

## Divulgación de la invención

### Problema técnico

15 Se pretende que la siguiente invención proporcione un péptido novedoso, que sea capaz de fomentar la regeneración discal al tiempo que minimiza la degeneración del disco mismo.

20 Además se pretende que la presente invención proporcione una composición eficaz para tratar fibrosis de órganos del cuerpo, cáncer, o glomeruloesclerosis.

### Solución técnica

25 La presente invención proporciona un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos (LQVVYLH) de SEQ ID NO: 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, L, Q, V, Y, y H representan leucina (Leu), glutamina (Gln), valina (Val), tirosina (Tyr) e histidina (His), respectivamente.

30 Cada uno de los aminoácidos constituyentes del péptido puede estar en la forma L, la forma D y/o la forma DL, todas ellas abarcadas en los aminoácidos constituyentes del péptido de la presente invención.

35 Los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable puede incluir clorhidrato, sulfato, fosfato, lactato, maleato, fumarato, oxalato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, y similares.

40 Además, la presente invención proporciona un uso médico de un péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención. El uso médico incluye uso terapéutico y/o preventivo para discopatías degenerativas, uso terapéutico para fibrosis de órganos del cuerpo, uso terapéutico para cáncer, y uso terapéutico para glomeruloesclerosis. El tratamiento de fibrosis de órganos del cuerpo, cáncer, o glomeruloesclerosis es mediante la inhibición de la señalización del factor de crecimiento transformante-beta1 (TGF-β1).

45 TGF-β se conoce como una citoquina muy pleotrópica que desempeña un papel importante en el control de apoptosis, angiogénesis, cicatrización, regulación inmunitaria, y biología tumoral. TGF-β existe en tres isoformas: TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3. Los tres TGF-β usan el mismo receptor. El receptor de TGF-β tiene tres componentes: tipo I (RI o ALK5), tipo II (RII), y tipo III (RIII o betaglicano). TGF-β (todas las isoformas) se une a RIII y recluta RII, que después fosforila RI para formar un complejo serina/treonina quinasa heterotetramérico. A su vez, RI fosforila Smad2 y Smad3 (Smads asociadas a receptor (R-Smads)), y la última forma un complejo heteromérico con Smad4, que se transloca al núcleo, se une a ADN y regula la transcripción (Prud'homme GJ, *Lab Invest* 87:1077-1091, 2007).

50 Como se usa en el presente documento, el término "inhibición de la señalización de TGF-beta1" significa que TGF-β1 falla para unirse al receptor, entonces Smad2 y Smad3 fallan para experimentar fosforilación, por tanto fallan para formar un complejo con Smad4, y como resultado, el complejo falla para translocarse al núcleo y regular transcripción.

55 Según esto, la presente invención proporciona una composición para tratar y/o prevenir una discopatía degenerativa, que comprende el péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención.

60 Además, la presente invención, proporciona una composición para tratar fibrosis de órganos del cuerpo, que comprende el péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención.

Además, la presente invención, proporciona una composición para tratar cáncer, que comprende el péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención.

65 Además, la presente invención, proporciona una composición para tratar glomeruloesclerosis, que comprende el péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención.

El péptido de la presente invención se puede preparar por procesos comúnmente usados en la síntesis de péptidos. Por ejemplo, el péptido se puede preparar mediante esos procesos descritos en Schroder y Lubke, The Peptides, Vol. 1, Academic Press, Nueva York, 1965, y similares, y se puede preparar bien por síntesis en fase solución o síntesis en fase sólida.

Los ejemplos de los métodos para la formación de los enlaces peptídicos incluyen el método de acida, método del cloruro ácido, método del anhídrido simétrico, método del anhídrido mezcla, método de carbodiimida, método aditivo de carbodiimida, método del éster activado, método de carbodiimidazol, método de oxidación-reducción, y el método que emplea el reactivo K de Woodward. En la síntesis del péptido, la fracción de cistina se puede formar empleando un derivado de cisteína o convirtiendo una fracción de cisteína de la cadena peptídica en una fracción de cistina después de la formación de una cadena peptídica, por el método convencional.

Antes de llevar a cabo la reacción de acoplamiento, un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo hidroxilo, y similares, que no participan en la reacción de acoplamiento se pueden proteger, y el grupo carboxilo y el grupo amino que participan en la reacción de acoplamiento se pueden activar por métodos conocidos en la técnica.

Los ejemplos de grupos protectores para el grupo carboxilo pueden incluir grupos formadores de ésteres tal como metilo, etilo, bencilo, p-nitrobencilo, t-butilo y ciclohexilo.

Los ejemplos de los grupos protectores para el grupo amino pueden incluir benciloxicarbonilo, t-butoxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo y/o 9-fluorenilmetiloxicarbonilo.

