

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 778**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2011 PCT/KR2011/004541**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12002668**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2011 E 11801075 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2588491**

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

30 Prioridad:

30.06.2010 KR 20100062467

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

27.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIM, HAE JIN;
LEE, JE WOOK;
KWON, YOUNG JOON y
MOON, EUN JOUNG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 606 778 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. Específicamente, la presente invención se refiere a un péptido novedoso que es eficaz para el tratamiento y/o prevención de lesión en el cartilago o artritis.

10 **Antecedentes técnicos**

El tejido cartilaginoso está compuesto de una matriz y condrocitos. Entre estos, las fibras de colágeno (colágeno, proteoglicano) de la matriz, junto con proteínas no colágenas, absorben y descargan agua en/del cartilago para desempeñar de esta manera un papel importante en el mantenimiento de las propiedades físicas únicas al cartilago. La lesión del tejido cartilaginoso se observa en gran parte en enfermedades de las articulaciones, y el tejido cartilaginoso de las articulaciones se subdivide ampliamente en cuatro zonas, es decir, la zona tangencial superficial más externa, una zona media, una zona profunda y una zona calcificada (Clouet J *et al.*, *Drug Discovery Today* (2009) 14:19/20, 913-925). La zona tangencial superficial es una región con una proporción relativamente baja de la matriz, en la que las fibras de colágeno están densamente organizadas a lo largo de la superficie de la articulación y están presentes condrocitos que tienen una morfología celular fina y plana, y que absorbe fuerza de cizalla del movimiento articular. La zona media es más gruesa que la zona tangencial superficial, está compuesta de fibras de colágeno gruesas y condrocitos esféricos, y sirve para aguantar una carga, debido a que tiene una alta proporción de matriz que contiene proteoglicano y agua. La zona profunda es rica en proteoglicano y proteínas no colágenas junto con el mayor contenido de componentes de matriz, pero el menor contenido en agua, y sirve para impartir la estabilidad de tejido a través de la organización vertical de números relativamente pequeños de condrocitos cercanos a la forma esférica y fibras de colágeno. La zona calcificada tiene una estructura específica conocida como línea de flujo y funciona para fijar el tejido cartilaginoso al tejido óseo.

La lesión al tejido cartilaginoso que constituye las articulaciones produce el inicio de artritis que está acompañada por hinchazón, calor y dolor. El inicio de la artritis es independiente de razas y se clasifica en aproximadamente 100 tipos dependiendo de la causa patogénica de la misma. La forma más común de artritis es artrosis, una enfermedad degenerativa de las articulaciones que está causada principalmente por el envejecimiento. Otros ejemplos de artritis incluyen artritis reumatoide y artritis psoriásica que son enfermedades autoinmunitarias, y artritis séptica causada por infecciones. En particular, la artritis degenerativa es una enfermedad representativa de grupos de edad avanzada, y el envejecimiento de las articulaciones es principalmente responsable de la patogénesis de la artritis degenerativa. Además, puesto que la incidencia de artritis degenerativa también se debe a una interacción combinada de varios factores, tal como factores genéticos, nutrición desequilibrada, una falta de ejercicio, ejercicio excesivo o lesión, el comportamiento de aplicar una carga pesada a las articulaciones, por ejemplo, trabajo excesivo o mala postura habitual, y sobrecarga debido a obesidad, la artritis degenerativa también es una enfermedad con alta frecuencia observada entre gente joven (Gegout PP *et al.*, *Joint Bone Spine* (2008) 669-671).

El debilitamiento de la articulación-tejido de apoyo debido a traumatismo o alteración degenerativa produce lesión del tejido cartilaginoso que sirve para absorber el impacto, aumentando de esta manera una fricción hueso a hueso que produce dolor e inflamación. La inflamación acelera la formación de osteofitos alrededor de las articulaciones, que restringen la movilidad de las articulaciones y causa dolor más grave.

La artritis es una enfermedad con una alta incidencia patógena entre grupos de edad amplios y el tejido dañado no experimenta fácilmente regeneración espontánea o restauración. Por tanto, la artritis es responsable de una restricción a largo plazo de actividad social de pacientes y el deterioro de la calidad de vida del paciente.

Las medidas terapéuticas actualmente disponibles se dividen en sentido amplio en terapias conservadoras tal como terapia de ejercicio incluyendo control de peso, terapia dietética, terapia de inyección y farmacoterapia; y terapias quirúrgicas tal como regeneración de tejido usando factores de crecimiento, implante usando células cultivadas artificialmente, y sustitución de articulación artificial que se aplica cuando las articulaciones están gravemente dañadas (Clouet J *et al.*, *Drug Discovery Today* (2009) 14:19/20, 913-925).

La terapia de ejercicio en la gama de no aplicar carga pesada a las articulaciones tiene un efecto de reforzar el tejido que rodea la articulación para retrasar el agravamiento sintomático adicional, pero no proporciona regeneración fundamental del tejido dañado y tiene dificultad de ser llevada a cabo debido al dolor cuando el estado de enfermedad es grave.

Para el fin de fomentar la regeneración del tejido de las articulaciones o aliviar la inflamación, se han usado glucosamina o condroitina que es un componente constituyente del cartilago, aceite de pescado que tiene una acción antiinflamatoria y otras composiciones farmacéuticas herbales (Derfoul A *et al.*, *Osteoarthritis Cartilage* (2007) 15, 646-655; Tiraloché G *et al.*, *Arthritis Rheum.* (2005) 52, 1118-1128; McAlindon TE *et al.*, *JAMA* (2000) 283 (11): 1469-147; y Zainal Z *et al.*, *Osteoarthritis Cartilage* (2009) 17(7): 896-905).

Además, también se ha usado un método de inyectar ácido hialurónico (AH) que es un componente del líquido sinovial de la articulación para el alivio del dolor y prevención del agravamiento sintomático reduciendo la fricción de regiones dañadas (Waddell DD *et al.*, *Arthroscopy* (2010) 26(1):105-11; y Wang CT *et al.*, *J. Bone Joint Surg. Am.* (2004) 86-A 538-545).

Aunque se ha descrito que algunas de estas terapias conservadoras tienen efectos terapéuticos beneficiosos, su alivio del dolor o efectos terapéuticos son insignificantes o el mecanismo de los mismos no se entiende por completo. Por tanto, hay una necesidad para inspección adicional desde el punto de vista de aplicaciones terapéuticas de tales aplicaciones (McAlindon TE *et al.*, *JAMA* (2000) 283 (11): 1469-147).

Para el alivio de la inflamación o dolor, se han usado aspirina, paracetamol o varios fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y fármacos esteroideos tal como cortisona. Sin embargo, estas farmacoterapias no son terapias fundamentales que sean capaces de alcanzar la restauración de un tejido dañado. Además, la administración a largo plazo de tales fármacos tiene efectos secundarios supuestamente adversos tal como daño gastrointestinal, de tejido o hueso (Clouet J *et al.*, *Drug Discovery Today* (2009) 14:19/20, 913-925; Glass GG *Dis. Mon.* (2006) 343-362; Zhang W *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.* (2004) 63, 901-907); Frampton JE *et al.*, *Drugs* (2007) 67(16):2433-72; y McDonough AL. *Phys Ther.* (1982) 62(6): 835-9.).

Para el fin de regeneración o restauración de tejido cartilaginoso dañado, se ha contemplado el uso de una composición que contiene apigenina, o un factor de crecimiento o una parte del mismo, tal como FGF, BMP (BMP7/OP-1) o TGF β 1 (Clouet J *et al.*, *Drug Discovery Today* (2009) 14:19/20, 913-925; Shi S *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2009) 284 (1): 6697-6704; y Moore EE *et al.*, *Osteoarthritis Cartilage* (2005) 13, 623-631). Sin embargo, puesto que hay limitación para llevar a cabo infusión directa y repetida con un factor de crecimiento compuesto de una proteína de alto peso molecular en pacientes de artritis, la aplicación práctica de tal factor de crecimiento a pacientes requiere investigación adicional para un método de administración del mismo.

Cuando las terapias conservadoras anteriormente mencionadas no proporcionan efectos terapéuticos o continúa el dolor intenso, se usa una terapia quirúrgica que implica la sustitución de las articulaciones dañadas con articulaciones artificiales. Sin embargo, una articulación artificial tiene una vida limitada de aproximadamente 10 años, de modo que es necesario una nueva cirugía donde sea apropiado. En este caso, la nueva cirugía tiene limitaciones debido a la dificultad en la eliminación de articulaciones artificiales estenosadas al hueso, una necesidad para implante de articulaciones artificiales mayores, y una necesidad para más tejido óseo periférico más extensivo. Por estos problemas, la aplicación de sustitución de articulación artificial a personas jóvenes se debe hacer con más cuidado.

