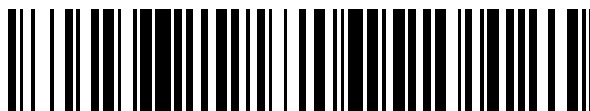


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 180**

51 Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2012 PCT/KR2012/004346**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12165900**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2012 E 12793200 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2716299**

54 Título: **Péptido BFP 4 para promover la formación ósea o vasculogénesis, y aplicación del mismo**

30 Prioridad:

03.06.2011 KR 20110054179

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

29.01.2020

73 Titular/es:

**CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL
(100.0%)**

**42 Jebong-ro, Dong-gu
Gwangju 501-757, KR**

72 Inventor/es:

**YOON, TAEK RIM;
KIM, HYUNG KEUN y
JEONG, MYUNG HO**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 739 180 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 BFP 4 para promover la formación ósea o vasculogénesis, y aplicación del mismo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un péptido para su uso terapéutico en la promoción de la osteoporosis o vascularización y a una composición farmacéutica para su uso en profilaxis o terapia de una osteopatía o una enfermedad isquémica.

10

Antecedentes de la técnica

Los huesos forman parte del endoesqueleto que soporta físicamente el cuerpo y desempeñan un papel importante en el mantenimiento del nivel de calcio en la sangre. En un estado normal, los huesos presentan homeostasis dinámica en la que tanto la reabsorción como la formación ósea se desarrollan activamente en equilibrio metabólico. La alteración del equilibrio entre la reabsorción y la formación ósea con un desplazamiento hacia la reabsorción ósea provoca una disminución en la densidad mineral ósea o masa ósea y fuerza ósea, lo que conduce a la osteoporosis.

15

La osteoporosis es una osteopatía caracterizada por el alto riesgo de fractura al recibir solo un impacto ligero como resultado del debilitamiento de los huesos. Otras osteopatías representativas son la artrosis y los defectos óseos. La artrosis, también conocida como artritis degenerativa, se caracteriza por un cambio degenerativo local en la articulación como resultado de la ruptura y pérdida de cartilago. Pueden formarse defectos óseos en muchos sitios del cuerpo, predominantemente debido a traumatismo agudo acompañado de pérdida de la matriz ósea, traumatismo agudo acompañado de pérdida ósea quirúrgica, infección crónica acompañada de resección ósea y pseudoarticulación crónica acompañada de defectos segmentarios.

20

25

El mercado asociado con osteopatías en todo el mundo asciende a aproximadamente 130 mil millones de dólares y se espera que se amplíe continuamente. Por tanto, los institutos de investigación y las compañías farmacéuticas han realizado enormes inversiones en el desarrollo de medicamentos para osteopatías.

30

Los medicamentos utilizados en la actualidad para la osteoporosis incluyen bisfosfonatos (alendronato, etidronato, etc.), agentes hormonales (raloxifeno), agentes de vitamina D, agentes de calcitonina y agentes de calcio. Recientemente, el agente hormonal paratiroideo FORTEO™ ha estado disponible en el mercado y tiene la capacidad de formar hueso nuevo.

35

Sin embargo, los bisfosfonatos tienen un problema asociado con su absorción porque debido a que los bisfosfonatos se absorben a una velocidad muy baja y provocan la erosión del esófago, los pacientes deben tomarlos junto con una cantidad suficiente de agua y sentarse derechos durante un tiempo después de la toma de la medicación. Los agentes hormonales deben tomarse durante toda la vida de los pacientes y su administración a largo plazo puede provocar efectos secundarios tales como cáncer de mama, cáncer uterino y trombosis. Los agentes de vitamina D son muy caros y su eficacia farmacéutica no es fiable. Los agentes de calcitonina también son caros y tienen un problema asociado con la administración de los mismos. Los agentes de calcio no producen efectos secundarios significativos, pero se limitan a efectos profilácticos más que efectos terapéuticos.

40

El agente hormonal paratiroideo FORTEO™, que se ha comercializado recientemente, puede inducir la formación de hueso y, por tanto, tiene una ventaja sobre los fármacos convencionales que actúan para prevenir la reabsorción ósea. Sin embargo, adolece de las desventajas de ser administrado por inyección diaria durante un largo periodo de tiempo y ser muy costoso. Por lo tanto, existe la necesidad de un medicamento y método nuevos que puedan aumentar la masa ósea y mejorar la calidad ósea para reducir sustancialmente el riesgo de fractura, que sean por tanto aplicables al tratamiento de la osteoporosis.

45

50

Las enfermedades isquémicas están provocadas por la restricción local del aporte de sangre como resultado de diversas anomalías patológicas en los vasos sanguíneos, con el consiguiente daño o disfunción de los tejidos. El aporte de sangre a través de los vasos es esencial para la cicatrización de heridas o la regeneración tisular. Enfermedades vasculares, tales como arteriosclerosis, infarto de miocardio y angina de pecho, están provocadas por la restricción del flujo sanguíneo.

55

Se usa terapia vascular para tratar enfermedades generando vasos. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ya se usa como un agente terapéutico para la isquemia grave. Otros factores vasculogénicos o angiogénicos, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PDEGF) también se han estudiado con fines de uso clínico. Sin embargo, estos factores son proteínas y, por lo tanto, son difíciles de separar y purificar. Además, son demasiado caros para su aplicación clínica.

60

Los documentos WO 2009/139525 A1 y WO 2009/154330 A1 desvelan los péptidos formadores de hueso sintéticos BFP1 y BFP2.

65

El documento WO 00/47114 A1 desveló la combinación de un péptido formador de hueso con un colágeno soluble.

Además, la SEQ ID NO: 1, también denominada BFP 4 y que se define de la siguiente manera: Phe-Phe-Lys-Ala-Thr-Glu-Val-His-Phe-Arg-Ser-Ile-Arg-Ser-Thr, se conoce a partir del documento WO 2010/037395 en relación con la preparación de complejos de MHC-péptido multiméricos para su uso en el diagnóstico de, tratamiento o vacunación contra una enfermedad.

Divulgación

Problema técnico

La presente invención tiene como objetivo proporcionar usos alternativos para los péptidos BFP 4.

Solución técnica

Este problema técnico se resuelve según la reivindicación 1 mediante un péptido para su uso en la promoción de la osteogénesis o vascularización, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Se indican realizaciones ventajosas en otras reivindicaciones.

En la realización de la presente invención, la investigación intensiva y exhaustiva sobre el tratamiento de las osteopatías y las enfermedades isquémicas dio como resultado el hallazgo de que BFP 4 (péptido formador de hueso 4) se puede sintetizar económicamente y tiene la actividad de promover la osteogénesis y la vascularización.

Como se usa en el presente documento, se entiende que el término "osteogénesis" se refiere al proceso de deposición de nuevo material óseo, incluyendo la formación de matriz ósea por osteoblastos y su mineralización.