Los ejemplos de los grupos protectores para el grupo guanidino pueden incluir nitro, benciloxicarbonilo, tosilo, p-metoxibencenosulfonilo y/o 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo.

Los ejemplos de los grupos protectores para el grupo hidroxilo pueden incluir t-butilo, bencilo, tetrahidropirranilo y/o acetilo.

Los ejemplos de las formas activadas del grupo carboxilo pueden incluir anhídrido simétrico, acida y éster activo (éster con alcohol, por ejemplo, pentaclorofenol, 2,4-dinitrofenol, alcohol cianometílico, p-nitrofenol, N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxamida, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxitfalimida y 1-hidroxibenzotriazol).

Un ejemplo del grupo amino activado es amida fosfato.

La reacción se lleva a cabo en un solvente tal como cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, N,N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, piridina, dioxano, tetrahidrofurano, agua, metanol o una mezcla de los mismos.

La temperatura de reacción puede estar en el intervalo de aprox. -30°C a 50°C, que generalmente se emplea para la reacción.

La reacción para eliminar el grupo protector del péptido de la presente invención puede ser diferente dependiendo del tipo de grupo protector, pero deber ser la que sea capaz de liberar el grupo protector sin dar ninguna influencia al enlace peptídico.

El grupo protector se puede eliminar por tratamiento ácido, por ejemplo, tratamiento con cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, fluoruro de hidrógeno, ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido trifluoroacético o una mezcla de estos ácidos. Además, se puede emplear la reducción con un metal de sodio en amoniaco líquido o reducción catalítica sobre paladio-carbono.

Al realizar la reacción para eliminar el grupo protector mediante el tratamiento ácido anterior, se puede adoptar un aditivo tal como anisol, fenol o tioanisol.

Después de terminar la reacción, el péptido preparado de la presente invención se puede recuperar por un proceso convencional para la purificación de péptidos, por ejemplo, extracción, reparto, reprecipitación, recristalización o cromatografía en columna.

Además, el péptido de la presente invención se puede convertir en o su sal farmacéuticamente aceptable como se ha descrito anteriormente en la manera convencional.

El péptido según la presente invención se puede sintetizar mediante un sintetizador automático de péptidos o se puede producir por técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, un péptido deseado se puede producir preparando un gen fusión que codifica una proteína de fusión que consiste en un compañero de fusión y el péptido de la presente invención mediante manipulación génica, transformando un microorganismo huésped con el gen fusión,

expresando un péptido deseado en la forma de una proteína de fusión en el microorganismo huésped, y cortando y separando el péptido de la presente invención de la proteína de fusión usando una proteasa o compuesto.

5 Los aminoácidos usados en la presente invención se abrevian según la nomenclatura de la IUPAC\_IUB como a continuación.

| <u>Aminoácido</u> | <u>Abreviatura</u> |
|-------------------|--------------------|
| Alanina           | A                  |
| Arginina          | R                  |
| Asparagina        | N                  |
| Ácido aspártico   | E                  |
| Cisteína          | C                  |
| Ácido glutámico   | D                  |
| Glutamina         | Q                  |
| Glicina           | G                  |
| Histidina         | H                  |
| Isoleucina        | I                  |
| Leucina           | L                  |
| Lisina            | K                  |
| Metionina         | M                  |
| Fenilalanina      | F                  |
| Prolina           | P                  |
| Serina            | S                  |
| Treonina          | T                  |
| Triptófano        | W                  |
| Tirosina          | Y                  |
| Valina            | V                  |

10 Una dosis de péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo está en el intervalo de 50 µg/día a 1 mg/día, preferiblemente de 0,5 mg/día a 1 mg/día para administración parenteral. Para administración oral, la dosis es de 1,2 a 1,5 veces mayor que la dosis parenteral. Para la administración rectal, la dosis es de 2 a 5 veces mayor que la dosis parenteral. El péptido de la presente invención se administra principalmente por rutas parenterales, por ejemplo, inyección local (inyección intradiscal para discopatía degenerativa, e inyección intralesión local para otras fibrosis de órganos del cuerpo y cáncer), inyección intravenosa/intramuscular o subcutánea, administración intracerebroventricular o intramedular o administración transnasal y administración intrarrectal. Además, se puede adoptar la administración oral, si es necesario.

20 El péptido o composición de la presente invención, en combinación con un soporte farmacéuticamente aceptable, se puede formular en formas farmacéuticas deseadas tal como inyecciones, supositorios, polvos, gotas nasales, gránulos, comprimidos, etc.