Con el avance de las técnicas de cultivo celular artificial, recientemente se han descrito métodos que incluyen el cultivo artificial de condrocitos a partir de células madre multipotentes o células madre mesenquimatosas autólogas e implantación de los condrocitos cultivados (Csaki C *et al.*, *Ann Anat.* (2008) 190(5): 395-412). Desgraciadamente, la implantación de condrocitos todavía tiene un gran número de problemas que resolver, en términos de no ser fácil de obtener un número suficiente de células autólogas, junto con problemas técnicos y de costes asociados con la aplicación de la misma a números de pacientes, tal como adhesión de las células implantadas, eficacia de regeneración y seguridad.

Según entramos en una sociedad que envejece, la población de edad avanzada que padece artritis aumenta constantemente. Además, la incidencia de enfermedades de las articulaciones debidas a ejercicio excesivo, nutrición desequilibrada, obesidad o similar también aumenta entre grupos de menor edad. Para reducir la pérdida económica consecuente y gastos sociales y mejorar la calidad de vida de la población de edad avanzada, hay una necesidad urgente para el desarrollo de un fármaco antiartritis avanzado, que sea capaz de alcanzar la regeneración y restauración más conveniente, segura y fundamental de tejido cartilaginoso dañado por artritis, en lugar de la terapia dietética conservadora convencional o farmacoterapia para aliviar la inflamación o dolor, terapia quirúrgica tal como sustitución de articulación artificial, o implantación de condrocitos artificialmente cultivados.

Divulgación

Problema técnico

La presente invención se pretende que proporcione un péptido novedoso o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Además, la presente invención se pretende que proporcione una composición para el tratamiento y/o prevención de al menos uno seleccionado de lesión del cartílago y artritis.

Además, la presente invención se pretende que proporcione una composición que sea terapéuticamente eficaz para lesión del cartílago o artritis.

Solución técnica

La presente invención proporciona un péptido representado por la fórmula (I):



en donde X_1 representa Glu o Asp, X_2 representa His, Lys o Arg, X_3 representa Asp o Glu, con Glu, Asp, Leu, His, Lys y Arg que son respectivamente ácido glutámico, ácido aspártico, leucina, histidina, lisina y arginina; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 El péptido es preferiblemente un péptido (SEQ ID NO: 1; Glu-Leu-His-Leu-Asp) en donde X_1 representa Glu, X_2 representa His y X_3 representa Asp.

15 Los aminoácidos se clasifican dependiendo del atributo del grupo R (un grupo variable diferente de un grupo carboxilo, un grupo amino y un átomo de hidrógeno unido en común a aminoácidos). Glu o Asp se clasifican como un aminoácido ácido {grupos R cargados negativamente (ácidos)}, e His, Lys o Arg se clasifican como un aminoácido básico {grupos R cargados positivamente (básicos)}. El aminoácido ácido tiene un grupo R que está cargado negativamente a pH 7,0 y también tiene un grupo carboxilo. El aminoácido básico tiene un grupo R que está positivamente cargado a pH 7,0. Los aminoácidos que pertenecen a la misma clasificación tienen propiedades similares.

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

25 Los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable incluyen clorhidrato, sulfato, fosfato, lactato, maleato, fumarato, oxalato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato.

Además, la presente invención proporciona un uso del péptido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento y/o prevención de lesión del cartílago o artritis.

30 Por tanto, la presente invención proporciona una composición, que contiene el péptido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como un principio activo, para el tratamiento y/o prevención de al menos uno seleccionado de lesión del cartílago y artritis.

35 El "tratamiento y/o prevención" puede ser al menos uno seleccionado de la regeneración de tejido cartilaginoso, la inhibición de la expresión de enzima degradante de la matriz de tejido cartilaginoso y la inhibición de osificación de tejido cartilaginoso, y la artritis preferiblemente es una enfermedad de las articulaciones que está acompañada por degeneración de cartílago y hueso subcondral.

40 Además, la presente invención proporciona una composición que contiene el péptido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β 1).

La proporción del péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y TGF β 1 en la composición puede estar en un intervalo de 1:20 a 40 en peso.

45 La composición de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que se puede formular con la adición de un soporte farmacéuticamente aceptable.

50 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 por los procesos descritos en Schroder y Lubke, The Peptides, Vol. 1, Academic Press, Nueva York, 1965, y similares, y se puede preparar o bien por síntesis en fase solución o síntesis en fase sólida.

55 Los ejemplos de los métodos para la formación de los enlaces peptídicos incluyen método de acida, método de cloruro ácido, método de anhídrido simétrico, método de anhídrido mixto, método de carbodiimida, método de carbodiimida-aditivo, método de éster activado, método de carbodiimidazol, método de oxidación-reducción, y el método que emplea el reactivo K de Woodward.

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

Los ejemplos de los grupos protectores para un grupo carboxilo incluyen grupos que forman éster tal como metilo, etilo, bencilo, p-nitrobencilo, t-butilo y ciclohexilo.

65

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

5 Los ejemplos de las formas activadas de un grupo carboxilo incluyen anhídrido simétrico, ácido y éster activo (éster con alcohol, por ejemplo, pentaclorofenol, 2,4-dinitrofenol, alcohol cianometílico, p-nitrofenol, N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxi-ftalimida o 1-hidroxibenzotriazol).

Un ejemplo del grupo amino activado es fosfato de amida.

10 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 la reacción puede estar en el intervalo de aproximadamente -30 a 50°C que generalmente se emplea para la reacción.

15 La reacción para eliminar el grupo protector del péptido puede variar dependiendo del tipo de grupo protector, pero debe ser una que sea capaz de liberar el grupo protector sin dar influencia al enlace peptídico.

20 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 reducción con un metal de sodio en amoniaco líquido o reducción catalítica sobre paladio-carbono.

25 Tras llevar a cabo la reacción de eliminar el grupo protector por el tratamiento ácido, se puede adoptar un aditivo tal como anisol, fenol o tioanisol.

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

30 Además, el péptido de la presente invención se puede convertir a una variante o sal farmacéuticamente aceptable del mismo usando un método convencional.

35 El péptido según la presente invención se puede sintetizar por un sintetizador de péptidos automatizado o se puede producir por técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, se puede producir un péptido deseado 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, transformar un microorganismo huésped con el gen fusión, expresar un péptido deseado en forma de una proteína de fusión en el microorganismo huésped y después cortar y separar el péptido de la presente invención de la proteína de fusión usando una proteasa o compuesto.

40 Una dosis del péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo está en el intervalo de 150 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.

45 El péptido o composición de la presente invención se administra en gran parte por rutas parenterales, por ejemplo, inyección local (inyección en la cavidad intraarticular), inyección intravenosa o subcutánea, o administración transnasal. Además, se puede adoptar la administración oral si es necesario.

50 El péptido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o la composición de la presente invención, en combinación con un soporte farmacéuticamente aceptable, se puede formular en formas farmacéuticas deseadas tal como inyecciones, polvos, gotas nasales, gránulos o comprimidos.

55 El soporte farmacéuticamente aceptable se puede preparar según un número de factores que conocen bien 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 de administración pretendida de la composición, por ejemplo, local, intravenosa, intramuscular, transdérmica, oral o nasal. Generalmente, los ejemplos del soporte farmacéuticamente aceptable usado para la administración de un material fisiológicamente activo, diferente de la vía de administración oral, pueden incluir D5W (glucosa al 5% en agua), una solución acuosa que contiene el 5% en volumen o menos de dextrosa, y solución salina fisiológica. En el caso de inyección intralesional local, se pueden emplear una variedad de hidrogeles inyectables para potenciar los efectos terapéuticos y aumentar la duración de la eficacia del fármaco. Además, el soporte farmacéuticamente disponible puede contener ingredientes adicionales que pueden potenciar la estabilidad de los principios activos, tal como conservantes o antioxidantes. El péptido o composición de la presente invención preferiblemente se puede formular en una forma farmacéutica deseada, dependiendo de las enfermedades que se van a tratar e ingredientes,

usando cualquier método apropiado conocido en la técnica, por ejemplo, como se divulga en in "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA (última edición).

5 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 reconstitución antes del uso.

10 Además, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o prevención de lesión del cartílago o artritis, que incluye administrar el péptido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un mamífero incluyendo un ser humano en necesidad de ello.

15 Además, la presente invención proporciona un uso médico del péptido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferiblemente para el tratamiento y/o prevención de lesión del cartílago o artritis.

Los detalles mencionados en el péptido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o la composición de la presente invención se aplicarán al uso y al método de tratamiento y/o prevención según la presente invención siempre que no haya contradicción entre ellos.