Se entiende que el término "vascularización", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso físico de formación de vasos sanguíneos, es decir, la generación de nuevos vasos sanguíneos en células, tejidos u órganos, incluyendo tanto la producción *de novo* de células endoteliales (vasculogénesis) como el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes (angiogénesis).

Como se usa en el presente documento, la expresión "promover la osteogénesis o vascularización" o sus variaciones gramaticales significa provocar la osteogénesis o vascularización en poco tiempo, incluyendo la inducción de la osteogénesis y vascularización.

Por el término "péptido", como se usa en el presente documento, se entiende un polímero corto de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Todos los aminoácidos pueden tener una configuración L o D. Las variaciones en los péptidos, incluyendo la fusión con otros aminoácidos o péptidos, están dentro del alcance de la presente invención siempre que tengan la actividad de promover la osteogénesis o la vascularización.

El aminoácido útil en la presente invención puede incluir un aminoácido de origen natural, un aminoácido sintético y un análogo de aminoácido y un mimético de aminoácido, que actúan como aminoácidos de origen natural. La expresión "aminoácido de origen natural" significa un aminoácido codificado por el código genético. El análogo de aminoácido es un compuesto que tiene átomos de hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un átomo de carbono α unido a un grupo R, con una modificación dada al grupo R (por ejemplo, norleucina) o a la cadena principal peptídica. La expresión "mimético de aminoácido" significa un compuesto químico que difiere de los aminoácidos en su estructura química, pero actúa como un aminoácido de origen natural.

La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 puede proceder de BMP7 y, por ejemplo, del prodominio de la proteína morfogenética ósea 7 (BMP7). Las BMP se conocen como factores capaces de inducir la osificación, pero existen en una cantidad traza en la naturaleza. Las BMP tienen pesos moleculares altos y su preparación recombinante es muy costosa. Además, se aplican muchas restricciones al uso de BMP como medicamentos con respecto a propiedades físicas y administración debido a sus propiedades proteicas. Por el contrario, el péptido de la presente invención es un compuesto de bajo peso molecular que comprende 15 aminoácidos y puede producirse económicamente. Además, con respecto a su función, el péptido de la presente invención muestra un efecto osteogénico idéntico o superior al de BMP7.

El péptido de la presente invención puede promover la diferenciación de osteoblastos o la expresión de VEGF.

En una realización, El péptido de la presente invención puede ser un péptido que tiene la actividad de promover la osteogénesis y la vascularización.

En un experimento en el que se examinó la diferenciación de células osteoblásticas, se descubrió que el péptido de la presente invención promueve la diferenciación osteoblástica a niveles mayores que BMP7, medido por la tinción con rojo de alizarina (FIG. 2). Además, un ensayo animal con ratones mostró que se lograba una cantidad aún mayor de formación ósea en sitios tratados con el péptido de la presente invención que con BMP7 (FIG. 8). Por lo

tanto, el péptido de la presente invención puede ser útil para la prevención y el tratamiento de osteopatías.

La expresión de VEGF, conocido como un potente factor implicado en la vascularización, estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos. En un ejemplo de la presente invención, el péptido de la presente invención expresó un nivel mayor de VEGF que BMP7 (FIG. 9). Un ensayo animal de ratones mostró que el péptido de la presente invención indujo la formación de nuevos vasos sanguíneos en matrigel (FIG. 10). En consecuencia, el péptido de la presente invención puede ser útil para la prevención y el tratamiento de enfermedades isquémicas.

El péptido de la presente invención se puede preparar usando un método de síntesis peptídica bien conocido o cultivando células hospedadoras transformadas. En este último caso, normalmente, un polinucleótido que codifica el péptido se introduce en un vector de expresión que después se transforma en una célula hospedadora y el transformante se cultiva para producir el péptido. Para cultivar el transformante, se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a un polímero compuesto por muchos monómeros de nucleótidos unidos covalentemente en una cadena, como se ilustra por ADN (ácido desoxirribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico). El polinucleótido comprende un polinucleótido que codifica el péptido de la reivindicación 1.

En el polinucleótido, se pueden realizar diversas modificaciones en la región codificante siempre que no cambien la secuencia de aminoácidos del polipéptido expresado a partir de la región codificante, debido a la degeneración de los codones o tomando en consideración los codones preferidos por el organismo en el que se van a expresar, y pueden introducirse diversas modificaciones o alteraciones incluso en regiones distintas de la región codificante, siempre que no tengan influencia sobre la expresión del gen. Es decir, el polinucleótido puede modificarse en una o más bases de ácido nucleico por sustitución, supresión, inserción o una combinación de los mismos siempre que los polinucleótidos resultantes codifiquen polipéptidos funcionalmente equivalentes.

El vector recombinante es un medio para expresar el péptido dentro de una célula hospedadora. Puede usarse cualquier vector de expresión tal como un vector plasmídico, un vector cosmídico, un vector bacteriófago y así sucesivamente, siempre que sea conocido como un vector de expresión en la técnica. El vector puede ser construido fácilmente por el experto habitual en la materia utilizando una técnica de recombinación de ADN bien conocida.

De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la profilaxis o terapia de una osteopatía o una enfermedad isquémica como se define en la reivindicación 5. Se indican realizaciones ventajosas de la misma en otras reivindicaciones.

El péptido y la composición farmacéutica indicados anteriormente se pueden usar para la profilaxis o terapia de una osteopatía o una enfermedad isquémica, que comprende administrar la composición farmacéutica a un sujeto que ha sido atacado con o es probable que sea atacado con la osteopatía o la enfermedad isquémica.

Como se usa en el presente documento, el término "prevención" se refiere a cualquier medida tomada para suprimir o retardar la aparición de osteopatías o enfermedades isquémicas mediante la administración de la composición farmacéutica de una realización de la presente invención. El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier medida tomada para mejorar o alterar beneficiosamente los síntomas de osteopatías o enfermedades isquémicas mediante la administración de dicha composición farmacéutica de una realización de la presente invención.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier animal incluyendo seres humanos, que ha sido atacado con o es probable que sea atacado con la osteopatía o enfermedad isquémica. La osteopatía puede seleccionarse del grupo que consiste en osteoporosis, artrosis, fractura ósea, osteogénesis imperfecta y una combinación de las mismas. La enfermedad isquémica puede ser una seleccionada del grupo que consiste en necrosis isquémica, enfermedades cerebrovasculares isquémicas, nefropatías isquémicas, enfermedades pulmonares isquémicas, enfermedades isquémicas de las extremidades, cardiopatías isquémicas, apoplejía, infarto cerebral, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca isquémica, angina de pecho, arterioesclerosis obstructiva y una combinación de las mismas.