25 El soporte farmacéuticamente aceptable se puede preparar según un número de factores bien conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo, considerando los siguientes factores no limitantes: el material fisiológicamente activo particular que se va a usar, y su concentración, estabilidad y biodisponibilidad pretendida; la enfermedad, trastorno, o afección que se trata; el sujeto que se trata, y su edad, tamaño y estado general; y la ruta pretendida de administración de la composición, por ejemplo, nasal, oral, ocular, local, transdérmica, e intramuscular. Generalmente, los ejemplos del soporte farmacéuticamente aceptable usado para la administración de un material fisiológicamente activo, diferentes de la ruta de administración oral, pueden incluir D5W (glucosa en agua al 5%), una solución acuosa que contiene el 5% en volumen o menos de dextrosa, y solución salina fisiológica. En el caso de inyección intralesión local, se pueden emplear una variedad de hidrogeles inyectables para aumentar los efectos terapéuticos e incrementar la duración de la eficacia del fármaco. Además, el soporte farmacéuticamente disponible puede contener ingredientes adicionales que pueden aumentar la estabilidad de los ingredientes activos, tal como conservantes y antioxidantes. El péptido o composición de la presente invención se puede formular preferiblemente en una forma farmacéutica deseada, dependiendo de las enfermedades que se van a tratar y los ingredientes, usando cualquier método apropiado conocido en la técnica, por ejemplo, como se divulga en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA (última edición).

40 El péptido de la presente invención se puede almacenar en una solución salina fisiológica y se puede liofilizar en una ampolla después de la adición de manitol o sorbitol. El péptido liofilizado se puede disolver en solución salina fisiológica o similar para la reconstitución antes del uso.

Además, la presente invención proporciona el péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención para su uso como un medicamento.

Además, la presente invención proporciona un uso del péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención para la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir discopatía degenerativa, fibrosis de órganos del cuerpo, cáncer y/o glomeruloesclerosis.

5 Además, la presente invención proporciona un método para tratar y/o prevenir discopatía degenerativa, fibrosis de órganos del cuerpo, cáncer y/o glomeruloesclerosis, que comprende administrar el péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención a un sujeto (un mamífero incluyendo un ser humano).

10 El tratamiento de fibrosis de órganos del cuerpo, cáncer y/o glomeruloesclerosis puede ser por la inhibición de la señalización de TGF-beta1.

### Efectos ventajosos

15 Un péptido novedoso de la presente invención o sal farmacéuticamente aceptable del mismo es eficaz para tratar y/o prevenir discopatía degenerativa, fibrosis de órganos del cuerpo, cáncer y/o glomeruloesclerosis, y es eficaz para la inhibición de la señalización de TGF-beta1.

### Descripción de las figuras

20 La figura 1 ilustra una fotografía tomada después de teñir tejido discal normal, tejido discal degenerado al que se administra DMSO, y tejido discal degenerado al que se administra péptido del ejemplo 1.

25 La figura 2 ilustra un gráfico que muestra niveles de expresión del gen de agregano de un grupo de disco al que se administra DMSO y un grupo de disco al que se administra péptido del ejemplo 1 en un modelo de degeneración de disco, en comparación con un grupo de disco normal como referencia.

30 La figura 3 ilustra los resultados del análisis de inmunotransferencia para la confirmación de la Smad2 fosforilada expresada en células HepG2 no tratadas, células tratadas con TGF-beta1, células tratadas con TGF-beta1/SB431542, células tratadas con TGF-beta1/péptido del ejemplo 1, y células tratada con TGF-beta1/DMSO.

### Modo para la invención

35 Ahora, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo para ilustrar la presente invención y no se deben interpretar como limitantes del ámbito y espíritu de la presente invención.

#### Ejemplo 1: Preparación del péptido

40 Se preparó un péptido (LQVVYLH: SEQ ID NO: 1) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 por Pepton Inc. (República de Corea), a petición de los presentes inventores. Específicamente, las unidades de aminoácidos se acoplaron una por una desde el C-terminal por SPPS de Fmoc (síntesis de péptidos en fase sólida de 9-fluorenilmetiloxicarbonilo) usando un sintetizador de péptidos automático (ASP48S, Pepton Inc.).