20 **Efectos ventajosos**

25 El péptido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es eficaz para el tratamiento y/o prevención de lesión del cartílago o artritis, y puede mostrar efectos sobre la regeneración de tejido cartilaginoso, la inhibición de la expresión de enzima degradante de matriz de tejido cartilaginoso y/o la inhibición de osificación de tejido cartilaginoso.

Descripción de las figuras

30 La figura 1 ilustra una fotografía que muestra cambios en tejido cartilaginoso dañado, según una forma de realización de la presente invención.

La figura 2 ilustra los resultados de efectos de regeneración de tejido cartilaginoso observados con tinción de hematoxilina & eosina, según una forma de realización de la presente invención.

35 La figura 3 ilustra los resultados de efectos de regeneración de tejido cartilaginoso observados con tinción de colágeno, según una forma de realización de la presente invención.

40 La figura 4 ilustra los resultados de efectos de regeneración de tejido cartilaginoso observados con tinción de hematoxilina & eosina, según una forma de realización de la presente invención.

La figura 5 ilustra los resultados de cambios en la expresión génica de colágeno de tipo II en células de tejido cartilaginoso cultivadas, según una forma de realización de la presente invención.

45 La figura 6 ilustra los resultados de cambios en la expresión génica de MMP13 en células de tejido cartilaginoso cultivadas, según una forma de realización de la presente invención.

La figura 7 ilustra los resultados de cambios en la expresión génica de colágeno de tipo X en células de tejido cartilaginoso cultivadas, según una forma de realización de la presente invención.

50 La figura 8 ilustra una fotografía que muestra los resultados de los efectos de regeneración de cartílago confirmados por observación visual en un modelo de artritis degenerativa, según una forma de realización de la presente invención.

55 La figura 9 ilustra una fotografía que muestra los resultados de los efectos de regeneración de cartílago confirmados con tinción con hematoxilina & eosina en un modelo de artritis degenerativa, según una forma de realización de la presente invención.

60 La figura 10 ilustra una fotografía que muestra los resultados de los efectos de regeneración de cartílago confirmados con tinción con safranina O en un modelo de artritis degenerativa, según una forma de realización de la presente invención.

65 La figura 11 ilustra una fotografía que muestra los resultados de los efectos de regeneración de cartílago confirmados con tinción tricrómica de Masson en un modelo de artritis degenerativa, según una forma de realización de la presente invención.

Modo para la invención

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 que limitan el ámbito y espíritu de la presente invención.

5

Ejemplo 1: Preparación de péptido

Un péptido (Glu-Leu-His-Leu-Asp: SEQ ID NO: 1) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 fue preparado por Pepton Inc. (Corea de Sur), a petición de los presentes inventores. Específicamente, las unidades de aminoácidos se acoplaron una a una desde el extremo C, por Fmoc SPPS (síntesis de péptidos en fase sólida con 9-fluorenilmetiloxicarbonilo) usando un sintetizador de péptidos automatizado (ASP48S, Pepton Inc.).

10

Se usó resina NH₂-His(Trt)-2-cloro-tritilo en la que el primer aminoácido del extremo C del péptido se unió a una resina. Todos los aminoácidos usados en la síntesis de péptidos eran los protegidos por tritilo (Trt), t-butiloxicarbonilo (Boc), t-butilo (t-Bu), y similares, por lo cual el extremo N 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 el aminoácido protegido (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 (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)/H₂O = 90/2,5/2,5/2,5/2,5. El péptido se purificó por HPLC de fase inversa usando una columna Vydac Everest C18 (250 mm x 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 el peso molecular del péptido purificado usando un LC/MS (Agilent serie HP1100), seguido por liofilización.

15

20

25

Ejemplos 2 a 12: Preparación de péptidos

Se prepararon los péptidos de los ejemplos 2 a 12 de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que se usaron las secuencias dadas en la tabla 1 a continuación en lugar de la secuencia de aminoácidos del ejemplo 1.

30

Tabla 1

| Ejemplo No. | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO |
|-------------|--------------------------|-----------|
| Ejemplo 2 | Glu-Leu-His-Leu-Glu | 2 |
| Ejemplo 3 | Glu-Leu-Lys-Leu-Asp | 3 |
| Ejemplo 4 | Glu-Leu-Lys-Leu-Glu | 4 |
| Ejemplo 5 | Glu-Leu-Arg-Leu-Asp | 5 |
| Ejemplo 6 | Glu-Leu-Arg-Leu-Glu | 6 |
| Ejemplo 7 | Asp-Leu-His-Leu-Asp | 7 |
| Ejemplo 8 | Asp-Leu-His-Leu-Glu | 8 |
| Ejemplo 9 | Asp-Leu-Lys-Leu-Asp | 9 |
| Ejemplo 10 | Asp-Leu-Lys-Leu-Glu | 10 |
| Ejemplo 11 | Asp-Leu-Arg-Leu-Asp | 11 |
| Ejemplo 12 | Asp-Leu-Arg-Leu-Glu | 12 |

Ejemplo 13: Confirmación de los efectos de regeneración de cartilago usando explantes de tejido cartilaginoso dañado

35

Se prepararon explantes de condrocitos articulares de articulaciones de pezuña de vacas de menos de 3 años de edad una hora después de ser sacrificadas en un matadero regional (situado en Ojeong-dong, Daejeon, Corea del Sur). Para este fin, una porción de cartilago diferente de hueso se cortó uniformemente de la articulación y se cortó en un tamaño de aproximadamente 3 mm x 3 mm usando un bisturí para preparar explantes de tejido cartilaginoso. Usando una jeringuilla (21G) cuya punta se truncó y molió, se prepararon regiones dañadas haciendo agujeros verticales en la superficie uniformemente en el centro del explante.

40

Los explantes de tejido perforado se dividieron en 4 grupos incluyendo un grupo control. Los grupos individuales se colocaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco/F12 (DMEM/F12, 1:1, Welgene) suplementado con ascorbato (50 μg/ml, Sigma) y suero bovino fetal al 10% (SBF, Invitrogen), y después se trataron con 25 μM del péptido del ejemplo 1, 2 ng/ml de un factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β1, Promokine), y una mezcla de 25 μM del péptido del ejemplo 1 y 2 ng/ml de TGF β1, respectivamente. Los grupos individuales se dividieron de nuevo en dos subgrupos, seguido por incubación durante 1 o 6 semanas. Para el grupo incubado 6 semanas, la región dañada se examinó semanalmente con un microscopio, seguido por la toma de una fotografía. Además, el explante de tejido incubado 1 semana y el explante de tejido incubado 6 semanas se fijaron, respectivamente, en formaldehído al 3,7%/solución salina tamponada en fosfato (formaldehído al 3,7%/PBS). A continuación, según el

50

método experimental de histoquímica estándar, se prepararon portaobjetos con secciones en parafina, seguido por tinción con hematoxilina & eosina (H&E) y examen microscópico de la forma y distribución celular en términos de morfología. El colágeno se sometió a tinción tricrómica de Masson, y la forma y distribución de las células en el tejido se examinaron con un microscopio. Por comparación, el grupo control se trató de la misma manera que el grupo tratado con el péptido del ejemplo 1, excepto que el péptido del ejemplo 1 no se trató.

Los resultados se muestran en las figuras 1 a 4.

La figura 1 ilustra una micrografía de cambios a lo largo del tiempo en tejido cartilaginoso después del tratamiento de explantes de condrocitos articulares con ejemplo 1 o ejemplo 1 + TGF β 1.

Como se muestra en la figura 1, cuando se trató solo con ejemplo 1, la región dañada disminuyó gradualmente después de 2 semanas, las células empezaron a adherirse alrededor de la región dañada después de 4 semanas, y la región dañada estaba marcadamente reducida después de 6 semanas, demostrando de esta manera que el péptido del ejemplo 1 muestra la regeneración de la región dañada (figura 1F a J). Además, cuando el péptido del ejemplo 1 se trató en combinación con TGF β 1, las células empezaron a proliferar alrededor del agujero después de 3 semanas, y la región dañada estaba completamente llena con las células después de 6 semanas (figuras 1P a T). Comparado con el tratamiento con el péptido del ejemplo 1 solo, el tratamiento combinado de TGF β 1 con el péptido del ejemplo 1 produjo regeneración de la región dañada una semana antes, y las células que previamente aparecían solo alrededor del agujero en la semana 3 habían llenado por completo la región dañada en la semana 4.