Siempre que permita que la composición farmacéutica de la realización de la presente invención alcance tejidos o células de interés (por ejemplo, un sitio con defecto óseo), se puede tomar cualquier vía de administración. Dependiendo de los fines de la administración, la composición farmacéutica de la realización de la presente invención puede administrarse directa o indirectamente a través de vías intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, intrapulmonar, intrarrectal o intracelular. En este contexto, la composición farmacéutica de la realización de la presente invención se puede administrar por medio de cualquier dispositivo capaz de transportar un principio activo a células diana.

La composición farmacéutica de una realización de la presente invención puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Cuando contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable, la composición

farmacéutica de una realización de la presente invención puede existir en diversas formas de dosificación orales o no orales. A este respecto, la composición farmacéutica de una realización de la presente invención se puede formular en combinación con diluyentes o un excipiente tal como una carga, un espesante, un aglutinante, un agente humectante, un disgregante, un tensioactivo, etc. Las preparaciones sólidas destinadas a la administración oral pueden tomar la forma de comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas y similares. Con respecto a estos agentes sólidos, el péptido de una realización de la presente invención puede formularse en combinación con al menos un excipiente tal como almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa o gelatina. Las preparaciones líquidas destinadas a la administración oral incluyen suspensiones, soluciones de uso interno, emulsiones, jarabes y similares. Además de un diluyente sencillo tal como agua o parafina líquida, diversos excipientes, tales como agentes humectantes, agentes edulcorantes, aromáticos, conservantes y similares pueden estar contenidos en las preparaciones líquidas. Además, la composición farmacéutica de la realización de la presente invención se puede administrar a través de una vía no oral. Para ello, se pueden usar soluciones acuosas estériles, disolventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, liofilizados, supositorios y similares. Propilenglicol inyectable, polietilenglicol, aceites vegetales como aceite de oliva y ésteres tales como oleato de etilo pueden ser adecuados para disolventes y suspensiones no acuosos. Los materiales básicos de los supositorios incluyen Witepsol, macrogol, Tween 61, manteca de cacao, manteca de laurina y glicerogelatina.

La forma de dosificación de la composición farmacéutica de la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste en un comprimido, una píldora, un polvo, un gránulo, una cápsula, una suspensión, una solución de uso interno, una emulsión, un jarabe, una solución acuosa estéril, una solución no acuosa, una suspensión, un liofilizado y un supositorio.

La composición farmacéutica de la presente invención se administra en una cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz. Se entiende que la expresión "cantidad terapéutica o farmacéutica eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad suficiente de la composición farmacéutica para tratar una enfermedad, con una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de diversos factores, incluyendo la gravedad de la enfermedad que se está tratando, la edad y el sexo del paciente, actividad farmacológica, sensibilidad a fármacos, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción, el periodo de tiempo del tratamiento, la administración conjunta de fármacos y otros parámetros bien conocidos en la técnica.

Para el tratamiento de osteopatías o enfermedades isquémicas, la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar en combinación con cirugía, hormonas, fármacos y/o reguladores de reacciones biológicas.

Efectos ventajosos

El péptido para su uso en la promoción de la osteogénesis de acuerdo con la presente invención tiene un bajo peso molecular, de modo que se puede sintetizar económicamente. Además, el péptido de la presente invención puede promover la diferenciación osteoblástica, induciendo de este modo la osteogénesis. Por lo tanto, el péptido de la presente invención es útil en la prevención o el tratamiento de osteopatías.

Además, el péptido para su uso en la promoción de la vascularización de acuerdo con la presente invención puede inducir la expresión de VEGF, dando como resultado la vascularización. Por lo tanto, el péptido de la presente invención es aplicable a la prevención o el tratamiento de enfermedades isquémicas.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos, estructura y carga neta de BFP 4.

La FIG. 2 es de fotografías que muestran la capacidad de BFP 4 para promover la diferenciación osteoblástica, analizada mediante tinción con rojo de alizarina.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra la ausencia de citotoxicidad de BFP 4.

La FIG. 4 es de gráficos que muestran aumentos inducidos por BFP 4 tanto en la actividad de ALP como en el nivel de calcio.

La FIG. 5 es una fotografía que muestra la expresión inducida por BFP 4 de genes de runx2, osteocalcina y ALP mediante transferencia de western.

La FIG. 6 es una gráfica que muestra la expresión inducida por BFP 4 de marcadores de superficie celular (CD44 y CD51) asociados con la diferenciación osteoblástica, analizada mediante FACS.

La FIG. 7 es de microfotografías de fluorescencia que muestran la expresión inducida por BFP 4 de CD44 y CD51.

La FIG. 8 es de fotografías de rayos X que muestran la osteogénesis inducida por BFP 4 en regiones trasplantadas de ratones.

La FIG. 9 es una fotografía que muestra la expresión inducida por BFP 4 de VEGF.

La FIG. 10 es una fotografía que muestra la vascularización inducida por BFP 4 en Matrigel trasplantado en un animal.

Modo para la invención

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención a través de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar la presente invención.

5

Ejemplo 1: Síntesis de BFP 4

El péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 puede sintetizarse artificialmente utilizando un método bien conocido. La síntesis del péptido se confió a Peptron Co Ltd (Corea). El péptido que tenía la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se denominó BFP 4 (péptido formador de hueso 4).

10

Phe-Phe-Lys-Ala-Thr-Glu-Val-His-Phe-Arg-Ser-Ile-Arg-Ser-

Thr (SEQ ID NO: 1)

El análisis con un programa comercial mostró que el BFP 4 está compuesto por 15 restos de aminoácidos con un peso molecular de 1826,1 y tiene una estructura de hélice alfa como se ilustra en la FIG. 1.

15

Ejemplo 2: Preparación de células osteoblásticas y medio de diferenciación osteogénica

Para uso como células osteoblásticas en este ejemplo, se sembraron células madre mesenquimatosas aisladas de células estromales de médula ósea de ratón Balb/c a una densidad de 1×10^4 células en un DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco) complementado con FBS al 10 % y se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 3 días en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

20

Se preparó un medio de diferenciación osteogénica (MDO) complementando DMEM con ácido ascórbico 50 µg/ml, dexametasona 10^{-8} M y beta-glicofosfato 10 mM.