45 Se usó resina NH<sub>2</sub>-His(Trt)-2-cloro-tritilo en la que el primer aminoácido del C-terminal del péptido se unió a la resina. Todos los aminoácidos usados en la síntesis de péptidos eran los protegidos con tritilo (Trt), t-butoxicarbonilo (Boc), t-butilo (t-Bu), y similares, por lo cual el N-terminal está protegido por Fmoc y los residuos se eliminan todos en ácido. Como reactivo de acoplamiento, se usó hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU)/hidroxibenzotriazol (HOBt)/N-metilmorfolina (NMM). (1) Se disolvieron aminoácidos protegidos (8 equivalentes) y el reactivo de acoplamiento HBTU (8 equivalentes)/HOBt (8 equivalentes)/NMM (16 equivalentes) en dimetilformamida (DMF) y se añadieron seguido por reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. (2) La eliminación de Fmoc se llevó a cabo añadiendo piperidina al 20% en DMF, seguido por reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos dos veces. Las reacciones de (1) y (2) se repitieron para preparar un esqueleto peptídico básico, y el péptido se separó de la resina usando ácido trifluoroacético (TFA)/1,2-etanoditiol (EDT)/tioanisol/triisopropilsilano (TIS)/H<sub>2</sub>O = 90/2,5/2,5/2,5/2,5. El péptido se purificó por HPLC de fase reversa usando una columna Vydac Everest C18 (250 mm 22 mm, 10 μm), y después se separó por gradiente lineal de agua-acetonitrilo (del 10 al 75% (v/v) de acetonitrilo) que contenía ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v). Se confirmó un peso molecular del péptido purificado usando una LC/MS (Agilent serie HP1100), seguido por liofilización.

#### Ejemplo 2: Confirmación de los efectos de regeneración de disco

60 2-1. Preparación de animal modelo de regeneración de disco y recogida de disco experimental.

Se prepararon 30 conejos blancos New Zealand; Orient Bio Inc.), que pesaban de 3 a 3,5 kg, independientemente de su sexo.

65

Los conejos se anestesiaron por inyección intramuscular de 5 mg/kg de xilacina (Rompun, Bayer) y 35 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Ketalar, Pfizer). Antes del procedimiento, se obtuvo rayos X corriente lateral usando un aparato fluoroscópico (modelo VPX-200; Toshiba Co.) para establecer la altura basal preinyección del disco intervertebral. El control basal se refiere a un estándar para la medida de un espacio discal. Después de colocar los conejos en la mesa de laboratorio, los niveles discales L23, L34, L45 y L56 se confirmaron mediante la máquina, y el anillo fibroso se pinchó en el lado posterolateral del disco en los niveles L23, L45 y L56, usando una aguja de 18G. Después de la recuperación de la anestesia, los animales se metieron en una jaula con las siguientes condiciones de cría: temperatura 20-25°C, humedad 10%-50%, y ciclo de luz/oscuridad (L/O): (luz desde las 08:00 a.m. hasta las 20:00 p.m.). Todos animales se alimentaron una vez al día. Se tomaron fotografías de rayos X 2 y 4 semanas después de la punción anular inicial. Los rayos X se tomaron después de la anestesia. Basándose en los resultados de rayos X, se midió la altura del disco intervertebral (altura DIV). De los resultados de las medidas, se cuantificó el grado de degeneración discal por una modificación del método divulgado en Lu *et al.*, *Spine*. 22:1828-34, 1997.

Después de ello, se llevaron a cabo experimentos para dos grupos separados, grupo control al que se administra DMSO y grupo experimental al que se administra el péptido del ejemplo 1, y los conejos se sacrificaron por inyección de ketamina (25 mg/kg) y pentobarbital sódico (1,2 g/kg, Nembutal, Ovation) según el programa planeado, seguido por la extracción de los discos para análisis histológico y bioquímico, respectivamente.

## 2-2. Medida de los efectos de regeneración discal por tinción de tejido discal

Los conejos con el disco degenerado de la sección 2-1 se dividieron en dos grupos. A cada grupo se le dio dimetilsulfóxido (DMSO) y el péptido del ejemplo 1 (0,5 mM/animal) por inyección intradiscal local dos veces. El punto de administración para cada grupo fue 4 semanas después de la inducción de la degeneración de disco y 2 semanas después de ello. Después de la segunda administración, los animales se criaron durante 2, 4 y 8 semanas, respectivamente. En las semanas 4, 6 y 10 después de la primera administración de cada uno del péptido del ejemplo 1 y DMSO, los correspondientes tejidos discales respectivos se extrajeron y fijaron en formalina. Los tejidos discales fijados se incluyeron en parafina, y se prepararon secciones en serie que tenían un espesor de 4 m a lo largo del plano sagital. De estas secciones, dos secciones sagitales medias se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Para la comparación con el tejido discal normal, el disco se extrajo, se trató y tiñó de los conejos sin inducción de degeneración de disco según el mismo método descrito anteriormente.

La figura 1 ilustra los resultados micrográficos de tejidos discales individuales, que se extrajeron y tiñeron en la semana 10. A y B: tejido de disco normal, C y D: tejido de disco degenerado con DMSO administrado, y E y F: tejido de disco degenerado con péptido del ejemplo 1 administrado. A, C y E: x40, y B, D y F: x400. En las fotos de x400, la flecha indica un núcleo de célula de disco.