La figura 2 ilustra los resultados de los efectos de la regeneración de tejido observados con tinción de hematoxilina & eosina después una semana de cultivo de explantes de tejido cartilaginoso tratados con ejemplo 1 o ejemplo 1 + TGF β 1, y la figura 3 ilustra los resultados de la tinción de colágeno. La figura 4 ilustra los resultados de los efectos de regeneración de tejido observados con tinción con hematoxilina & eosina después de 6 semanas de cultivo de explantes de tejido cartilaginoso tratados con ejemplo 1 o ejemplo 1 + TGF β 1. La flecha en la figura 2 y la figura 3 representa la capa superficial del explante de tejido cartilaginoso. Las figuras 4C y 4F son cada una, vistas parcialmente aumentadas de las partes cuadradas de las figuras 4B y 4E, en donde la flecha representa la capa superficial del explante de tejido cartilaginoso.

Como se muestra en la figura 2 y la figura 3, el tratamiento combinado del péptido del ejemplo 1 y TGF β 1 produjo un aumento de más de 2 veces en el espesor de la capa superficial del explante del tejido de cartílago, comparado con el grupo control (figura 2D y figura 3D), y la tinción de colágeno era más intensa, demostrando de esta manera que el péptido del ejemplo 1 produce un aumento en la síntesis de colágeno (figura 3D).

Además, como se muestra en la figura 4, cuando el péptido del ejemplo 1 se trató durante 6 semanas, la región dañada se estrechó, y las nuevas células se adhirieron alrededor de la región dañada (figuras 4B y 4C). Cuando el péptido del ejemplo 1 se trató en combinación con TGF β 1, se puede ver que el tejido cartilaginoso incluyendo la capa superficial (como se indica por la flecha en la figura 4F) se regeneró a la forma original y la región dañada del explante de tejido cartilaginoso se llenó por completo con el tejido cartilaginoso regenerado (figuras 4E y 4F). Por otra parte, el grupo control y el grupo tratado con TGF β 1 solo no mostraron sustancialmente cambio en la región dañada de los explantes (figuras 4A y 4D).

A partir de estos resultados, se puede ver que el péptido del ejemplo 1 es capaz de proporcionar la regeneración de cartílago dañado fomentando la unión y proliferación de condrocitos a/en la región dañada al tiempo que aumenta la síntesis de colágeno que es un componente principal de matriz, y también se puede ver que TGF β 1 acelera adicionalmente la velocidad de regeneración del cartílago dañado. Además, parece que los péptidos de los ejemplos 2 a 12, que son variantes que tienen una secuencia de aminoácidos similar a la del péptido del ejemplo 1, mostrarán efectos similares.

Ejemplo 14: Confirmación de los efectos de regeneración de cartílago usando precipitado de condrocitos articulares

Efectos del péptido del ejemplo 1 sobre la expresión de genes

Para asegurar que las propiedades celulares de los condrocitos articulares se mantienen similarmente a las del tejido biológico, las células se precipitaron y cultivaron.

Se preparó tejido cartilaginoso de articulaciones de pezuña de vacas de menos de 3 años de edad una hora después de ser sacrificadas en un matadero regional (situado en Ojeong-dong, Daejeon, Corea del Sur). Para este fin, una porción de cartílago diferente del hueso se cortó usando un bisturí y se recogió para uso. El tejido cartilaginoso se cortó en un hexaedro de aproximadamente 1 mm de longitud en cada lado y se colocó en DMEM/F12 (Wegene) suplementado con Pronasa (1 mg/ml, Roche), seguido por reacción en un incubador con CO₂ al 5% a 37°C durante 1,5 horas. El tejido tratado con pronasa se lavó dos veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato) y después una vez con DMEM/F12. El tejido cartilaginoso lavado se colocó en DMEM/F12 suplementado con SBF (suero bovino fetal) al 5% (Invitrogen), colagenasa P (0,25 mg/ml, Roche), y DNasa I (20

- µg/ml, Sigma) y se dejó reaccionar en un incubado con CO₂ al 5% a 37°C durante 8 a 12 horas, de modo que el tejido se degradó por completo. Después de completarse la degradación, las células se recogieron por centrifugación a 500xg durante 15 minutos y se lavaron dos veces con PBS. Las células se resuspendieron a una densidad celular de 2x10⁵ células/ml en DMEM/F12 suplementado con SBF al 10% y ascorbato (50 µg/ml, Sigma), y se dispensaron 1 ml/tubo de las células en tubos cónicos de 15 ml. Las células se precipitaron por centrifugación a 500 xg durante 10 minutos y se cultivaron en un incubador con CO₂ al 5% a 37°C durante 2 días, preparando de esta manera un precipitado celular que es sólido. El precipitado se transfirió a una placa de 24 pocillos y se cultivó durante 5 días. Después de ello, el precipitado se trató con dimetilsulfóxido (DMSO), 2 ng/ml de factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β1, Promokine), una mezcla de 25 µM del péptido del ejemplo 1 y 2 ng/ml de TGF β1, y 25 µM del péptido del ejemplo 1, respectivamente, seguido por cultivo durante otros 5 días. El día 13, las células se cultivaron en medio sin suero durante 24 horas. El día 14, las células se cultivaron durante 24 horas en medio sin suero suplementado con 2 ng/ml de TGF β1, una mezcla de 25 µM del péptido del ejemplo 1 y 2 ng/ml de TGF β1, o 25 µM del péptido del ejemplo 1, respectivamente.
- Se aisló ARN del precipitado cultivado usando TRIZOL (Invitrogen) y se cuantificó por absorbancia a 260 nm. Se sintetizó ADNc a partir de 2,25 µg de ARN, usando un hexámero aleatorio y premezcla maestra de transcriptasa inversa 5x (Elpis Biotech, Corea del Sur). Usando 1 µl de ADNc sintetizado, se llevó a cabo amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para investigar los niveles de expresión de genes. Los genes que se van a investigar son como sigue: un gen para el colágeno de tipo II característico de condrocitos (COL2A1) como un gen para confirmar la regeneración del tejido cartilaginoso articular; un gen para metalopeptidasa de matriz 13 (MMP13) que se sobreexpresa en tejido cartilaginoso dañado y está implicada en la degradación de la matriz, como un gen para confirmar si es capaz o no de prevenir lesión de cartilago adicional; y un gen para colágeno de tipo X (COL10A1) característico para condrocitos hipertróficos implicados en la osificación de tejido articular, como un gen para confirmar si está o no sobreactivado y evoluciona a osificación.
- Las secuencias de los cebadores de PCR usados para la amplificación de los genes individuales y el tamaño de los productos de PCR son como sigue.
- Colágeno de tipo II (tamaño del producto: 381 pb)
 Cebador directo: 5' -CAGGACCAAAGGGACAGAAA -3' (SEQ ID NO: 13)
 Cebador inverso: 5' -GGTTGCCTTGAAATCCTTGA -3' (SEQ ID NO: 14)
- MMP13 (tamaño de producto: 600 pb)
 Cebador directo: 5' -ATGGACCCTCTGGTCTGTTG -3' (SEQ ID NO: 15)
 Cebador inverso: 5' -CGTGT TTTGGAAATCCCA GT-3' (SEQ ID NO: 16)
- Colágeno de tipo X (tamaño del producto: 454 pb)
 Cebador directo: 5' -CAGTCAAGGGCCTTAATGGA -3' (SEQ ID NO: 17)
 Cebador inverso: 5' -CCTGAAGCCTGATCCAGGTA -3' (SEQ ID NO: 18)
- Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (tamaño del producto: 345 pb)
 Cebador directo: 5' -ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3' (SEQ ID NO: 19)
 Cebador inverso: 5' -CCCAGCATCGAAGGTAGAAG-3' (SEQ ID NO: 20)
- Específicamente, se llevó a cabo PCR en las siguientes condiciones de reacción. La reacción de PCR empleó 1 µl de ADNc, 10 µl de mezcla maestra de Taq polimerasa 2x (Solgent), 0,5 µl de cada conjunto de cebadores (10 pmol/µl), y 8 µl de agua destilada. La amplificación por PCR consistió en desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, seguido por reacción a 94°C durante 30 segundos, a 58°C durante 45 segundos y a 72°C durante 1 minuto, con 32 ciclos para colágeno de tipo II, colágeno de tipo X y MMP13, y 26 ciclos para GAPDH, respectivamente. Los productos de amplificación por PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio (EtBr, 2 µg/ml) durante 15 minutos, seguido por confirmación con luz UV. Usando un programa de procesamiento de imágenes, Image J (NIH), los niveles de expresión de genes individuales se normalizaron al nivel de expresión de GAPDH, y después los niveles de expresión relativos se compraron entre ellos.
- Los resultados se muestran en la figura 5 a la figura 7. La figura 5 ilustra los resultados que muestran cambios en la expresión de colágeno de tipo II (COL2A1) tras tratamiento de células condrocitos articulares con el péptido del ejemplo 1. La figura 6 ilustra los resultados que muestran cambios en la expresión de MMP13. La figura 7 ilustra los resultados que muestran cambios en la expresión de colágeno de tipo X (COL10A1). En cada una de figura 5 a figura 7, la columna superior es una fotografía electroforética de los productos de amplificación de PCR en un gel de agarosa al 1%, y la columna inferior es un gráfico cuantitativo de bandas electroforéticas usando un programa de procesamiento de imágenes Image J (NIH). En el gráfico, el eje y representa el valor en % de la intensidad relativa de la banda de las muestras de ejemplo comparado al grupo control, cuando la intensidad de la banda del grupo control se toma que es el 100%.
- Como se muestra en la figura 5 a la figura 7, el péptido del ejemplo 1 produjo un aumento del 55% en la expresión de colágeno de tipo II que está relacionada con la regeneración del tejido cartilaginoso, comparado con el grupo