25

Ejemplo 3: Ensayo de BFP 4 para determinar la capacidad de promover la diferenciación osteoblástica

Debido a que se deposita calcio cuando las células madre mesenquimatosas se diferencian en osteoblastos, el grado de diferenciación osteoblástica se analizó midiendo la mineralización con tinción con rojo de alizarina. Es decir, el mayor avance en la diferenciación osteoblástica produjo una región más amplia positiva para rojo de alizarina. Después de tratar las células en el medio de diferenciación osteogénica con BFP 4 en presencia de rojo de alizarina, se supervisó la tinción de rojo de alizarina para determinar el grado de diferenciación osteoblástica. A este respecto, las células mesenquimatosas se transfirieron a un medio de diferenciación osteogénica y se incubaron durante tres días. A continuación, se añadieron BFP 4 o BMP7 en concentraciones de 0,001 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,05 µg/ml y 0,1 µg/ml al medio, seguido de incubación durante 2 días adicionales. Posteriormente, las células madre mesenquimatosas se fijaron durante una hora con etanol al 70 % enfriado con hielo y se tiñeron durante aproximadamente 10 minutos con rojo de alizarina-S para analizar el grado de deposición de calcio. Los resultados se muestran en la FIG. 2.

30

35

40

Como se puede ver en la FIG. 2, la tinción más intensa se detectó en las células tratadas con BFP 4 a una concentración de 0,01 µg/ml. En particular, se descubrió que BFP 4 según la presente invención producía colores más intensos que BMP7 (FIG. 2). Estos datos indican que la actividad para diferenciación osteoblástica de BFP 4 es más potente que la de BMP7.

45

Ejemplo 4: Ensayo para determinar la citotoxicidad de BFP 4

A concentraciones eficaces para la deposición de calcio, BFP 4 se analizó para determinar su citotoxicidad. Los resultados se muestran en la FIG. 3. En este contexto, se realizó un ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un tetrazol amarillo) utilizando un kit de ensayo de proliferación celular de MTT (Cayman Chemical) según las instrucciones del fabricante.

50

Como se ve en la FIG. 3, no se detectó citotoxicidad a concentraciones de BFP 4 que son eficaces para promover la diferenciación osteogénica.

55

Ejemplo 5: Ensayo de BFP 4 para determinar la capacidad de aumentar la actividad de ALP y el nivel de calcio

Durante la diferenciación osteoblástica, se analizaron cuantitativamente fosfatasa alcalina (ALP), una enzima marcadora característica de los osteoblastos, y calcio utilizando un kit de ensayo de fosfatasa alcalina QuantiChrom DALP-250 (Gentaur) y un kit de ensayo de calcio QuantiChrom DICA-500 (Gentaur), respectivamente. Los resultados se representan en la FIG. 4.

60

Como se puede ver en la FIG. 4, tanto la actividad de ALP como la concentración de calcio aumentaron

significativamente a concentraciones de BFP 4 de 0,01 µg/ml y 0,1 µg/ml.

Ejemplo 6: Ensayo para la expresión génica específica de osteoblastos inducida por BFP 4

5 Se ensayó la capacidad de BFP 4 para inducir la expresión de genes de *runx2*, osteocalcina y fosfatasa alcalina, que son genes marcadores característicos de osteoblastos. Los resultados se muestran en la FIG. 5. A este respecto, se aisló ARN de las células tratadas con el péptido y se transcribió de forma inversa en ADN, que después se usó como molde para la PCR. La electroforesis de los productos de PCR determinó los niveles de expresión de los genes marcadores.

10

Como se muestra en la FIG. 5, BFP 4 indujo la expresión de los genes específicos de osteoblastos.

Ejemplo 7: Ensayo de la expresión de marcadores de superficie celular inducida por BFP 4 durante la diferenciación osteoblástica

15

El efecto de BFP 4 en la expresión de CD44 y CD51, proteínas de superficie que emergen característicamente durante la diferenciación de células madre mesenquimatosas en osteoblastos, se midió utilizando FACS. Los resultados se muestran en la FIG. 6.

20

Como se ve en la FIG. 6, cuando se añadió BFP 4 al medio de diferenciación osteogénico, el marcador de superficie celular CD44 se expresó a un alto nivel en las células mesenquimatosas que estaban experimentando diferenciación osteoblástica. En particular, se detectó un máximo en el nivel de expresión de CD44 a una concentración de BFP 4 de 0,1 µg/ml. Además, CD51 se expresó a niveles mayores en presencia de BFP 4 durante la diferenciación osteoblástica (FIG. 6).

25

Ejemplo 8: Ensayo para determinar la expresión inducida por BFP 4 de los marcadores de superficie celular CD44 y CD51

30

La expresión inducida por BFP 4 de los marcadores de superficie celular CD44 y CD51 se observó utilizando un microscopio de fluorescencia y los resultados se proporcionan en la FIG. 7. A este respecto, se realizó tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para determinar la viabilidad de las células durante la diferenciación osteoblástica y se utilizaron anticuerpos anti-CD44 o CD51, que aparecen cuando se unen a los antígenos, para el análisis de fluorescencia.

35

Como se puede ver en la FIG. 7, tanto CD44 como CD51 se expresaron en las células. Se observaron niveles de expresión mayores de CD44 y CD51 en el medio de diferenciación osteogénico en presencia de BFP 4.

Ejemplo 9: Ensayo *in vivo* de BFP 4 para determinar la capacidad de promover la osteogénesis *in vivo*

40

Se realizó un ensayo animal con ratones (n=6) para examinar la capacidad de BFP 4 para promover la osteogénesis *in vivo*. En primer lugar, se trataron células madre mesenquimatosas dos veces con MDO durante dos días para inducir diferenciación osteoblástica. Tras el segundo tratamiento con MDO, se añadió BMP7 o BFP 4 a las células, seguido de incubación durante 24 horas. Las células se recogieron y se trasplantaron en el mismo número en la espalda de los ratones, actuando el colágeno como armazón. Usando rayos X, se examinó la formación ósea 4 y 8 semanas después del trasplante. Los resultados se proporcionan en la FIG. 8.

45

Como se puede ver en las fotografías de rayos X de la FIG. 8, cuatro semanas después del trasplante, se formaron nuevos huesos en la región tratada con BFP 4. Además, como se ve en las fotografías tomadas 8 semanas después del trasplante, se logró un grado significativamente mayor de formación ósea en la región tratada con BFP 4 que en la tratada con BMP7. Estos resultados experimentales implican que BFP 4 tiene mayor actividad para promover la diferenciación osteoblástica en comparación con el factor BMP7 convencional y puede ser útil para la prevención y el tratamiento de osteopatías.

50

Ejemplo 10: Ensayo para determinar la expresión de VEGF inducida por BFP 4

55

Para examinar el efecto de BFP 4 en la vascularización, se ensayó BFP 4 para determinar su capacidad para inducir la expresión de VEGF. A este respecto, se aislaron proteínas de las células tratadas con el péptido y se sometieron a electroforesis antes de la medición utilizando un anticuerpo anti-VEGF.

60

Como se ve en la FIG. 9, la expresión de VEGF fue inducida por BFP 4 y a un nivel mayor que por BMP7.

