

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 604**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/12 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2011 E 14182760 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2813516**

54 Título: **Péptido que tiene la capacidad de regenerar tejido óseo y de unirse a apatita**

30 Prioridad:

10.09.2010 KR 20100088707

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2017

73 Titular/es:

**NANO INTELLIGENT BIOMEDICAL ENGINEERING CORPORATION CO., LTD. (100.0%)
107 College of Dentistry Seoul National Univ. 28 Yongon-dong Chongno-gu Seoul 110-749, KR**

72 Inventor/es:

**CHUNG, CHONG-PYOUNG;
PARK, YOON-JEONG;
RHEE, SANG HOON y
LEE, JUE-YEON**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 643 604 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 que tiene la capacidad de regenerar tejido óseo y de unirse a apatita

ANTECEDENTES DE LA INVENCION**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un péptido que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo y se une de manera específica a una superficie del mineral apatita, y más particularmente, a un péptido que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo y se une de manera específica a una superficie del mineral apatita, capaz de ser establemente inmovilizado a la superficie del mineral apatita para mantener una actividad eficaz y mostrar efectos de regeneración ósea durante un largo tiempo, uniendo una secuencia de aminoácidos que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo y una secuencia de aminoácidos que tiene la capacidad de unirse a apatita entre sí para proporcionar de este modo un péptido que tenga efectos tanto de formación ósea como capacidad de unión a la superficie del mineral apatita, y una composición para regeneración de tejido óseo, que contiene el péptido.

Antecedentes de la técnica anterior

15 Los huesos y los dientes son denominados tejidos duros en el cuerpo. Los huesos están compuestos por aproximadamente el 45 % de materiales inorgánicos óseos, el 35 % de materiales orgánicos, y el 20 % de agua. En cuanto al diente, el esmalte tiene aproximadamente el 97 % de material inorgánico, la dentina tiene el 70 % de material inorgánico, y el cemento tiene el 50 % de material inorgánico. El contenido de material inorgánico es algo diferente dependiendo de las especies animales, partes del cuerpo, la edad, y similares.

20 De los materiales constituyentes, la mayoría de los materiales orgánicos son colágeno, el cual está implicado en la generación de huesos y que mantiene la dureza y elasticidad de los huesos, y está presente como una matriz que induce la adhesión selectiva de las células óseas para orientar de este modo a las partículas inorgánicas óseas. El mineral apatita es un componente principal del hueso en un estado natural, es decir, los materiales inorgánicos óseos de un vertebrado, y se ha conocido como hidroxapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), hidroxilapatita, apatita hidroxil carbonatada (CHAp, tipo A: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6[(\text{OH})_{2-2x}(\text{CO}_3)_x]$, tipo B: $\text{Ca}_{10-x}[(\text{PO}_4)_{6-2x}(\text{CO}_3)_{2x}](\text{OH})_2$). Se ha sabido que está contenida una cantidad diminuta de Mg^{2+} , Na^+ , o K^+ en lugar de Ca^{2+} , y está contenida una diminuta cantidad de Cl^- o F^- en lugar de OH^- . Por lo tanto, se han realizado estudios sobre que los materiales dentales y los materiales de injerto óseo para la cicatrización de defectos óseos están hechos de mineral apatita o las superficies de los mismos están recubiertos con mineral apatita.

30 El propósito del injerto óseo es restaurar las funciones morfológicas y fisiológicas del hueso para mantener de este modo las funciones biomecánicas. Por lo tanto, el material de injerto óseo de apatita utilizado aquí necesita satisfacer las condiciones fundamentales, tales como, utilizarse instantáneamente, no tener respuestas inmunes, promover la rápida generación ósea y la revascularización, mantener el soporte del hueso y la continuidad, y similares. Sin embargo, la propia apatita puede servir como un mediador que tiene conductividad ósea, pero no tiene capacidad de inducción ósea para la morfogénesis de carbono inicial, la cual se requiere para acortar la duración del tratamiento. Con el fin de compensar este fallo, se realizaron estudios sobre el uso de una sustancia biológicamente activa que tiene quimiotactina, tal como proteína de la matriz extracelular, factor de crecimiento tisular, o la proteína morfogenética ósea, junto con la apatita y, se desarrollaron productos tales como INFUSE (que contiene BMP-2), GEM21S (que contiene PDGF) y similares. Sin embargo, estas proteínas no se inmovilizan de forma estable sobre una superficie de la apatita y se liberan de la apatita, y posteriormente se exponen a la sangre sistémica y, por lo tanto, se degradan, y, por lo tanto, las actividades de estas proteínas son difíciles de mantener en la superficie de la apatita para el efecto de regeneración ósea. Por lo tanto, se requiere un material que se inmovilice de manera estable sobre la superficie de la apatita para conservar de este modo una actividad eficaz con el fin de aumentar el efecto de la regeneración ósea.

45 Los presentes inventores hicieron el esfuerzo de resolver los problemas de la técnica relacionada como se ha descrito anteriormente. Como resultado, los presentes inventores confirmaron que un péptido que tiene tanto capacidad de formación ósea como capacidad de unión al mineral apatita puede estar presente en estado estable cuando la unión a una superficie de mineral apatita, pueda promover transición, proliferación y diferenciación de células asociadas con la regeneración y eventualmente maximizar la capacidad de regeneración de tejido óseo, y mostrar altos efectos terapéuticos en la regeneración de tejido óseo, y posteriormente completaron la presente invención.