control. El tratamiento combinado del péptido del ejemplo 1 con TGF β 1 produjo un aumento del 27% en la expresión de colágeno de tipo II, comparado con el grupo tratado solo con TGF β 1 (figura 5). Además, el péptido del ejemplo 1 produjo una disminución del 10% en la expresión de metalopeptidasa de matriz 13 (MMP13) que está implicada en la degradación de la matriz del tejido cartilaginoso, comparado con el grupo control. El tratamiento combinado del péptido del ejemplo 1 con TGF β 1 produjo una disminución del 150% en la expresión de MMP13, comparado con el grupo tratado con TGF β 1 (figura 6). El péptido del ejemplo 1 produjo una disminución del 69% en la expresión de colágeno de tipo X (COL10A1) característico para condrocitos hipertróficos implicado en la osificación del tejido articular debido a la hiperactivación del mismo, comparado con el grupo control. El tratamiento combinado del péptido del ejemplo 1 con TGF β 1 produjo una disminución del 78% en la expresión de COL10A1, comparado con el grupo tratado con TGF β 1 (figura 7).

A partir de estos resultados, se demostró que el péptido del ejemplo 1 activa condrocitos de tejido articular para fomentar la síntesis de proteínas de matriz principales que constituyen el cartílago, e inhibe la expresión de una enzima degradante de matriz principal, fomentando eficazmente de esta manera la regeneración del tejido cartilaginoso articular dañado. Además, a pesar del hecho de que el péptido del ejemplo 1 fomenta la activación de condrocitos, el péptido del ejemplo 1 inhibe la diferenciación a condrocitos hipertróficos que puede evolucionar a osificación de tejido articular (formación de osteofito) y por tanto tiene un efecto de facilitar la regeneración del tejido dañado a tejido normal.

Efectos de los péptidos de los ejemplos 2 a 12 sobre la expresión de genes

Se evaluaron los efectos de péptidos de la misma manera que en la sección "Efectos del péptido del ejemplo 1 sobre la expresión de genes", excepto que los péptidos de los ejemplos 2 a 12 se usaron, respectivamente, en lugar del péptido del ejemplo 1. La tabla 2 a continuación muestra los resultados experimentales para los efectos de los péptidos de los ejemplos 1 a 12 sobre la expresión de colágeno de tipo II en células condrocitos de cartílago.

Tabla 2

| Muestra | Expresión relativa de colágeno de tipo II (%) (Media \pm DE) |
|------------|--|
| Ninguno | 100 \pm 10 |
| Ejemplo 1 | 155 \pm 12 |
| Ejemplo 2 | 163 \pm 19 |
| Ejemplo 3 | 161 \pm 29 |
| Ejemplo 4 | 124 \pm 12 |
| Ejemplo 5 | 149 \pm 27 |
| Ejemplo 6 | 158 \pm 38 |
| Ejemplo 7 | 190 \pm 38 |
| Ejemplo 8 | 115 \pm 42 |
| Ejemplo 9 | 147 \pm 41 |
| Ejemplo 10 | 166 \pm 26 |
| Ejemplo 11 | 157 \pm 34 |
| Ejemplo 12 | 159 \pm 28 |

La tabla 2 muestra los resultados de comparación de cambios en la expresión de colágeno de tipo II en células cultivadas de tejido cartilaginoso, entre los péptidos de los ejemplos 2 a 12 que son variantes que tienen una secuencia de aminoácidos similar a la del péptido del ejemplo 1. Por referencia, los resultados también se proporcionan para sin tratamiento. Los valores numéricos en la tabla 2 se dan como media desviación estándar y el número de muestras es 3 para cada grupo. Los datos se calcularon usando un programa estadístico PAWS Statistic (ver. 17.0, SPSS Inc.). Se dio la media \pm desviación estándar a un nivel de $p < 0,05$ usando análisis unívoco de varianza, y la significación entre valores medios de grupos experimentales se probó por la diferencia menos significativa (LSD). Similar al ejemplo 1, los ejemplos 2 a 12 también mostraron un aumento significativo en la expresión de colágeno de tipo II, comparado con el grupo no tratado. Como consecuencia, se demostró que los péptidos de los ejemplos 2 a 12, que son variantes de la secuencia de aminoácidos del ejemplo 1, también muestran efectos similares al del péptido del ejemplo 1 sobre la expresión de colágeno de tipo II que es un componente principal de la matriz extracelular (MEC) de cartílago (tabla 2). Según esto, se puede ver que todos los péptidos de los ejemplos 1 a 12 muestran efectos de regeneración de cartílago.

Ejemplo 15: Efectos de regeneración de cartílago de compuestos peptídicos en modelo de artritis degenerativa

Como animales experimentales, se compraron conejos blancos New Zealand machos de 18 a 22 semanas de edad ($n=10$), que pesaban de 3 a 3,5 kg, de Orient Bio Inc. (Corea del Sur). Los experimentos con animales se realizaron según las directrices del Instituto de Recursos de Animales de Laboratorio (ILAR) con la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Investigación Biomédica Samsung (SBRI, Seúl, Corea del Sur). La degeneración del cartílago articular se indujo disecando quirúrgicamente el ligamento cruzado anterior

rotuliano de conejos y criando los animales en una jaula durante 4 semanas. Los animales se dividieron en un grupo control y un grupo experimental.

Los conejos se pusieron bajo anestesia general inyectando por vía intramuscular 2,5 mg/kg de xilazina (Rompun, Bayer) y 8 mg/kg de tiletamina/zolazepam (Zoletil, Virbac). A continuación, las articulaciones rotulianas de las patas posteriores derechas se afeitaron y desinfectaron. Se cortaron las pieles y cápsulas de las articulaciones rotulianas y se mostraron las rótulas para exponer los ligamentos cruzados anteriores. Después de ello, el ligamento se cortó usando una cuchilla de afeitar (No. 11) y la cápsula de la articulación y la piel se suturaron. Después de completarse la operación quirúrgica, los conejos se criaron en una jaula durante 4 semanas al tiempo que se permitía movimiento rutinario. Los animales se enjaularon en las siguientes condiciones: temperatura de 20 a 25°C, humedad del 10% al 50%, y ciclo de luz/oscuridad (L/O): (luz de 08:00 a.m. a 22:00 p.m.). Todos los animales se alimentaron una vez al día. En la semana 4 después de la operación quirúrgica, los conejos se dividieron en dos grupos, seguido por inyección en la cavidad intraarticular. Al grupo control se le dio una inyección de un vehículo (lactosa al 5%/solución salina fisiológica). Para el grupo experimental, se inyectaron 200 µl de solución de péptido 52,5 µM al grupo al que se administró 30 µM del péptido del ejemplo 1, y se inyectaron 200 µl de solución de péptido 157,5 µM en el grupo al que se administró 90 µM del péptido del ejemplo 1. El péptido anteriormente mencionado se preparó en un solvente de lactosa al 5%/solución salina fisiológica antes del uso. Se dio una inyección una vez a la semana durante 4 semanas. 1 y 5 semanas después de la inyección final (semana 8 y 12 después de la primera operación), los animales experimentales se sacrificaron por inyección vascular de 1 a 2 mM/kg de KCl con anestesia profunda.