Ejemplo 11: Ensayo *in vivo* para determinar la vascularización de BFP 4

65

Para examinar la capacidad de BFP 4 para formar nuevos vasos sanguíneos *in vivo*, se realizó un ensayo animal de ratón utilizando Matrigel. En este contexto, las células se trataron con el péptido y se mezclaron bien con Matrigel antes del trasplante en la espalda de los ratones. Ocho semanas después del trasplante, el Matrigel se separó de la

espalda del ratón, que después se observó con respecto a la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Como se muestra en la FIG. 10, se formaron vasos sanguíneos nuevos en el Matrigel 8 semanas después del trasplante. En particular, BFP4 indujo más vascularización que BMP7.

5

Listado de secuencias

<110> HOSPITAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHONNAM

10

<120> Péptido formador de hueso 4 para promover la osteogénesis o vascularización y uso del mismo

<130> OPP2012037KR

15

<150> KR10-2011-0054179

<151> 03-06-2011

<160> 1

20

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> El péptido formador de hueso 4 (BFP4) procede de BMP-7.

30

<400> 1

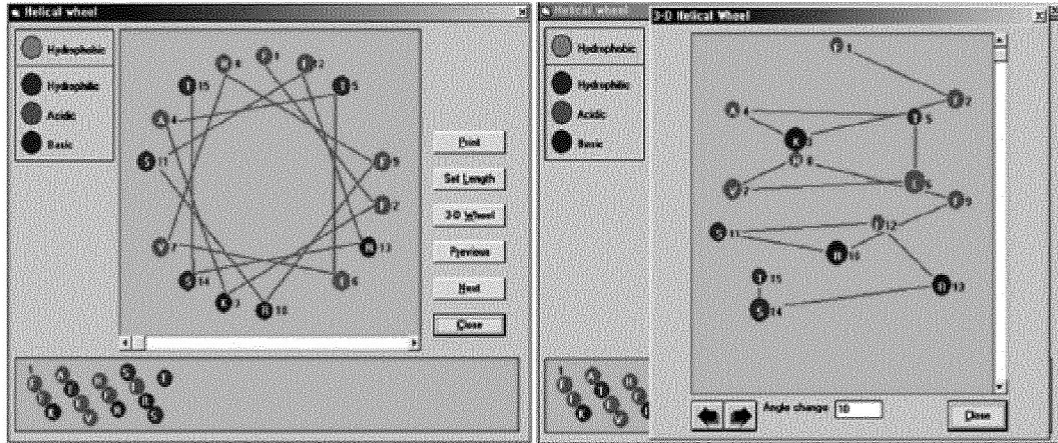
Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe Arg Ser Ile Arg Ser Thr
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido para su uso terapéutico en la promoción de la osteogénesis o vascularización, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
2. El péptido para su uso terapéutico en la promoción de la osteogénesis o vascularización según la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 procede de BMP7.
- 10 3. El péptido para su uso terapéutico en la promoción de la osteogénesis o vascularización según la reivindicación 1, que tiene una actividad de promoción de la diferenciación osteoblástica o expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
- 15 4. El péptido para su uso terapéutico en la promoción de la osteogénesis o vascularización según la reivindicación 1, que tiene una actividad de promoción de la osteogénesis y vascularización.
- 20 5. Una composición farmacéutica para su uso en la profilaxis o terapia de una osteopatía o una enfermedad isquémica, que comprende como un principio activo el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un polinucleótido que codifica dicho péptido o un vector recombinante que porta dicho polinucleótido.
6. La composición farmacéutica para su uso en la profilaxis o terapia de una osteopatía o una enfermedad isquémica según la reivindicación 5, en donde la osteopatía se selecciona del grupo que consiste en osteoporosis, artrosis, fractura ósea, osteogénesis imperfecta y una combinación de las mismas.
- 25 7. La composición farmacéutica para su uso en la profilaxis o terapia de una osteopatía o una enfermedad isquémica según la reivindicación 5, en donde la enfermedad isquémica se selecciona del grupo que consiste en necrosis isquémica, enfermedad cerebrovascular isquémica, nefropatías isquémicas, enfermedades pulmonares isquémicas, enfermedades isquémicas de las extremidades, cardiopatías isquémicas, apoplejía, infarto cerebral, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca isquémica, arterioesclerosis obstructiva y una combinación de las mismas.

[FIG. 1]

Phe-Phe-Lys-Ala-Thr-Glu-Val-His-
 Phe-Arg-Ser-Ile-Arg-Ser-Thr
 (F-F-K-A-T-E-V-H-F-R-S-I-R-S-T)



Secuencia interpretada

Código de una letra: FFKATEVHFRSIRST

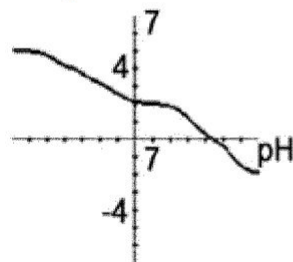
Código de tres letras: Phe-Phe-Lys-Ala-Thr-Glu-Val-His-Phe-Arg-Ser-Ile-Arg-Ser-Thr