55 Segvich S. et al: "Identification of Peptides with Targeted Adhesion to Bone-Like Mineral via Phage Display and Computational Modeling", Cells Tissues Organs, vol. 189, n.º 1-4, 2009, páginas 245-251, describen la identificación de secuencias peptídicas con adsorción preferencial hacia materiales a base de apatita. Los péptidos que tienen la afinidad más alta y el mayor potencial para ser incorporados en un diseño de péptido de funcionamiento dual son APWHLSSQYSRT, VTKHLNQISQSY y STLPIPHFSRE.

El documento WO 2008/032929 describe un péptido fisiológicamente activo para promover la osteogénesis, y un material de injerto óseo para aplicaciones dentales y ortopédicas, que contiene el péptido. El material de injerto óseo

que contiene un péptido que tiene CEEEEEEEGG se añadió al extremo N de un péptido derivado de una proteína morfogenética ósea y/o una matriz extracelular.

- 5 Fujisawa R. et al.: "Attachment of osteoblastic cells to Hydroxyapatite crystals by a synthetic peptide (Glu7-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr) containing two functional sequences of bone sialoprotein", Matrix Biology, vol. 16, 1997, páginas 21-28, describen la actividad de la sialoproteína ósea (BSP) para mediar la unión de células a hidroxiapatita usando un péptido modelo, Glu7-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr, que contiene un sitio putativo de unión a hidroxiapatita (poly-Glu) y un sitio de unión celular.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 10 Un objeto de la presente invención es proporcionar un péptido que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo y se une a la apatita, siendo el péptido establemente inmovilizado a una superficie del mineral apatita y conservando la actividad del péptido.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un material de injerto óseo y un biomaterial para la regeneración ósea, en el que el péptido se inmoviliza a una superficie de la apatita.

- 15 Con el fin de lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona un péptido que tiene la capacidad de regeneración de tejido óseo y se une a la apatita, en la que un péptido se representa por la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 40.

La presente invención también proporciona un material de injerto óseo y un biomaterial para la regeneración ósea, en la que el péptido es inmovilizado a una superficie de la apatita.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 20 La FIG. 1 muestra imágenes obtenidas cuando un tejido tomado 4 semanas después de injertar mineral óseo marcado con FITC en el defecto craneal de conejo se observó mediante un microscopio confocal (FIG. 1A para mineral óseo sin un péptido de unión, y FIG. 1B para mineral óseo con un péptido de unión de SEQ ID NO: 40, marcado con FITC).

- 25 La FIG. 2 muestra los resultados obtenidos cuando la sangre se toma antes y 1 día, 3 días, 7 días, 14 días, 21 días, y 28 días después de injertar el mineral óseo marcado con FITC en el defecto craneal del conejo y después los péptidos liberados en la sangre se midieron utilizando un fluorómetro (RFI: índice de fluorescencia relativa, línea azul: control negativo de plasma, que muestra los valores de medición utilizando plasma sin un material fluorescente).

- 30 La FIG. 3 muestra imágenes obtenidas observando el grado de regeneración ósea 2 semanas después de injertar mineral óseo con un péptido de unión en el defecto craneal de conejo (FIG. 3A para un material de injerto óseo con un péptido de unión de SEQ ID NO: 36, FIG. 3B para un material de injerto óseo con un péptido de unión de SEQ ID NO: 35, y FIG. 3C para un material de injerto óseo con un péptido de unión de SEQ ID NO: 40).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

- 35 A menos de que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que los entendidos en general por los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención. Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento es bien conocida y comúnmente empleada en la técnica.

Con el fin de desarrollar el péptido de acuerdo a la presente invención, las secuencias de aminoácidos se extraen de sitios activos de proteína morfogenética ósea y proteína matriz extracelular, y posteriormente se someten a modificación química, para mantener de este modo una estructura activa.

- 40 Se describe además un péptido que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo y que se une a apatita, en el que al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 35 y al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 a SEQ ID NO: 39 se alinean entre sí.

- 45 El péptido que se une al mineral apatita se puede seleccionar del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 (STLPIPHEFSRE), SEQ ID NO: 37 (VTKHLNQISQSY), SEQ ID NO: 38 (SVSVGMPKSPRP), y SEQ ID NO: 39 (NRVFEVLRVDF). El péptido se añade químicamente al extremo N del péptido que tiene capacidad de generación de tejido óseo, para aumentar la capacidad de unión a la apatita, que es un constituyente del hueso, y de este modo se une de manera estable a un material de injerto óseo o un implante cubierto con apatita.

- 50 El péptido que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo puede seleccionarse del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 35.