La porción proximal (región femoral) del hueso articular rotuliano se cortó. Para la comparación con tejido normal, la región articular normal izquierda también se cortó adicionalmente, seguido por examen a simple vista y fotografía. Las regiones articulares cortadas se fijaron en formalina al 10%, se descalcificaron usando una solución descalcificadora (CalciClear Rapid, National Diagnostics), y después se hicieron en bloques de parafina. El plano frontal del hueso articular se cortó a un espesor de 4 µm, preparando de esta manera una sección. Para examinar la estructura y distribución de las células, se llevó a cabo tinción con hematoxilina & eosina (H&E). Para examinar la distribución del proteoglicano en la matriz, se llevó a cabo tinción con safranina O. Para examinar la distribución de colágeno, se llevó a cabo tinción tricrómica de Masson. La tinción con H&E se llevó a cabo usando hematoxilina de Harris (Melrose J. *et al.*, Spine (2002) 1756-1764) después de que la sección se deshidratara consecutivamente con xileno, y etanol al 100%, 90%, 70% durante 10 minutos cada vez. La tinción con safranina O se llevó a cabo por deshidratación de la sección de la misma manera que en la tinción con H&E, tinción de la sección en verde rápido al 0,02% durante 3 minutos, ácido acético al 1% durante 30 segundos y safranina O al 0,1% durante 5 minutos, y 10 veces consecutivas de inmersión y deshidratación de la sección en etanol al 70%, 90%, 100% y xileno. La tinción tricrómica de Masson se llevó a cabo usando tricromo (Melrose J. *et al.*, Eur. Spine J. (2007) 2193-2205). Las secciones se prepararon según un grupo normal, un grupo control (grupos administrado con lactosa), y un grupo experimental (grupo al que se le administró el péptido del ejemplo 1) y se examinaron con un microscopio.

Los resultados observados a simple vista se muestran en la figura 8. Como se muestra en la figura 8, el tejido cartilaginoso articular del grupo normal era liso y brillante, mientras que el grupo control (grupo administrado con lactosa) de un modelo de artrosis degenerativa mostró una porción en la que el tejido cartilaginoso estaba dañado y eliminado, y tenía un brillo disminuido. Por otra parte, el tejido cartilaginoso articular del grupo experimental (grupo al que se le administró el péptido del ejemplo 1; 30 µM, 90 µM) mostró una superficie lisa y brillo cercano al estado normal, que resulta de la regeneración del tejido cartilaginoso dañado.

Los resultados de la tinción con H&E se muestran en la figura 9. Como se muestra en la figura 9, solo el grupo control (grupo administrado con lactosa) mostró fibrocondrocitos (tinción intensa) en la capa superficial del tejido cartilaginoso, mientras que el grupo experimental (grupo al que se administró el péptido del ejemplo 1) mostró un patrón de tinción similar al del grupo normal y mostró un tamaño celular aumentado debido a la activación de las células. Por tanto, se puede ver que el péptido del ejemplo 1 activa los condrocitos articulares en el grupo experimental.

Los resultados de la tinción (safranina O) de proteoglicano en la matriz del cartílago se muestran en la figura 10. Como se muestra en la figura 10, el grupo control (grupo administrado con lactosa) mostró síntesis marcadamente disminuida de proteoglicano en la capa media y la capa profunda, comparado con el grupo normal. Por otra parte, el grupo experimental (grupo al que se le administró el péptido del ejemplo 1) mostró síntesis aumentada de proteoglicano de una manera dependiente de la dosis. Por tanto, se demostró que, con respecto al grupo experimental, el péptido del ejemplo 1 aumenta la síntesis de proteoglicano, un componente principal de la matriz del tejido cartilaginoso articular, fomentando de esta manera la regeneración del tejido cartilaginoso dañado.

Los resultados de la tinción de colágeno (trícromo de Masson) se muestran en la figura 11. Como se muestra en la figura 11, el grupo normal y el grupo experimental (grupo al que se le administró el péptido del ejemplo 1) mostraron patrones de tinción similares, mientras que la región dañada del grupo control (grupo administrado con lactosa) mostró tinción intensa que refleja síntesis aumentada de fibrocolágeno en la región dañada. Según esto, se demostró que el péptido del ejemplo 1 fomenta la regeneración de tejido cartilaginoso que tiene una superficie normal (cartílago hialino, principalmente colágeno de tipo II), mientras que el grupo control (grupo administrado con

lactosa) mostró síntesis aumentada de fibrocartilago (principalmente colágeno de tipo I) que es susceptible a lesión debido al debilitamiento de las propiedades físicas como resultado del proceso adaptativo a cambios degenerativos.

5 La síntesis aumentada de fibrocolágeno observada de los resultados de la tinción de colágeno del grupo control (grupo administrado con lactosa) corresponde a los resultados de un aumento en fibrocondrocitos en la capa superficial, que se observó en la región dañada del grupo control tras llevar a cabo la tinción con H&E, demostrando de esta manera que la regeneración a tejido normal no se induce en el proceso adaptativo a cambios degenerativos, pero el péptido del ejemplo 1 induce la regeneración de tejido normal en el grupo experimental.

10 Como resultado, se demostró que el péptido del ejemplo 1 fomenta la activación de condrocitos y la síntesis de componentes de matriz de cartilago (proteoglucano, colágeno de tipo II) en experimentos que usan un modelo de artrosis degenerativa y por tanto tiene excelentes efectos de regenerar tejido cartilaginoso dañado similar a tejido normal.

15 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención proporciona un péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, una composición que contiene el mismo péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como principio activo, y una composición que contiene el mismo péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y TGF β 1, para el tratamiento y/o prevención de al menos uno seleccionado de lesión del cartilago y artritis. El péptido anteriormente mencionado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es eficaz para el tratamiento y/o prevención de lesión del cartilago y/o artritis y es capaz de mostrar efectos sobre la regeneración de tejido cartilaginoso, la inhibición de la expresión de enzima degradante de matriz de tejido cartilaginoso y/o la inhibición de osificación de tejido cartilaginoso, y por tanto son industrialmente aplicables.

25 **Lista de secuencias**

<110> Ensoltek Co., Ltd.

30 <120> Péptido novedoso y uso del mismo

<130> AOP11002-PCT

<150> KR10-2010-0062467

35 <151> 30-06-2010

<160> 20

<170> KopatentIn 1.71

40

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> péptido

<400> 1

Glu Leu His Leu Asp

50

1

5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

55

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

60

<400> 2

Glu Leu His Leu Glu

1

5

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> péptido
 <400> 3
Glu Leu Lys Leu Asp
 10 1 5
 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido
 20 <400> 4
Glu Leu Lys Leu Glu
 1 5
 <210> 5
 <211> 5
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido
 30 <400> 5
Glu Leu Arg Leu Asp
 1 5
 35 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> péptido
 <400> 6
Glu Leu Arg Leu Glu
 45 1 5
 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido
 55 <400> 7
Asp Leu His Leu Asp
 1 5
 <210> 8
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> péptido

 <400> 8
 Asp Leu His Leu Glu
 1 5

 10 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> péptido

 <400> 9
 Asp Leu Lys Leu Asp
 1 5

 20 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> péptido

 <400> 10
 Asp Leu Lys Leu Glu
 1 5

 30 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> péptido

 <400> 11
 Asp Leu Arg Leu Asp
 1 5

 <210> 12
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido

 50 <400> 12
 Asp Leu Arg Leu Glu
 1 5

 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>

ES 2 606 778 T3

| | | |
|----|--|----|
| | <223> cebador directo para colágeno de tipo II | |
| | <400> 13 | |
| 5 | caggaccaaa gggacagaaa | 20 |
| | <210> 14 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 10 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador inverso para colágeno de tipo II | |
| | <400> 14 | |
| 15 | ggttgccttg aaatccttga | 20 |
| | <210> 15 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 20 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador directo para MMP13 | |
| 25 | <400> 15 | |
| | atggaccctc tggctctgtg | 20 |
| | <210> 16 | |
| 30 | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 35 | <223> cebador inverso para MMP13 | |
| | <400> 16 | |
| | cgtgttttgg aaatcccagt | 20 |
| 40 | <210> 17 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> | |
| | <223> cebador directo para colágeno de tipo X | |
| | <400> 17 | |
| 50 | cagtcaaggg ccttaatgga | 20 |
| | <210> 18 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 55 | <220> | |
| | <223> cebador inverso para colágeno de tipo X | |
| | <400> 18 | |
| 60 | cctgaagcct gatccagta | 20 |
| | <210> 19 | |

ES 2 606 778 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> cebador directo para GAPDH

<400> 19
accagaaga ctgtggatgg 20

10 <210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> cebador inverso para GAPDH

<400> 20
20 **cccagcatcg aaggtagaag** 20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido representado por la fórmula (I):
- 5 X₁-Leu-X₂-Leu-X₃ (I)
- en donde X₁ representa Glu o Asp, X₂ representa His, Lys o Arg, X₃ representa Asp o Glu, con Glu, Asp, Leu, His, Lys y Arg que son respectivamente ácido glutámico, ácido aspártico, leucina, histidina, lisina y arginina; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 2. El péptido según la reivindicación 1, en donde X₁ representa Glu, X₂ representa His, y X₃ representa Asp.
3. Una composición para uso en el tratamiento o prevención de al menos uno seleccionado de lesión del cartílago y artritis, que comprende el péptido de la reivindicación 1 o 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como un principio activo.
- 15 4. La composición para uso según la reivindicación 3, en donde el tratamiento o prevención es por al menos uno seleccionado de la regeneración del tejido cartilaginoso, la inhibición de la expresión de enzima degradante de matriz de tejido cartilaginoso y la inhibición de osificación de tejido cartilaginoso.
- 20 5. La composición para uso según la reivindicación 3, en donde la artritis es una enfermedad de la articulación que está acompañada por degeneración de cartílago y hueso subcondral.
6. La composición para uso según la reivindicación 3, en donde la composición es una composición farmacéutica.
- 25 7. Una composición que comprende el péptido de la reivindicación 1 o 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β1).