Número de restos: 15

Peso molecular,

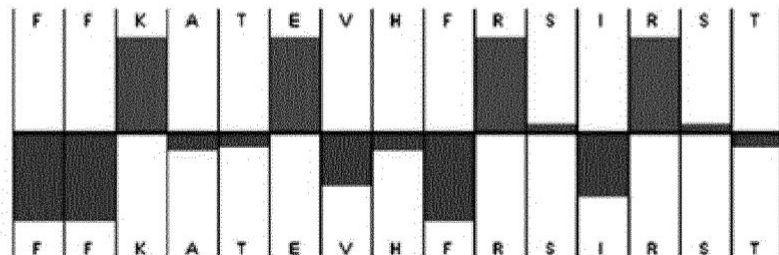
PM: 1826,1

Carga neta



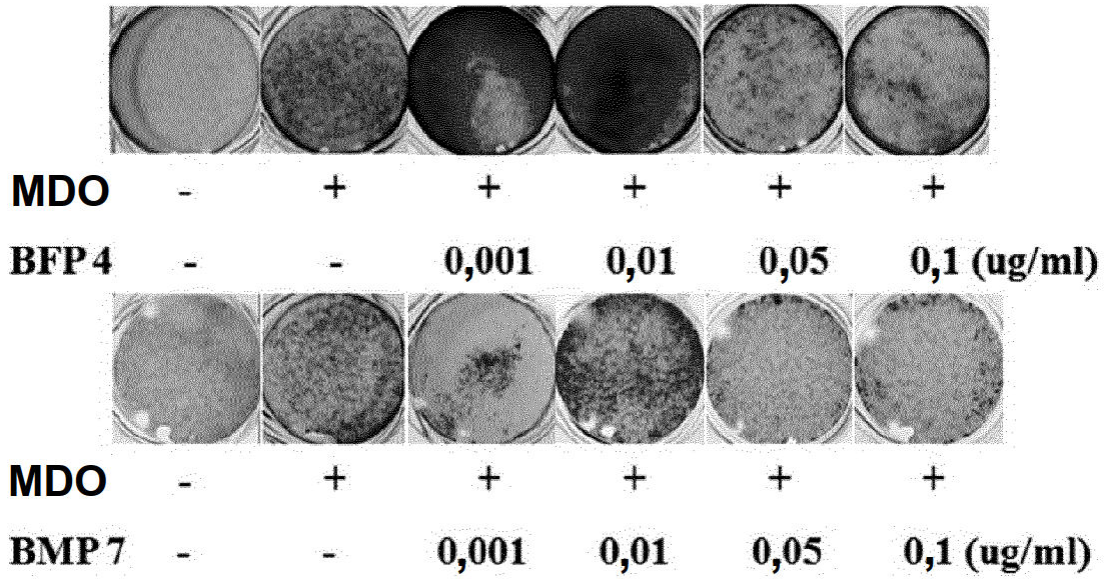
Carga neta a pH 7,0: 2,1
 Punto isoeléctrico, pI: 11,3

Hidrofilia

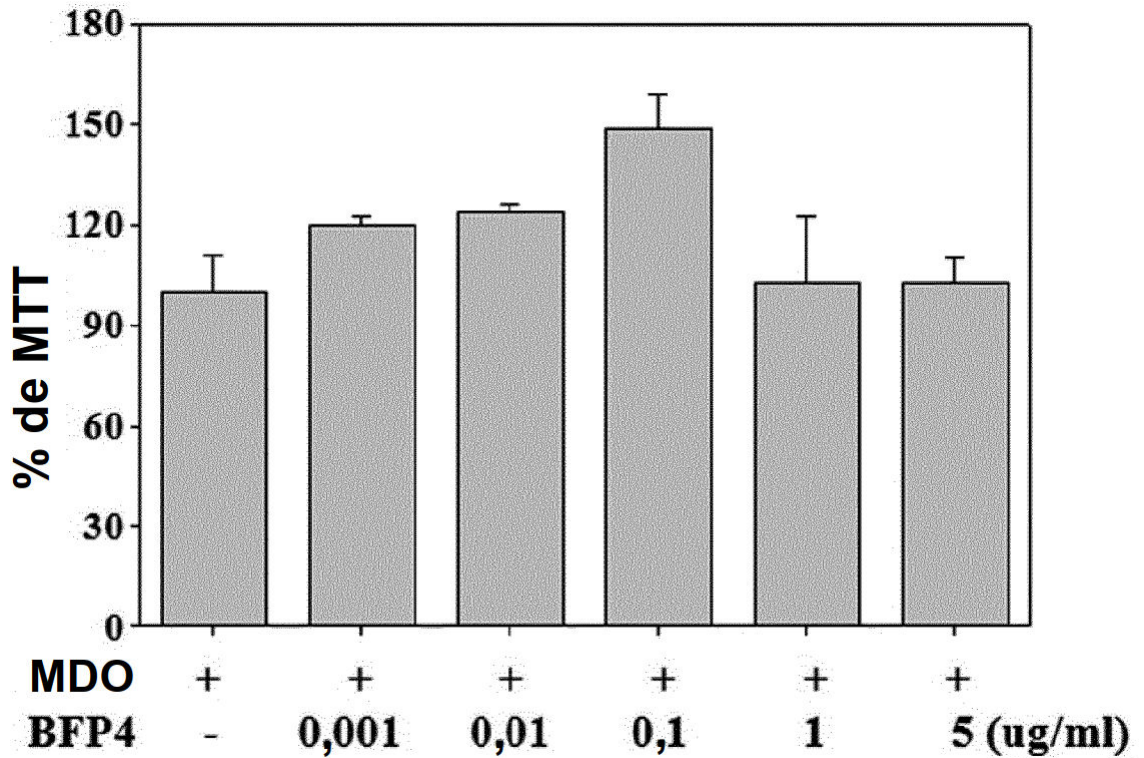


Hidrofilia promedio: 0
 Relación de restos hidrófilos/
 número total de restos: 40%

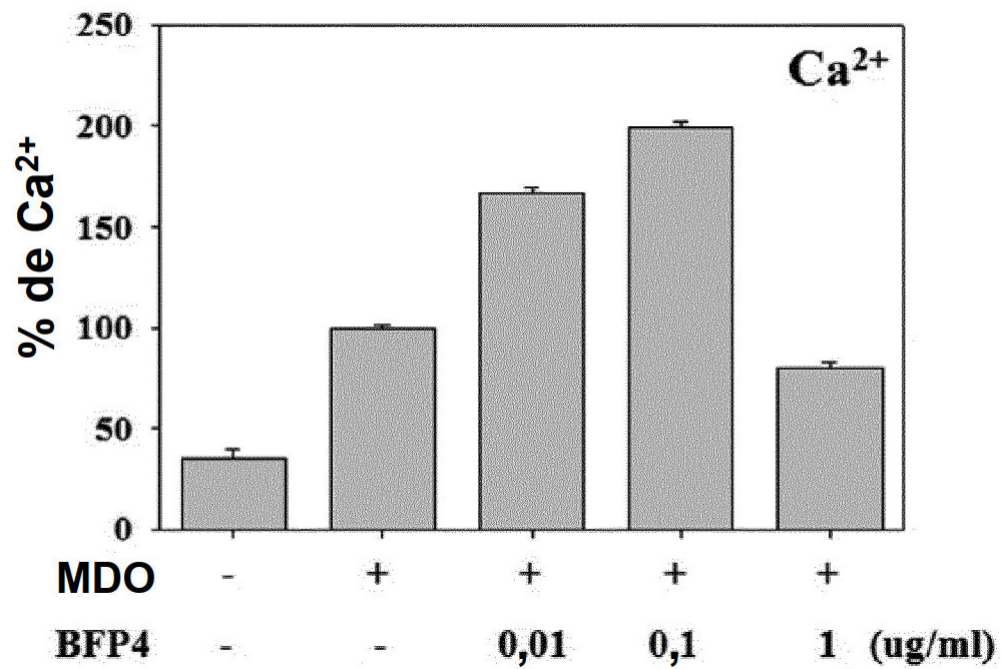
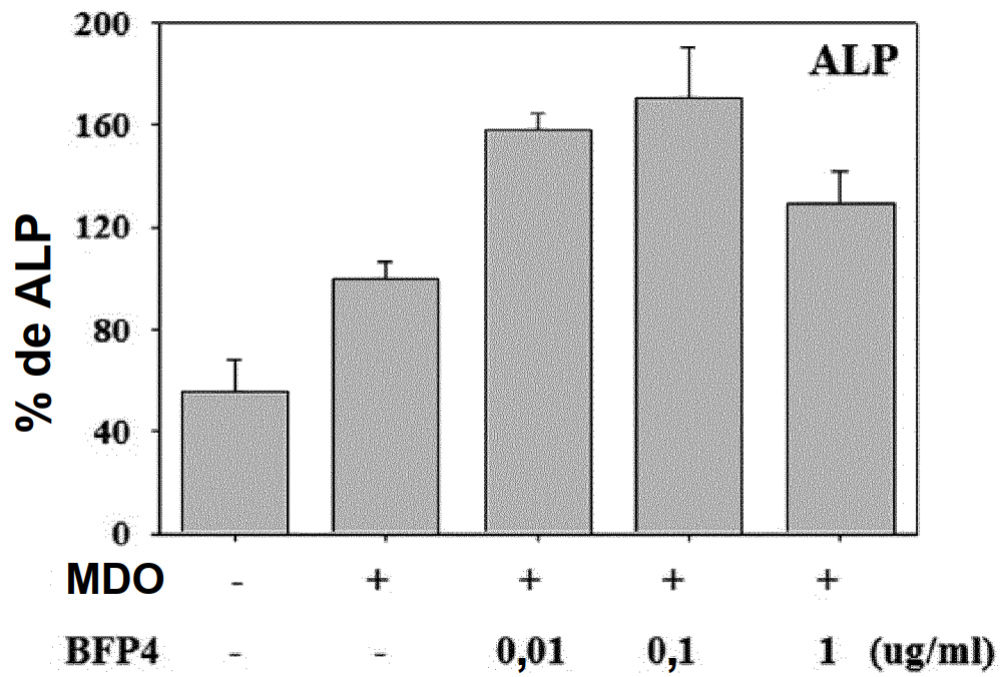
[FIG. 2]