Como resultado, se observó que el núcleo pulposo y el anillo fibroso son definitivamente distinguibles entre ellos y los componentes de matriz extracelular son abundantes en tejido de disco normal (paneles A y B de la figura 1). Además, se observó tinción distintiva del núcleo celular en el núcleo pulposo del tejido de disco normal (panel B de la figura 1).

Por otra parte, el tejido de disco al que se administró DMSO mostró una reducción del tamaño del disco, indefinición entre el anillo fibroso y el núcleo pulposo, y escasez de componentes de matriz extracelular (paneles C y D de la figura 1). Además, era difícil encontrar el núcleo celular teñido en la región del núcleo pulposo (panel D de la figura 1). Es decir, estos resultados indican la muerte de células, que habían estado presentes en el núcleo pulposo. La muerte celular debido a la degeneración del disco ya es conocida, y la ausencia de células produjo la no producción de componentes de matriz extracelular, empeorando más de esta manera la degeneración del disco.

El tejido de disco al que se administró el péptido del ejemplo 1 mostró un tamaño aumentado de disco comparado con el tejido de disco al que se administró DMSO, siendo discernible entre el núcleo pulposo y el anillo fibroso, y abundancia de componentes de matriz extracelular (paneles E y F de la figura 1). Además, se observó tinción vívida de los núcleos celulares en la región del núcleo pulposo (panel F de la figura 1).

De estos resultados, se demostró que el péptido del ejemplo 1 tiene efectos terapéuticos para el disco previniendo una disminución de componentes de matriz extracelular y la muerte de células debido a la degeneración del disco.

### **Ejemplo 3: Confirmación de expresión aumentada del gen de agregano en tejidos de disco**

Se llevó a cabo PCR en tiempo real para examinar un nivel de expresión génica de agregano, que es un componente representativo de la matriz extracelular en tejidos de disco.

De la misma manera que en el ejemplo 2-1, los animales se prepararon y dividieron en dos grupos, a cada uno de los cuales se les administró DMSO y el péptido del ejemplo 1 (0,5 mM/animal) por inyección intradiscal local. El punto de administración para cada grupo fue 4 semanas después de la inducción de la degeneración de disco y 2 semanas después de ello. Después de la segunda administración, los animales se criaron durante 2, 4 y 8 semanas, respectivamente. En las semanas 4, 6 y 10 después de la primera administración de cada uno del péptido del

ejemplo 1 y DMSO, los correspondientes tejidos de disco respectivos se extrajeron, y el núcleo pulposo y el anillo fibrosos se separaron y colocaron en tubos, seguido por congelación rápida en nitrógeno líquido y almacenamiento en un congelador de temperatura ultrabaja a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

- 5 El ARN total se aisló del tejido de disco congelado rápidamente y almacenado usando un reactivo Trizol (Invitrogen). El ADNc se sintetizó usando el ARN total aislado ( $2\ \mu\text{g}$ ), oligo dT y transcriptasa inversa de MMLV (Invitrogen).

La cantidad de ARNm de GADPH y agregano se examinó mediante un Prism 7900HT (ABI) usando mezcla maestra PowerSYBR Green PCR (Applied Biosystems Inc.). Se mezclaron  $25\ \text{ng}$  de ADNc,  $3\ \mu\text{l}$  de cebadores  $10\ \mu\text{M}$ , y mezcla maestra PowerSYBR Green PCR 2X para hacer un volumen total de  $10\ \mu\text{l}$ . La PCR a tiempo real se realizó en las siguientes condiciones de reacción: inducción de la actividad enzimática a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos y a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, y después 45 ciclos que consistía cada uno en reacción a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 15 segundos y reacción a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto, seguido por medida de cada valor de ciclo umbral (CT). Se seleccionó GADPH como un gen de referencia, y se calculó una diferencia del valor de CT ( $\Delta\text{CT}$ ) entre el gen e referencia y el gen de agregano. Además, se calculó una diferencia de valor de CT ( $\Delta\Delta\text{CT}$ ) entre el disco normal y el disco al que se administra péptido del ejemplo 1 (o disco al que se administra DMSO). A continuación, se calculó  $2^{(-\Delta\Delta\text{CT})}$  y se expresó en términos de porcentaje relativo al valor del disco normal.