Específicamente, el péptido que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo puede ser al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 a) secuencias de aminoácidos en las posiciones 2-18 de cada una de las proteínas morfogénicas óseas (BMP)-2, 4 y 6 [SEQ ID NO: 1 para BMP-2, SEQ ID NO: 2 para BMP-4, y SEQ ID NO: 3 para BMP-6]; secuencia de aminoácidos en las posiciones 16-34 (SEQ ID NO: 4), secuencia de aminoácidos en las posiciones 47-71 (SEQ ID NO: 5), secuencia de aminoácidos en las posiciones 73-92 (SEQ ID NO: 6), secuencia de aminoácidos en las posiciones 88-105 (SEQ ID NO: 7), secuencia de aminoácidos en las posiciones 83-302 (SEQ ID NO: 8), secuencia de aminoácidos en las posiciones 335-353 (SEQ ID NO: 9), y secuencia de aminoácidos en las posiciones 370-396 (SEQ ID NO: 10) de BMP-2; secuencia de aminoácidos en las posiciones 74-93 (SEQ ID NO: 11), secuencia de aminoácidos en las posiciones 293-313 (SEQ ID NO: 12), secuencia de aminoácidos en las posiciones 360-379 (SEQ ID NO: 13), y secuencia de aminoácidos en las posiciones 382-402 (SEQ ID NO: 14), de BMP-4; secuencia de aminoácidos en las posiciones 91-110 (SEQ ID NO: 15), secuencia de aminoácidos en las posiciones 407-418 (SEQ ID NO: 16), secuencia de aminoácidos en las posiciones 472-490 (SEQ ID NO: 17), y secuencia de aminoácidos en las posiciones 487-510 (SEQ ID NO: 18), de BMP-6; y secuencia de aminoácidos en las posiciones 98-117 (SEQ ID NO: 19), secuencia de aminoácidos en las posiciones 320-340 (SEQ ID NO: 20), secuencia de aminoácidos en las posiciones 400-409 (SEQ ID NO: 21), y secuencia de aminoácidos en las posiciones 405-423 (SEQ ID NO: 22), de BMP-7;
- 10 (b) secuencia de aminoácidos en las posiciones 62-69 (SEQ ID NO: 23), secuencia de aminoácidos en las posiciones 140-148 (SEQ ID NO: 24), secuencia de aminoácidos en las posiciones 259-277 (SEQ ID NO: 25), secuencia de aminoácidos en las posiciones 199-204 (SEQ ID NO: 26), secuencia de aminoácidos en las posiciones 151-158 (SEQ ID NO: 27), secuencia de aminoácidos en las posiciones 275-291 (SEQ ID NO: 28), secuencia de aminoácidos en las posiciones 20-28 (SEQ ID NO: 29), secuencia de aminoácidos en las posiciones 65-90 (SEQ ID NO: 30), secuencia de aminoácidos en las posiciones 150-170 (SEQ ID NO: 31), y secuencia de aminoácidos en las posiciones 280-290 (SEQ ID NO: 32), de sialoproteína ósea II (BSP II); y
- 15 (c) secuencia de aminoácidos en las posiciones 149-169, YGLRSKS (SEQ ID NO: 33), KKFRRPDIQYPDAT (SEQ ID NO: 34), y YGLRSKSKKFRRPDIQYPDAT (SEQ ID NO: 35), de sialoproteína ósea I (BSP I, osteopontina).

La presente invención está dirigida a un material de injerto óseo y un biomaterial para la regeneración ósea, en el que un péptido que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo se inmoviliza en una superficie de la apatita.

30 En la presente invención, el biomaterial para la regeneración ósea se caracteriza por estar seleccionada del grupo que consiste en metales, polímeros naturales, y polímeros sintéticos.

35 En la presente invención, con el fin de permitir al péptido tener capacidad de regeneración de tejido óseo, y que se una a la apatita para unirse a una superficie de apatita de un material de injerto óseo o un biomaterial para la regeneración ósea, un material de injerto óseo, compuesto por apatita o un biomaterial tal como un metal, un polímero natural, o un polímero sintético, que tiene una superficie cubierta con apatita, puede ser sumergido en la solución peptídica, y aquí, no es necesario un agente químico de reticulación para la unión.

40 El péptido que tiene la capacidad de regeneración de tejido óseo y que se une a apatita de acuerdo a la presente invención es inmovilizado de manera estable a la superficie de la apatita para mejorar de este modo la estabilidad del mismo y mantener la actividad del mismo durante un largo tiempo. Por lo tanto, cuando el péptido es injertado en el cuerpo, el péptido se mantiene de manera estable en el sitio de injerto local para mantener de este modo el efecto de regeneración ósea del mismo, lo cual es apropiado en los tratamientos para regeneración de tejido óseo y tejido periodontal.

El péptido que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo y que se une a apatita de acuerdo a la presente invención, puede unirse a la apatita seleccionada del grupo que consiste en minerales óseos de hidroxiapatita derivados de un organismo, hidroxiapatita sintética, apatita carbonatada, fosfato tricálcico y fosfato monocálcico.

45 En la presente invención, el péptido que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo y que se une a la apatita preferentemente está contenido en un contenido de 1~100 mg por unidad de peso (1g) de material de injerto óseo, y más preferiblemente está contenido en un contenido de 20~80 mg por unidad de peso de material de injerto óseo.

50 De acuerdo con la presente invención, un péptido de SEQ ID NO: 36 que tiene capacidad de unión a apatita y un péptido de SEQ ID NO: 35 que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo se unieron entre sí, para fabricar un péptido de SEQ ID NO: 40 que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo y se une a la apatita. Después, se verificó si el péptido fabricado se unió de forma estable a un material de injerto óseo. Además, la capacidad de regeneración de tejido óseo se verificó injertando un material de injerto óseo en el que el péptido se inmovilizó de manera estable sobre una superficie de la apatita en el defecto craneal.