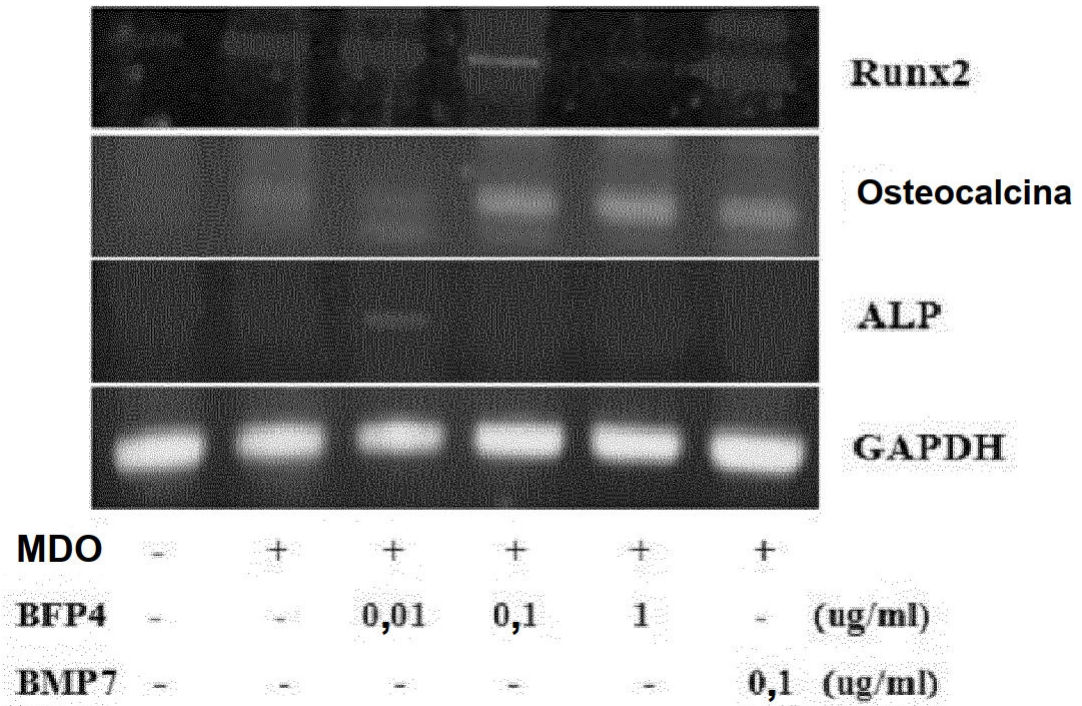
[FIG. 3]



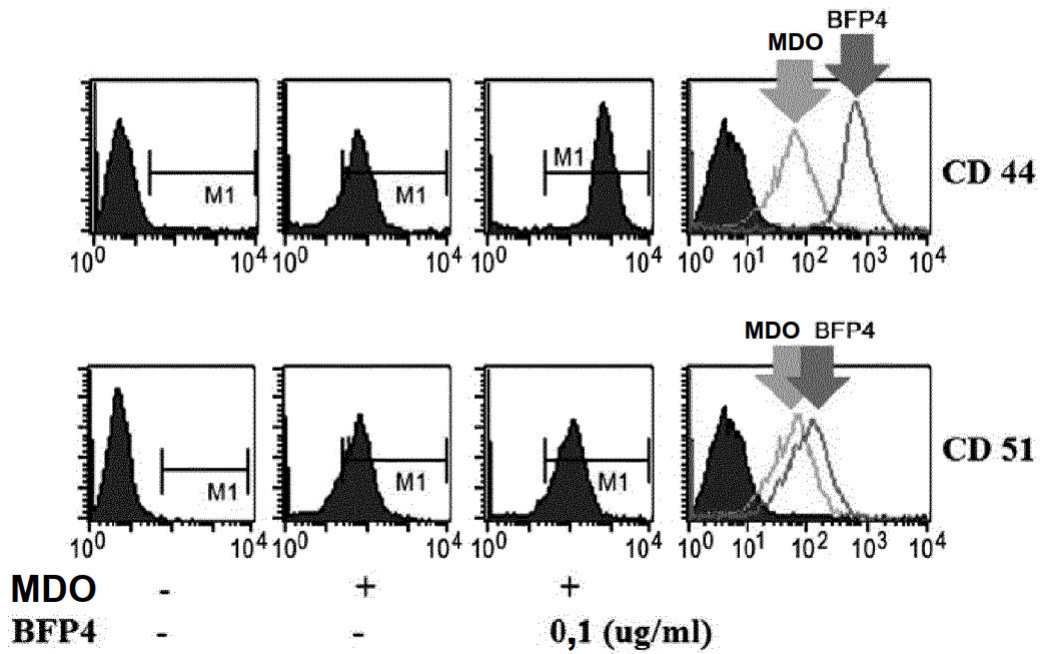
[FIG. 4]