Figura 1

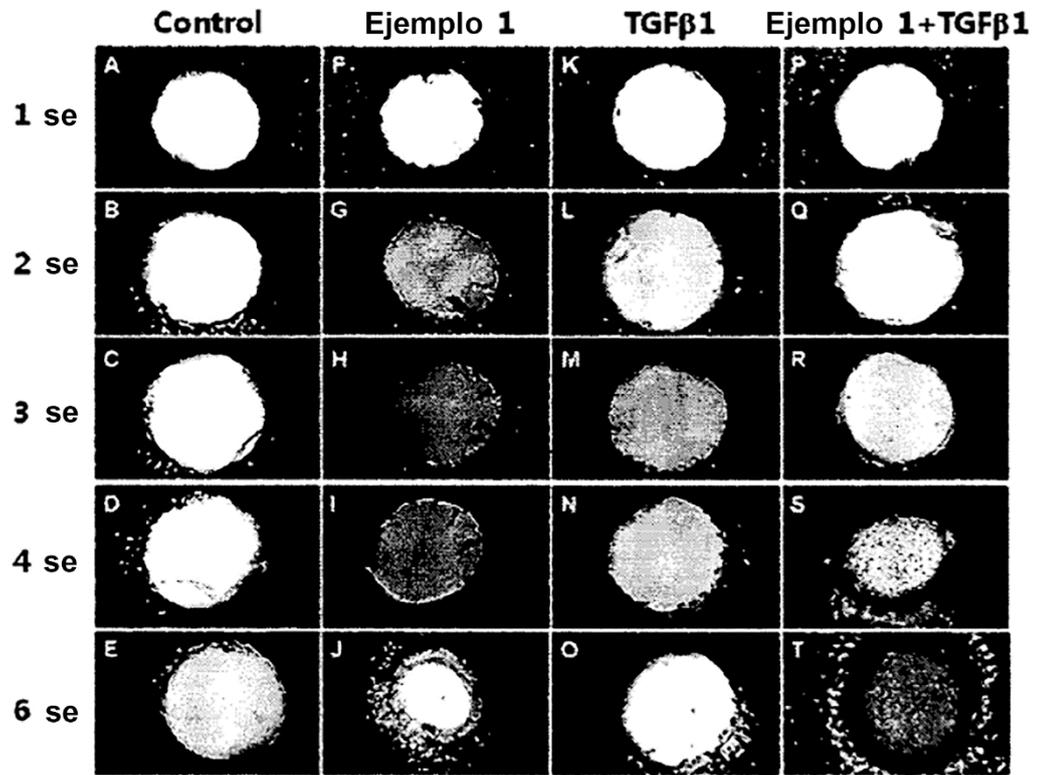


Figura 2

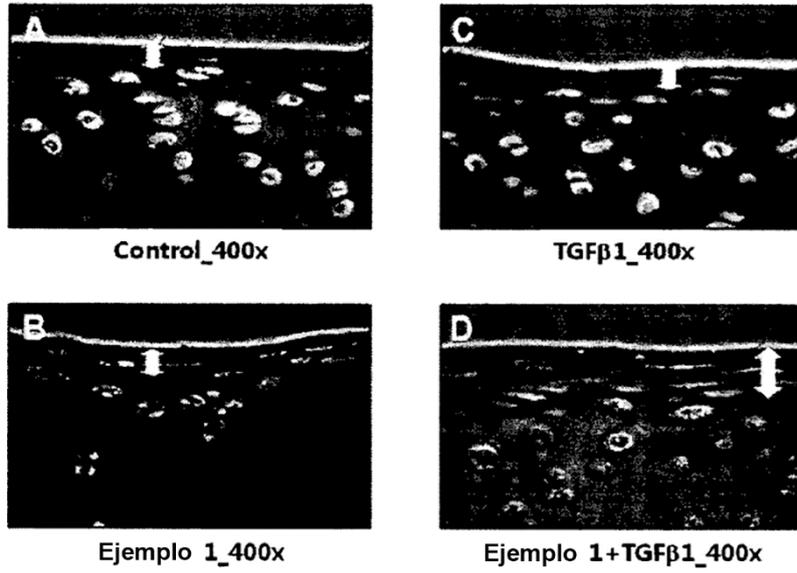


Figura 3

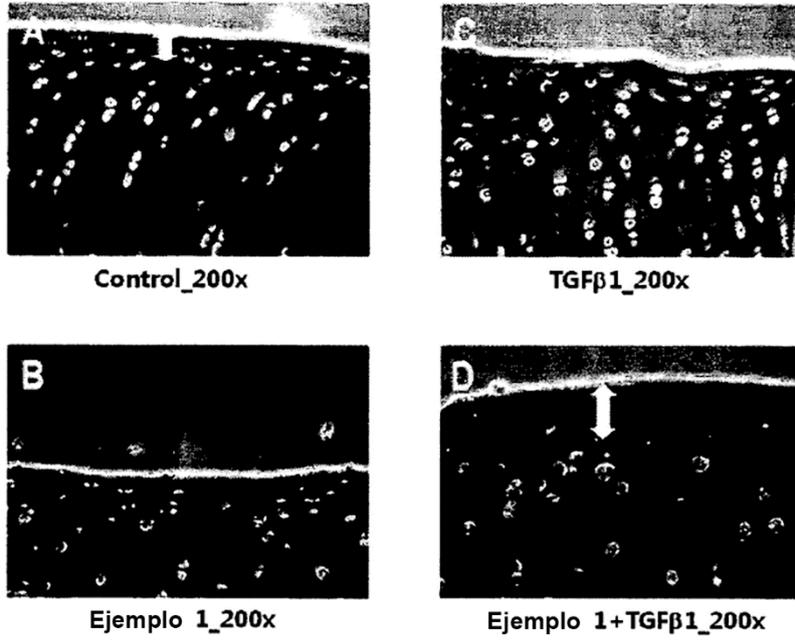


Figura 4

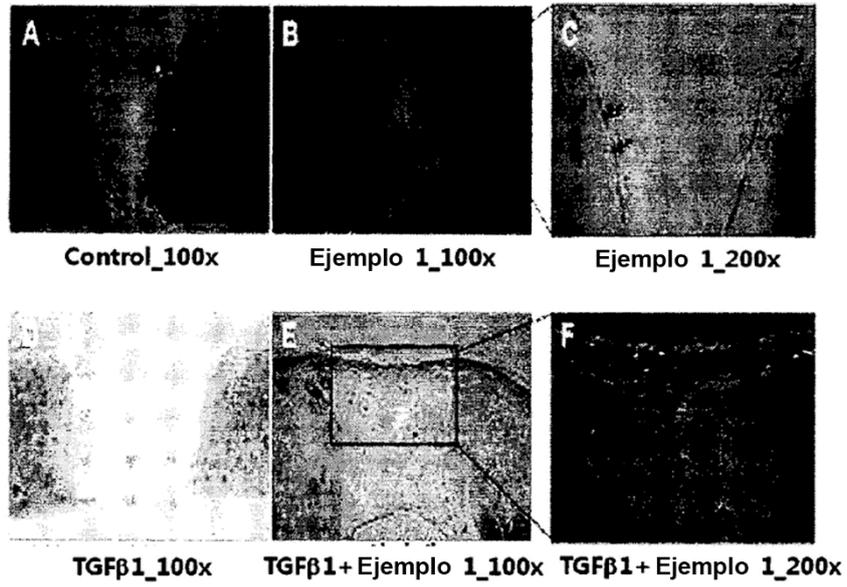


Figura 5

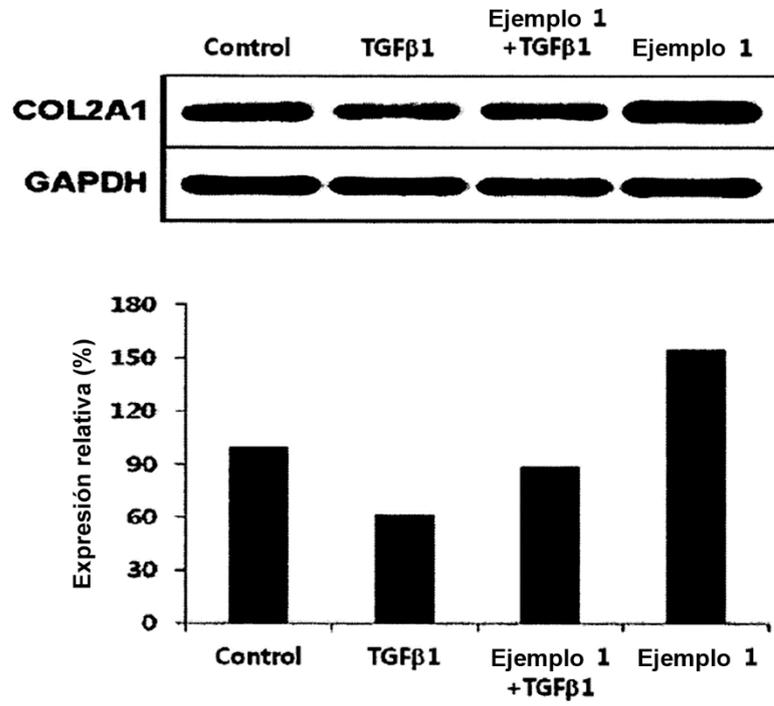


Figura 6