Ejemplos

55 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los ejemplos. Estos ejemplos son solamente para ilustrar la presente invención, y será obvio para los expertos en la

técnica que el alcance de la presente invención no se interpreta como limitado a estos ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de péptido inteligente que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo y que se une específicamente a una superficie del mineral apatita

5 Se sintetizó un péptido por el procedimiento de síntesis química en fase sólida F-moc usando un sintetizador peptídico, para contener YGLRSKSKKFRPDIQYPDAT (SEQ ID NO: 35) como una secuencia con capacidad de regeneración ósea, derivada de osteopontina, y STLPHEFSRE (SEQ ID NO: 36) como un péptido con capacidad de unión a apatita, secuencialmente desde el extremo N del mismo. Es decir, la síntesis se realizó usando la resina Rink (0,075 mmol/g, malla 100 ~ 200, reticulación DVB al 1 %) a la que Fmoc-(9-fluorenilmetoxicarbonilo) se une como un grupo de bloqueo. Se introdujeron 50 mg de la resina Rink en el sintetizador, y posteriormente se sometió a hinchamiento con DMF. Después de esto, se usó una solución al 20 % de piperidina/DMF para eliminar el grupo de Fmoc. Una solución de aminoácidos 0,5 M (disolvente: DMF), una solución de DIPEA 1,0 M (disolvente: DMF y NMP), y una solución de HBTU 0,5 M (disolvente: DMF) se introdujeron secuencialmente en 5, 10, y 5 equivalentes, respectivamente, del extremo C del péptido, y después se dejaron reaccionar durante 1-2 horas en una atmósfera de nitrógeno. Siempre que la desprotección y el acoplamiento terminaron, se realizó posteriormente un lavado con DMF y NMP dos veces. Incluso después del acoplamiento del aminoácido final, se realizó la desprotección para eliminar el grupo de Fmoc.

El ensayo de ninhidrina se usó para confirmar la síntesis. La resina ensayada y completamente sintetizada se secó sobre THF o DCM. Después, el cóctel de escisión de TFA se introdujo en una relación de 20 ml por 1 g de resina, y después se agitó durante 3 horas, seguido de filtración, para separar la resina y el cóctel con el péptido disuelto en el mismo. La solución filtrada a través del filtro se eliminó usando un evaporador giratorio y después se introdujo en el mismo éter frío, o se introdujo directamente una gran cantidad de éter frío a la solución de cóctel de TFA, para cristalizar el péptido en una fase sólida, que después se aisló mediante centrifugación. Aquí, el cóctel de TFA se eliminó completamente mediante lavado varias veces con éter y centrifugación. Por lo tanto, el péptido obtenido se disolvió en agua destilada, y después se liofilizó.

25 NH_2 -STLPHEFSRE-YGLRSKSKKFRPDIQYPDAT-COONH₂□□(SEQ ID NO: 40)

Después de la escisión del péptido sintetizado de la resina y después del lavado y la liofilización, se aisló y se purificó mediante cromatografía líquida. El péptido purificado se sometió a análisis MALDI, para confirmar el peso molecular del mismo.

30 Con el fin de ensayar la estabilidad *in vivo*, se dejó que 10 equivalentes de isotiocianato de fluoresceína (FITC) se unieran al extremo N mediante el uso de trietilamina (1 ml por 1 g de resina) en el momento de preparar el péptido de SEQ ID NO: 40. La síntesis del péptido se confirmó midiendo el peso molecular del mismo a través de MALDI-TOF.

Ejemplo 2: Confirmación sobre la estabilidad *in vitro* del péptido inteligente que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo y que se une específicamente a una superficie del mineral apatita

35 Se disolvieron 1200 mg del péptido preparado en el Ejemplo 1 en 1 ml de agua destilada terciaria, y después se añadieron al mismo 4 g de mineral óseo bovino (OCS-B, NIBEC) seguido de deposición durante 24 horas y después se liofilizó.

40 Se introdujeron 4 g de material de injerto óseo con un péptido en 20 ml de PBS, y después se realizó un ensayo de liberación de péptido a 37 °C. Después de 7 días, se eliminaron completamente 20 ml del disolvente de elución que se introdujo inicialmente, y después se añadieron de nuevo 20 ml de un nuevo disolvente de elución para proceder con la elución a 37 °C. De la manera anterior, el ensayo de elución peptídica se realizó durante 14 días, 28 días, 56 días, 84 días, y 100 días. Después de completar la elución, se recogió el material de injerto óseo y se midió el contenido de péptido.

Procedimiento de preparación de líquido de ensayo

45 Se pesaron de manera precisa 3 g de material de injerto óseo con un péptido de unión, y después se convirtió en polvo. Aproximadamente 2 g de polvo correspondiente a 160 mg de péptido se pesaron de forma precisa, que después se introdujo en 40 ml de la Solución A como fase móvil, seguido de sonicación durante 1 hora. Después de esto, se realizó la extracción mientras que se agito a 37 + 2 °C durante 24 horas, y después la capa superior del disolvente extraído se separó por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos y después filtración con un filtro Millipore de 22 μm. Se recogió del mismo 1 ml, y se mezcló con 3 ml de la Solución A, que después se filtró a través de un filtro Millipore de 0,22 μm, y después el filtrado se usó como el líquido de ensayo.