Los resultados de la PCR en tiempo real se dan en la figura 2. La figura 2 es un gráfico que muestra la evolución temporal del nivel de expresión del gen de agregano del grupo de disco al que se administró DMSO y el grupo de disco al que se administró el péptido del ejemplo 1 en el modelo de degeneración de disco, en comparación con un grupo de disco normal como referencia. Como se muestra en el gráfico superior, se puede ver que en la semana 4, el tejido de disco al que se administró péptido del ejemplo 1 mostraba un aumento en la expresión del gen de agregano comparado con el tejido de disco al que se administró DMSO. En las semanas 6 y 10, el tejido de disco al que se administró péptido del ejemplo 1 mostraba un nivel de expresión del gen de agregano similar al del tejido de disco al que se administró DMSO. Puesto que el péptido del ejemplo 1 se administró solo en las semanas 0 y 2 y después los animales permanecieron sin administración adicional, se puede decir que se logró un aumento en la expresión del gen de agregano en la semana 4 por eficacia del péptido del ejemplo 1 que, sin embargo, no mantuvo la expresión del gen de agregano en las semanas 6 y 10. De estos resultados, se puede ver que el péptido de la presente invención muestra efectos de regeneración de disco al aumentar la expresión génica de agregano, un componente representativo de la matriz extracelular esencial para la regeneración de disco en el tejido de disco, y la duración de los efectos aumentadores de la expresión del gen de agregano del péptido no es excesivamente larga para excluir de esta manera posibles efectos secundarios debido a un aumento excesivo de la expresión del gen de agregano.

### 35 Ejemplo 3: Confirmación de la inhibición de la señalización de TGF-beta 1

La inhibición de la señalización de TGF-beta1 por el péptido del ejemplo 1 se confirmó según el siguiente método experimental.

Se sabe que el tratamiento de células HepG2 con TGF-beta1 produce apoptosis, durante la cual Smad2 se fosforila primero (Park T.J. *et al.*, *Mol Carcinog.* 47:784-796, 2008; y Gressner AM. *et al.*, *J Hepatol.* 26:1079-1092, 1997). Usando estas propiedades, el experimento se llevó a cabo como sigue. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células HepG2 (ATCC; Colección Americana de Cultivos Tipo) en una placa de  $60\ \text{mm}$ , se estabilizaron durante la noche, y después se eliminaron los nutrientes mediante medio sin suero (SFM) durante 24 horas. Antes del tratamiento de las células con el péptido del ejemplo 1,  $5\ \text{ng/ml}$  de TGF-beta1 (PromoKine, Alemania) y el péptido anterior ( $1$ ,  $5$  y  $25\ \mu\text{M}$ ) se sometieron a preincubación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Además, también se preincubó DMSO ( $2\ \mu\text{l/ml}$ ) con TGF-beta1 ( $5\ \text{ng/ml}$ ) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. A continuación, las células se trataron con las soluciones preincubadas durante 30 minutos, seguido por extracción de proteínas. Además, las células se trataron previamente solo con  $10\ \mu\text{M}$  de SB431542 (TOCRIS, EE UU), un inhibidor del receptor de TGF-beta1, seguido por incubación durante 1 hora, y después se trataron con TGF-beta1 ( $5\ \text{ng/ml}$ ) durante 30 minutos. Después la células se homogenizaron en hielo en tampón de lisis de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Millipore) {Tris-HCl  $50\ \text{mM}$  (pH 7,4), NaCl  $150\ \text{mM}$ , ácido desoxicólico al  $0,25\%$ , NP-40 al  $1\%$ , ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)  $1\ \text{mM}$ , fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)  $1\ \text{mM}$ , NaF  $40\ \text{mM}$ ,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$   $1\ \text{mM}$ , ditiotreitól (DDT)  $1\ \text{mM}$ }. El homogenizado se sonicó cinco veces usando un BRANSON SONIFIER 450 con control de salida 2,56, ciclo de trabajo (%) 20 y cronómetro 6. El lisado celular se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  y  $12.000\ \text{rpm}$  durante 10 minutos, y el sobrenadante se usó para análisis de inmunotransferencia. La concentración de proteína se ensayó usando el método de Bradford. Se añadieron  $30\ \mu\text{g}$  de la proteína a tampón de muestra con SDS que contenía 2-mercaptoetanol. Después dejar reposar a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, se llevó a cabo el fraccionamiento por SDS-PAGE al  $10\%$ , seguido por inmunotransferencia. Para el análisis por inmunotransferencia, la proteína fraccionada se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Lab), y se bloqueó con leche desnatada al  $5\%$  en PBS-T, seguido por reacción con una dilución 1:3000 del anticuerpo primario en leche desnatada al  $5\%$  en PBS-T, a  $4^{\circ}\text{C}$  durante la noche. A continuación, la membrana se lavó tres veces con PBS-T durante 5 min, se trató con una dilución 1:5000 de anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (Bio-Rad Lab, 1706515) en leche desnatada al  $5\%$  en PBS-T a temperatura ambiente durante 1 hora, y se sometió a desarrollo de color usando ECL (Amersham Pharmacia). Puesto que Smad2 se fosforila

primero simultáneamente con la unión de TGF-beta1 al receptor de TGF-beta, se usó el anticuerpo contra fosfo-Smad2 (ser465/467) (Cell Signaling, 3101, 8) capaz de detectar Smad2 fosforilada como anticuerpo primario.