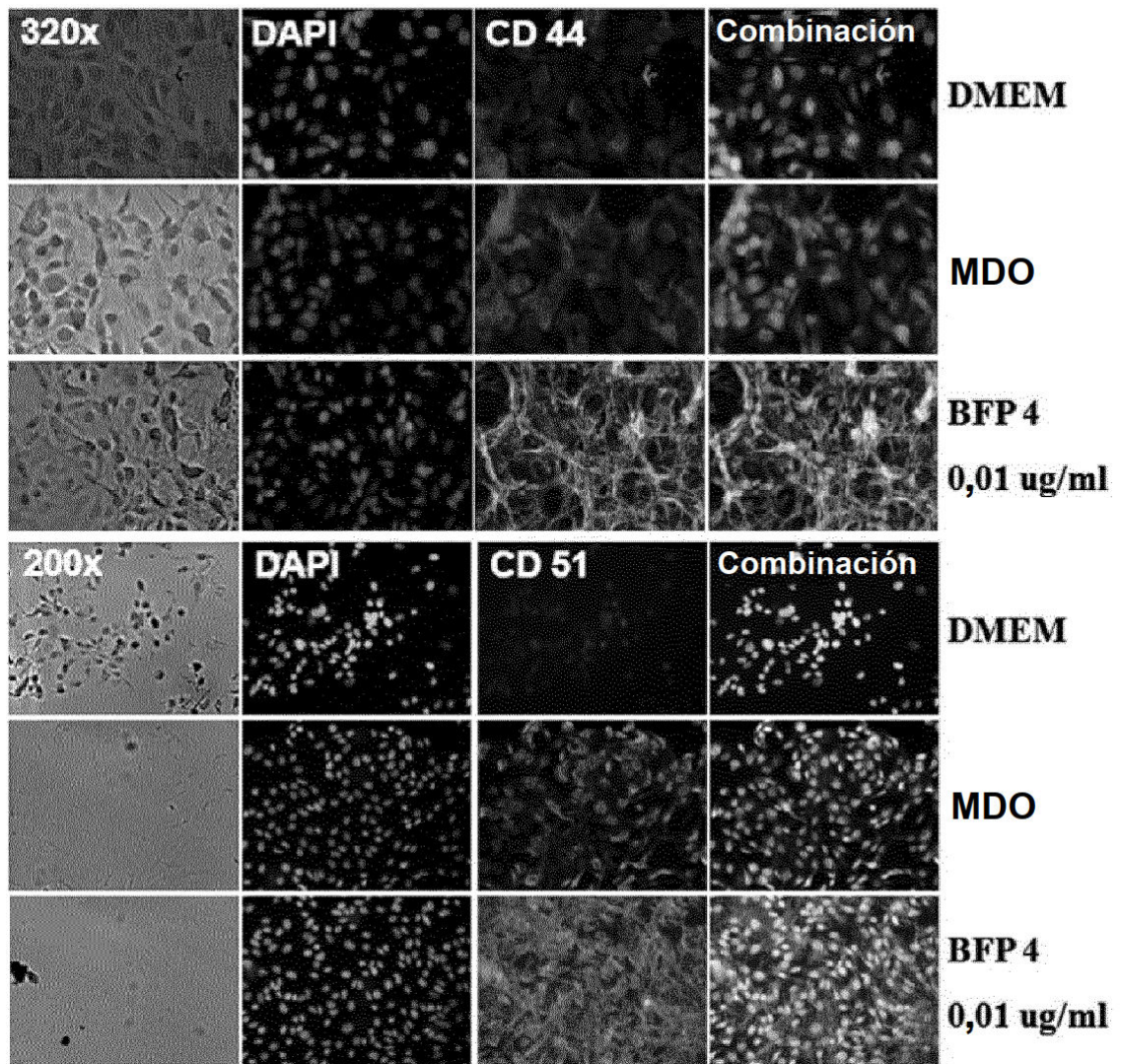
[FIG. 5]



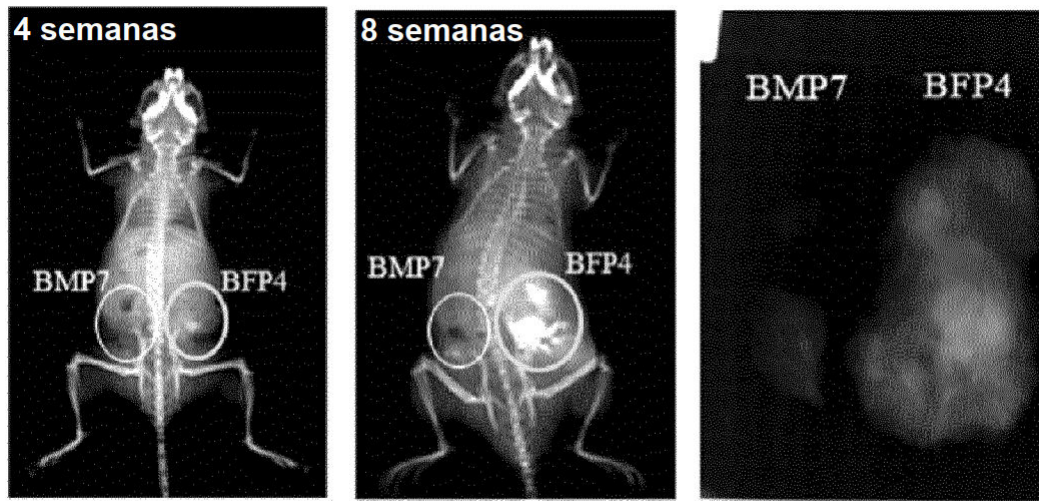
[FIG. 6]



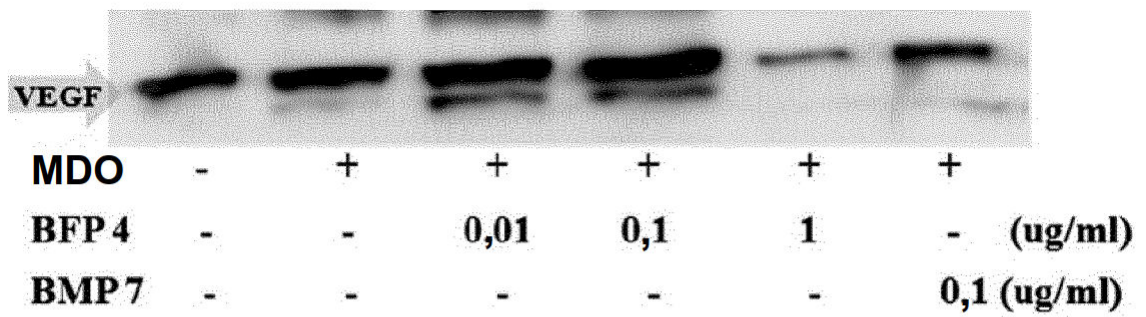
[FIG. 7]



[FIG. 8]



[FIG. 9]



[FIG. 10]