Procedimiento de preparación de líquido estándar

55 El producto peptídico estándar se secó en el desecador (gel de sílice) durante 5 horas, y después se pesaron con precisión 10 mg del mismo, que después se disolvió mediante la adición de la Solución A como una fase móvil, y después se usaron exactamente 10 ml del mismo como un líquido estándar.

Procedimiento de ensayo

El líquido de ensayo y el líquido estándar se ensayaron cada 10 µl en las siguientes condiciones operativas para cromatografía líquida, para obtener las áreas máximas del líquido de ensayo y del líquido estándar, A_T y A_S.

Cantidad de péptido (mg) = cantidad de producto peptídico estándar (mg) X

5 **Condiciones operativas**

Medidor: HPLC analítica (Shimadzu, Japón)

Columna: Cargada con gel de sílice unido a C18 con un tamaño de 5 µm (longitud: 250 mm, diámetro interno: 4,6 mm)

10 Fase móvil: ácido trifluoroacético al 0,1 %/DDW (Solución A) ácido trifluoroacético al 0,098 %/acetonitrilo (Solución B)

Detector: espectrómetro de absorción UV (longitud de onda de medición: 230 nm)

Caudal: 1 ml/min

Temperatura de columna: Constante a aproximadamente 40 °C

15 [Tabla 1]

| Condiciones de gradiente | |
|--------------------------|----------------------------------|
| Tiempo (min) | Composición de la Solución B (%) |
| 1 | 5 |
| 35 | 100 |
| 45 | 100 |
| 50 | 5 |
| 60 | 5 |

20 El ensayo de elución se realizó durante 100 días para medir el pico del péptido en el líquido de elución. Como resultado (FIG. 2), no se observó el pico del péptido en el Lote N.º 1, 2 y 3 para el tiempo de retención de 14,196 min. Después de terminar la elución, las cantidades de péptido para los lotes N.º 1, 2 y 3 se midieron a 9,2 mg, 9,18 mg, y 9,78 mg, respectivamente (FIG. 3). Esto probó que el péptido que se unía al material de injerto óseo no se liberó en el líquido de elución, y, por lo tanto, el péptido se inmovilizó de manera estable al material de injerto óseo.

[Tabla 2]

| Resultado sobre la liberación del péptido de SEQ ID NO: 40 del mineral óseo | | | | | | |
|---|-----|----------|----------------|------|--------|----|
| Lote N.º | día | Nombre | Tiempo de ret. | Área | Altura | mg |
| 1 | 7 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 28 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 56 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 84 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 100 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 7 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | |
|---|-----|----------|-------|---|---|---|
| | 28 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 56 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 84 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 100 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 7 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 28 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 56 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 84 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |
| | 100 | RT14.196 | 0,000 | 0 | 0 | 0 |

[Tabla 3]

| Contenido de péptido de SEQ ID NO: 40 restante en el mineral óseo | | | | | |
|---|----------|----------------|---------|--------|------|
| Lote N.º | Nombre | Tiempo de ret. | Área | Altura | mg |
| 1 | RT14.196 | 14,244 | 1176751 | 51132 | 9,2 |
| 2 | RT14.196 | 14,235 | 1174499 | 51711 | 9,19 |
| 3 | RT14.196 | 14,229 | 124963 | 56018 | 9,78 |

5 **Ejemplo 3: Confirmación sobre la estabilidad *in vivo* del péptido inteligente con capacidad de regeneración de tejido óseo y que se une específicamente a una superficie del mineral apatita**

El péptido de SEQ ID NO: 40, marcado con FITC, se precipitó en el mineral óseo bovino (OCS-B, NIBEC). El mineral óseo resultante se injertó en el defecto craneal de conejo, y a continuación se escarificó después de 4 semanas. Después de esto, el mineral óseo injertado en el defecto craneal se observó utilizando un microscopio confocal (Olympus, Japón). El mineral óseo con péptido de unión de SEQ ID NO: 40, marcado con FITC, en 10 mg y 20 mg se injertó en el defecto craneal de conejo. La sangre se recogió antes del injerto y 1 día, 3 días, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días después del injerto, y después se determinó utilizando el fluorómetro si el péptido se liberó a la sangre sistémica.

15 Como resultado, se confirmó que el péptido se inmovilizó bien sobre la superficie del material de injerto óseo injertado en el defecto craneal y no se extendió al tejido circundante (FIG. 1B). Los valores RFI no tuvieron diferencias en comparación con los valores antes del injerto, lo que confirmó que el péptido contenido en el mineral óseo no se liberó en la sangre, y este hecho probó que el péptido se inmovilizó bien sobre la superficie del mineral óseo (FIG. 2).

20 **Ejemplo 4: Confirmación sobre la capacidad de regeneración ósea *in vivo* del péptido inteligente con capacidad de regeneración de tejido óseo y que se une específicamente a una superficie del mineral apatita**

25 Cada uno de los péptidos de SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, y SEQ ID NO: preparados en el Ejemplo 1, se dejó que se uniera a un material de injerto mediante el mismo procedimiento que el Ejemplo 2, que después se injertó en el defecto craneal de conejo. La capacidad de regeneración ósea del mismo se confirmó. Un defecto óseo circular de 8 mm de diámetro se formó en la región craneal del conejo anestesiado (conejo blanco NewZealand, nombre específico: cuniculus). El material de injerto óseo y el material de injerto óseo que contiene péptido se injertaron en el defecto óseo con 50 mg para cada defecto, y el periostio y la piel se suturaron doblemente. El animal se sacrificó después de 2 semanas del injerto, y se tomaron las muestras que se fijaron en la solución de formalina. El tejido se sometió a incrustación para preparar un espécimen de 20 μm de espesor. El espécimen preparado se tiñó con fucsina básica y azul de toluidina para producir una muestra no desmineralizada. La muestra producida de este modo, se observó mediante un microscopio óptico, y se fotografió.