Los resultados se muestran en la figura 3. La figura 3 ilustra los resultado de inmunotransferencia (Carril 1: células HepG2 sin tratar, carril 2: células tratadas con TGF-beta1, carril 3: células tratadas con TGF-beta1/SB431542, carriles 4, 5 y 6: células tratadas con 1, 5 y 25 µM de péptido/TGF-beta1, respectivamente, y carril 7: células tratadas con TGF-beta1/DMSO). En la figura 3, el símbolo '+' representa que se trató con el material objeto, y '-' representa que no se trató con el material objeto. La parte inferior de la figura 3 ilustra los resultados de tinción con azul de Coomassie de la membrana usada en la inmunotransferencia, lo muestra que la cantidad de proteína es la misma en todos los carriles.

Respecto a la figura 3, se observó que el carril 1 muestra muy poca fosforilación de la proteína extraída de las células HepG2 no tratadas, mientras que el carril 2 muestra fosforilación significativa de la proteína por TGF-beta1. Además, se observó que el carril 3 muestra inhibición completa de la fosforilación por SB431542. Se confirmó que el grado de fosforilación de la proteína disminuía de una manera dependiente de la dosis, cuando el péptido del ejemplo 1 se trató a una concentración de 1 µM, 5 µM y 25 µM, respectivamente. El carril 7 tratado con DMSO mostró los mismos perfiles que el tratamiento de TGF-beta1.

De estos resultados, se puede ver que puesto que el péptido de la presente invención muestra irhibición de la señalización de TGF-beta1 dependiente de la dosis, se pueden tratar enfermedades curables por la inhibición de la señalización de TGF-beta1 anteriormente mencionadas, es decir, fibrosis de órganos del cuerpo, cáncer y/o glomeruloesclerosis (Prud'homme GJ, *Lab Invest* 87:1077-1091, 2007). Además, se puede ver que el péptido del ejemplo 1 no inhibe completamente la señalización de TGF-beta1 a diferencia a SB431542. Como la señalización de TGF-beta1 es un mecanismo regulador importante en el cuerpo humano, la inhibición completa de la señalización de TGF-beta1, tal como por SB431542, puede producir efectos secundarios. Sin embargo, el péptido de la presente invención disminuye la señalización de TGF-beta1 en una forma dependiente de la dosis, de modo que la concentración de péptido se puede ajustar ventajosamente para reducir de esta manera los posibles efectos secundarios cuando se usa para el tratamiento de enfermedades concernidas.

### 30 **Aplicabilidad industrial**

El péptido novedoso de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es eficaz para tratar y/o prevenir discopatías degenerativas, fibrosis de órganos corporales, cáncer y/o glomeruloesclerosis, y es eficaz para la inhibición de la señalización de TGF-beta1, y por tanto es industrialmente aplicable.

### 35 **Lista de secuencias**

<110> Ensoltek Co., Ltd.