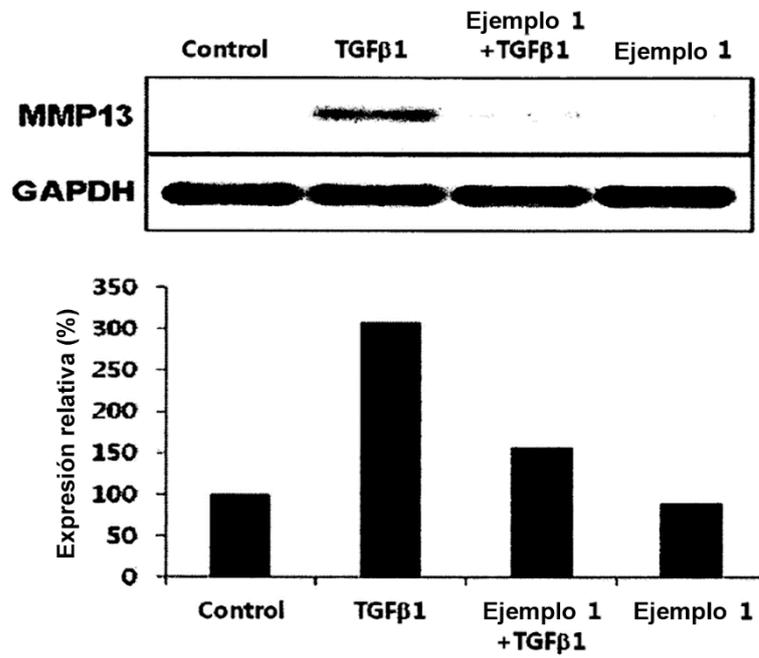


Figura 7

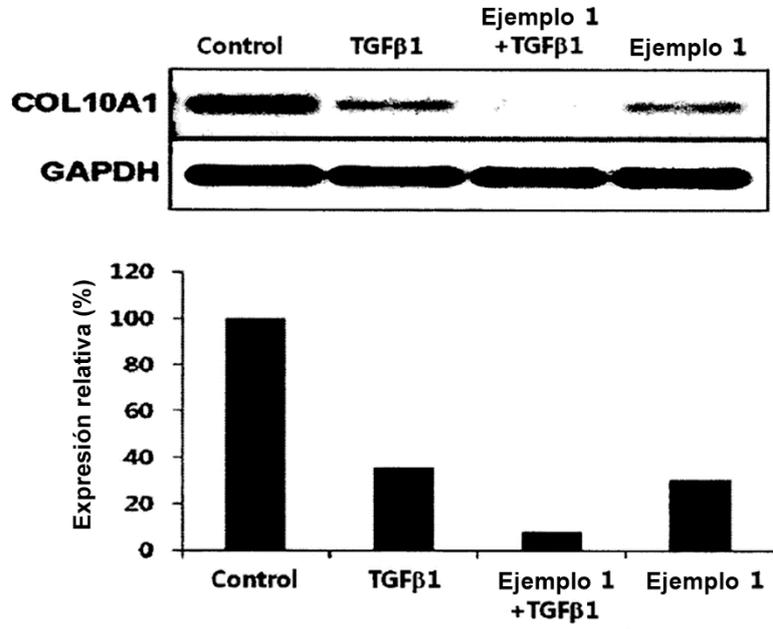


Figura 8

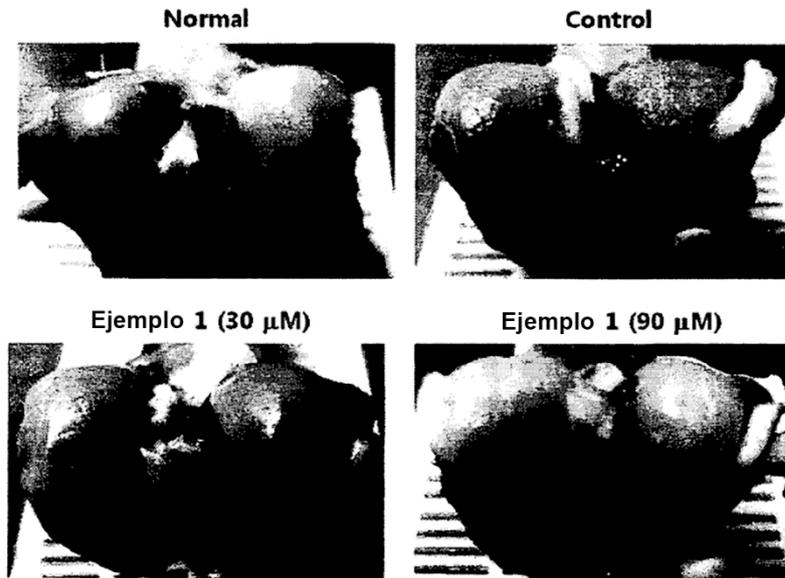


Figura 9

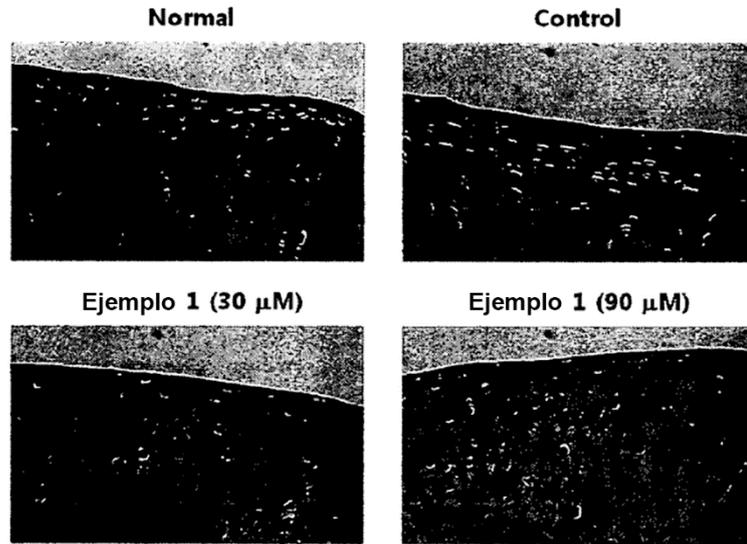


Figura 10

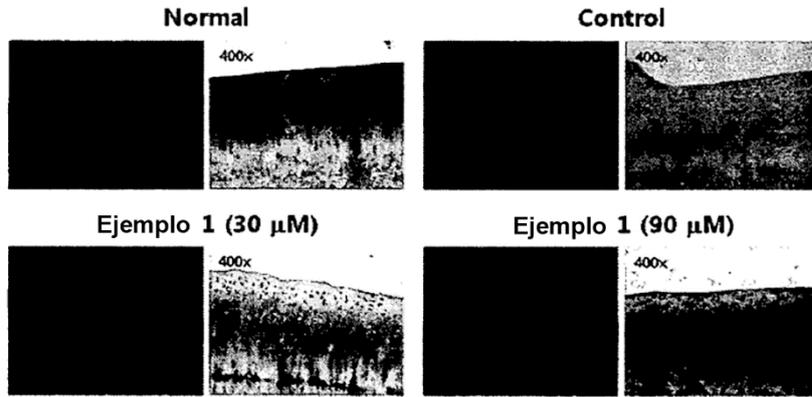


Figura 11