30 La FIG. 3 muestra el efecto de regeneración ósea por el material de injerto óseo que contiene un péptido inteligente que tiene capacidad de regeneración de tejido óseo y se une específicamente a una superficie del mineral apatita. El

efecto de regeneración ósea fue menor para el material de injerto óseo con un péptido de unión de SEQ ID NO: 36 (A, péptido de unión a apatita). Se observó que el material de injerto óseo con un péptido de unión de SEQ ID NO: 35 (B, péptido que tiene efecto de regeneración ósea) ha aumentado el efecto de regeneración ósea en comparación con A, y el material de injerto óseo con un péptido de unión de SEQ ID NO: 40 (C, péptido inteligente que tiene capacidad de rejuvenecimiento y se une de manera específica a la superficie del mineral apatita) tenía una capacidad de regeneración ósea notablemente aumentada en comparación con A y B. Se probó a partir de esto que el péptido de unión a apatita, por sí mismo, no fue eficaz en el efecto de regeneración ósea, y se piensa que el péptido que tenía efecto de regeneración ósea no se une de manera estable al material de injerto óseo y, por lo tanto, tiene menos efecto de regeneración ósea en comparación con el péptido inteligente que tiene ambas capacidades. Por lo tanto, cuando el péptido inteligente que tiene capacidad de regeneración ósea y se une de manera específica a la superficie del mineral apatita se utiliza en el material de injerto óseo fabricado de apatita o el implante cubierto con apatita, se prevé que el efecto de regeneración ósea sea importante.

El péptido que tiene capacidad de unión al mineral apatita y capacidad de regeneración ósea de acuerdo a la presente invención se une a la superficie de apatita para estar presente de este modo en un estado estable, y por lo tanto, puede usarse en un material de reemplazo óseo para aplicación dental u ortopédica, y metal, polímeros naturales, o polímeros sintéticos, cubiertos con apatita, promover la transición, proliferación, y diferenciación de células asociadas con la regeneración y eventualmente maximizar la regeneración de tejido óseo; y puede estar presente de manera estable mientras se mantiene la actividad del péptido cuando se injerta en el cuerpo y, por lo tanto, es útil en el desarrollo de la tecnología terapéutica de regeneración de tejido óseo usando el péptido.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Nano Intelligent Biomedical Engineering Corporation Co., Ltd.

<120> Péptido que tiene la capacidad de regenerar tejido óseo y de unirse a apatita

<130> 25383EP1

<140>

<141> 09-03-2011

<150> KR 10-2010-0088707

<151> 10-09-2010

<160> 40

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de BMP-2

<400> 1

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Lys | His | Lys | Gln | Arg | Lys | Arg | Leu | Lys | Ser | Ser | Cys | Lys | Arg | His |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de BMP-4

<400> 2

ES 2 643 604 T3

Cys Ser Pro Lys His His Pro Gln Arg Ser Arg Lys Lys Asn
 1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de BMP-6

<400> 3

Cys Ser Ser Arg Lys Lys Asn Lys Asn Cys Arg Arg His
 1 5 10

10 <210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> péptido parcial de BMP-2

<400> 4

Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His
 1 5 10 15

Ala

<210> 5

<211> 25

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de BMP-2

<400> 5

Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile
 1 5 10 15

Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn
 20 25

25 <210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> péptido parcial de BMP-2

<400> 6

ES 2 643 604 T3

Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser
1 5 10 15

Met Leu Tyr Leu
20

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de BMP-2

<400> 7

Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr
1 5 10 15

Gln Asp

10 <210> 8

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> péptido parcial de BMP-2

<400> 8

ES 2 643 604 T3

Tyr Arg Arg His Ser Gly Gln Pro Gly Ser Pro Ala Pro Asp His Arg
 1 5 10 15
 Leu Glu Arg Ala Ala Ser Arg Ala Asn Thr Val Arg Ser Phe His His
 20 25 30
 Glu Glu Ser Leu Glu Glu Leu Pro Glu Thr Ser Gly Lys Thr Thr Arg
 35 40 45
 Arg Phe Phe Phe Asn Leu Ser Ser Ile Pro Thr Glu Glu Phe Ile Thr
 50 55 60
 Ser Ala Glu Leu Gln Val Phe Arg Glu Gln Met Gln Asp Ala Leu Gly
 65 70 75 80
 Asn Asn Ser Ser Phe His His Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Ile Ile Lys
 85 90 95
 Pro Ala Thr Ala Asn Ser Lys Phe Pro Val Thr Arg Leu Leu Asp Thr
 100 105 110
 Arg Leu Val Asn Gln Asn Ala Ser Arg Trp Glu Ser Phe Asp Val Thr
 115 120 125
 Pro Ala Val Met Arg Trp Thr Ala Gln Gly His Ala Asn His Gly Phe
 130 135 140
 Val Val Glu Val Ala His Leu Glu Glu Lys Gln Gly Val Ser Lys Arg
 145 150 155 160
 His Val Arg Ile Ser Arg Ser Leu His Gln Asp Glu His Ser Trp Ser
 165 170 175
 Gln Ile Arg Pro Leu Leu Val Thr Phe Gly His Asp Gly Lys Gly His
 180 185 190
 Pro Leu His Lys Arg Glu Lys Arg Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys
 195 200 205
 Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg His Pro Leu Tyr
 210 215 220