40 <120> Un péptido novedoso y uso del mismo

<130> P09062-ENS

<150> KR10-2009-0075142

45 <151> 14-08-2009

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

50 <210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> péptido

<400> 1

**Leu Gln Val Val Tyr Leu His**

**1**

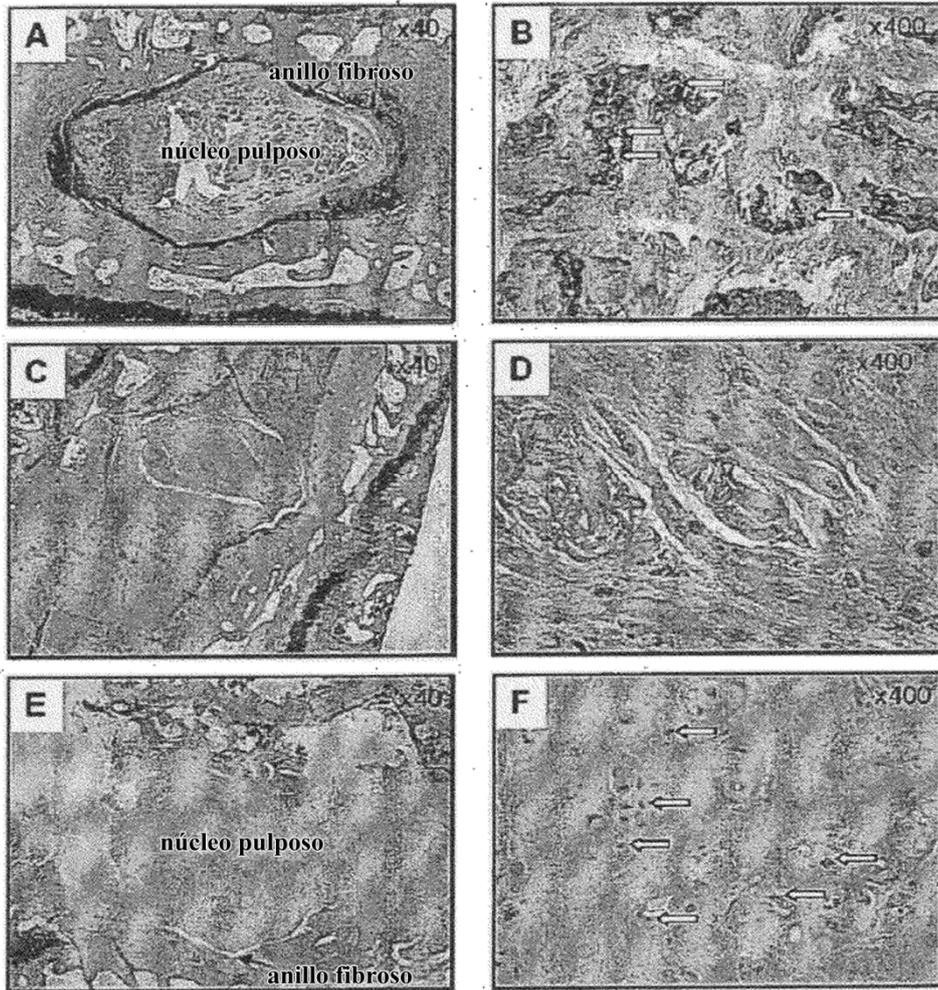
**5**

60

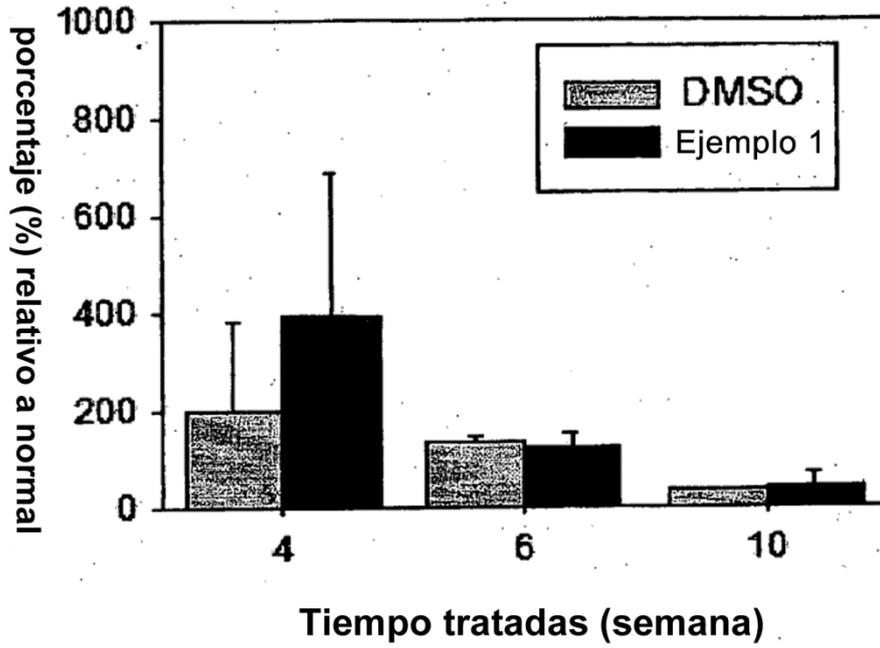
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. Una composición para uso en tratar y prevenir discopatías degenerativas, que comprende el péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 1.
- 10 3. Una composición para uso en tratar y prevenir fibrosis de órganos del cuerpo, cáncer o glomeruloesclerosis, que comprende el péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 1.
4. La composición según la reivindicación 3, en donde el tratamiento de fibrosis de órganos del cuerpo, cáncer o glomeruloesclerosis es por la inhibición de la señalización de TGF-beta1.
- 15 5. El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 1 para uso como medicamento.

【Figura 1】



【Figura 2】



【Figura 3】

|                    |   |   |   |   |   |    |   |
|--------------------|---|---|---|---|---|----|---|
| TGF-beta1 (5ng/ml) | - | + | + | + | + | +  | + |
| SB431542 (10uM)    | - | - | + | - | - | -  | - |
| Ejemplo 1 (uM)     | - | - | - | 1 | 5 | 25 | - |
| DMSO (2ul/ml)      | - | - | - | - | - | -  | + |