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de BMP-2

<400> 9

Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser
 1 5 10 15
 Met Leu Tyr Leu
 20

10 <210> 10

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> péptido parcial de BMP-2

ES 2 643 604 T3

<400> 10

Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr
1 5 10 15

Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg
20 25

<210> 11

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de BMP-4

<400> 11

Ser Ser Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile
1 5 10 15

Ser Met Leu Tyr Leu
20

10

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido parcial de BMP-4

<400> 12

Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys Asn Lys Asn Cys Arg
1 5 10 15

Arg His Ser Leu Tyr
20

<210> 13

20 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de BMP-4

25 <400> 13

Ser Ser Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile
1 5 10 15

Ser Met Leu Tyr Leu
20

<210> 14

<211> 21

<212> PRT

ES 2 643 604 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de BMP-4

<400> 14

Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr
1 5 10 15

Gln Glu Met Val Val
20

5

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> péptido parcial de BMP-6

<400> 15

Tyr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser
1 5 10 15

Val Leu Tyr Phe
20

<210> 16

15

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de BMP-6

20

<400> 16

Glu Leu Lys Thr Ala Cys Arg Lys His Glu Leu Tyr
1 5 10

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de BMP-6

<400> 17

Tyr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser
1 5 10 15

Val Leu Tyr Phe
20

30

<210> 18

ES 2 643 604 T3

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> péptido parcial de BMP-6

<400> 18

```

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
 1           5           10           15
Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys
                20
    
```

<210> 19

<211> 20

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial de BMP-7

<400> 19

```

Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile Ser
 1           5           10           15
Val Leu Tyr Phe
                20
    
```

15

<210> 20

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido parcial de BMP-7

<400> 20

```

Glu Asn Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu
 1           5           10           15
Tyr Val Ser Phe Arg
                20
    
```

25 <210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Péptido parcial de BMP-7

<400> 21

ES 2 643 604 T3

Gln Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
 1 5 10

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido parcial de BMP-7

<400> 22

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
 1 5 10 15

Arg Asn Met

10 <210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> péptido parcial de sialoproteína ósea

<400> 23

Glu Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu
 1 5

<210> 24

<211> 45

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de sialoproteína ósea

<400> 24

Asn Thr Thr Leu Ser Ala Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Glu Asp Ala Thr
 1 5 10 15

Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Gly Leu Ala Ala Ile Gln Leu Pro Lys Lys
 20 25 30

Ala Gly Asp Ile Thr Asn Lys Ala Thr Lys Glu Lys Glu
 35 40 45

<210> 25

<211> 18

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de sialoproteína ósea

ES 2 643 604 T3

<400> 25

Tyr Glu Thr Tyr Asp Glu Asn Asn Gly Glu Pro Arg Gly Asp Thr Tyr
1 5 10 15

Arg Ile

<210> 26

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de sialoproteína ósea

<400> 26

10 Glu Glu Gly Glu Glu Glu
1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido parcial de sialoproteína ósea

<400> 27

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1 5

<210> 28

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de sialoproteína ósea

25 <400> 28

Tyr Glu Ile Tyr Glu Ser Glu Asn Gly Glu Pro Arg Gly Asp Asn Tyr
1 5 10 15

Arg

<210> 29

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de sialoproteína ósea

ES 2 643 604 T3

<400> 29

Lys Asn Leu His Arg Arg Val Lys Ile
1 5

<210> 30

<211> 26

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de sialoproteína ósea

<400> 30

Asp Ser Ser Glu Glu Asn Gly Asp Asp Ser Ser Glu Glu Glu Glu Glu
1 5 10 15

10

Glu Glu Glu Thr Ser Asn Glu Gly Glu Asn
20 25

<210> 31

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido parcial de sialoproteína ósea

<400> 31

Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Asn Glu Asn Glu Glu Ser
1 5 10 15

Glu Ala Glu Val Asp
20

<210> 32

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de sialoproteína ósea

25 <400> 32

Ser Glu Asn Gly Glu Pro Arg Gly Asp Asn Tyr
1 5 10

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de sialoproteína ósea

ES 2 643 604 T3

<400> 33

Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser
1 5

<210> 34

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido parcial de sialoproteína ósea

<400> 34

10 Lys Lys Phe Arg Arg Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr
1 5 10

<210> 35

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido parcial de sialoproteína ósea

<400> 35

Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg Pro Asp Ile Gln
1 5 10 15

Tyr Pro Asp Ala Thr
20

<210> 36

20 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de unión a apatita

25 <400> 36

Ser Thr Leu Pro Ile Pro His Glu Phe Ser Arg Glu
1 5 10

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de unión a apatita

<400> 37

ES 2 643 604 T3

Val Thr Lys His Leu Asn Gln Ile Ser Gln Ser Tyr
 1 5 10

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de unión a apatita

<400> 38

Ser Val Ser Val Gly Met Lys Pro Ser Pro Arg Pro
 1 5 10

10 <210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> péptido de unión a apatita

<400> 39

Asn Arg Val Phe Glu Val Leu Arg Cys Val Phe Asp
 1 5 10

<210> 40

<211> 33

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido inteligente de unión a apatita

<400> 40

Ser Thr Leu Pro Ile Pro His Glu Phe Ser Arg Glu Tyr Gly Leu Arg
 1 5 10 15

Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala
 20 25 30

25 Thr

REIVINDICACIONES

- 1.- Un péptido que tiene la capacidad de regeneración de tejido óseo y unirse a la apatita, en el que el péptido se representa por la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 40.
- 2.- Un material de injerto óseo en el que el péptido de la reivindicación 1 está inmovilizado en una apatita.
- 5 3.- El material de injerto óseo de la reivindicación 2, en el que la apatita se selecciona del grupo que consiste en minerales óseos de hidroxilapatita derivados de organismos, hidroxapatita sintética, apatita carbonatada, fosfato tricálcico, y fosfato monocálcico.
- 4.- El material de injerto óseo de la reivindicación 2, en el que el péptido está contenido en un contenido de 1~100 mg por peso unitario (1 g) del material de tejido óseo.
- 10 5.- Un material de injerto óseo para regeneración ósea, en el que el péptido de la reivindicación 1 está inmovilizado sobre una superficie de un biomaterial recubierto con apatita, en el que el material se selecciona del grupo que consiste en metales, polímeros naturales, y polímeros sintéticos.
- 6.- El material de injerto óseo para regeneración ósea de la reivindicación 5, en el que la apatita se selecciona del grupo que consiste en minerales óseos de hidroxilapatita derivados de organismos, hidroxapatita sintética, apatita carbonatada, fosfato tricálcico, y fosfato monocálcico.
- 15 7.- El material de injerto óseo para regeneración ósea de la reivindicación 5, en el que el péptido está contenido en un contenido de 1~100 mg por peso unitario (1 g) del material de tejido óseo para regeneración ósea.

FIG. 1

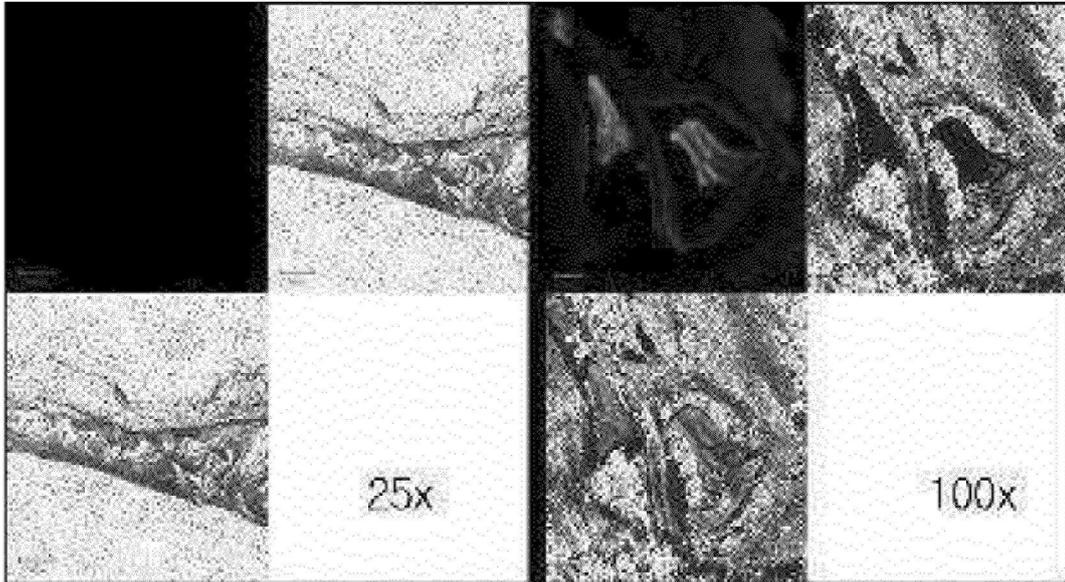


FIG. 2

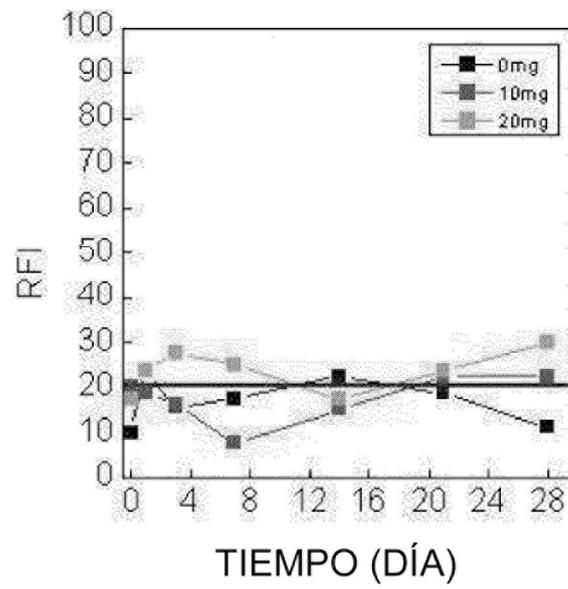


FIG. 3

