

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 544**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2013 E 17209628 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3336101**

54 Título: **Péptido para inhibir la diferenciación de osteoclastos y uso del mismo**

30 Prioridad:

23.07.2013 KR 20130086939

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

02.03.2020

73 Titular/es:

**CAREGEN CO., LTD. (100.0%)
46-38 LS-ro 91beon-gil, Dongan-gu
Anyang-si, Gyeonggi-do 431-848, KR**

72 Inventor/es:

**CHUNG, YOUNG JI;
KIM, EUN MI;
LEE, EUNG JI;
LEE, TAE HOON y
HAN, A REUM**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 745 544 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 para inhibir la diferenciación de osteoclastos y uso del mismo

Campo técnico

La presente solicitud reivindica prioridad y el beneficio de la Solicitud de Patente Coreana N.º 10-2013-0086939 presentado en la Oficina de Propiedad Intelectual de Corea el 23 de julio de 2013.

La presente invención se refiere a un péptido para inhibir la diferenciación de osteoclastos y un uso del mismo.

Antecedentes de la técnica

La homeostasis ósea y la estructura esquelética se mantienen mediante la actividad organizada entre los osteoclastos para la resorción ósea y los osteoblastos para la formación ósea. Los osteoclastos, que son células multinucleadas, se diferencian a partir de las células madre hematopoyéticas [T. Miyamoto, O. Ohneda, F. Arai y col., Blood 98 (2001) 2544-2554]. La diferenciación en osteoclastos está regulada por el ligando RANK que se secreta por los osteoblastos y los linfocitos T activados [Y. Y. Kong, U. Feige, I. Sarosi y col., Nature 402 (1999) 304-309].

El activador del receptor del ligando de factor nuclear kappa-B (RANKL) se une a RANK, que es un receptor que está presente en el precursor de osteoclastos, y se induce la diferenciación de osteoclastos en presencia de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). RANKL activa rutas de señalización que regulan la formación de osteoclastos y la absorción de los huesos [J. Li, I. Sarosi, X. Q. Yan y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97 (2000) 1566-1571]. RANK no tiene actividad de tirosina quinasa e induce la señalización a través de proteínas adaptadoras, conocidas como factores asociados al receptor de TNF (TRAF) [L. Galibert, M.E. Tometsko, D.M. Anderson y col., J. Biol. Chem. 273 (1998) 34120-34127]. TRAF6, que es una parte de la molécula intercelular, juega un papel clave en la generación de osteoclastos y activa diversas señales corriente abajo [M.A. Lomaga, W.C. Yeh, I. Sarosi y col., Genes Dev. 13 (1999) 1015-1024]. TRAF6 se une a los dominios citoplasmáticos de RANK y después activa NF-KB y la proteína activadora-1 (AP-1) [S.L. Teitelbaum, J. Clin. Invest. 114 (2004) 463-465].

El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), que es la proteína basada en ligando TNF, se secreta en varios tipos de células incluyendo monocitos/macrófagos u osteoclastos, e induce una serie de respuestas biológicas a través de dos receptores de la superficie celular denominados TNFR1 y TNFR2 (también llamados TNFR p55 y TNFR p75, respectivamente). Tanto TNFR1 como TNFR2 inducen señales intracelulares que pueden estimular la descomposición proteolítica de kappa B (IKB), un inhibidor citoplasmático de NF-KB [Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D. y Miyamoto, S. (1995) Genes Dev. 9, 2723-2735].

El TNF- α modula un intervalo variado de respuestas, tales como inflamación, modulación inmunológica, proliferación y diferenciación celular y apoptosis [Ledgerwood, E. C., Pober, J. S. y Bradley, J. R. (1999) Lab. Invest. 79, 1041-1050]. El TNF- α también promueve la resorción ósea *in vitro* e *in vivo* [Bertolini, D. R., Nedwin, G. E., Bringman, T. S., Smith, D. D. y Mundy, G. R. (1986) Nature 319, 516-518] y puede inducir la secreción de RANKL en osteoblastos [Hofbauer, L. C., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Spelsberg, T. C., Riggs, B. L. y Khosla, S. (1999) Bone 25, 255-259]. Además, el TNF- α es crucial para la patogénesis de las destrucciones óseas y articulares que se producen en la artritis reumatoide y se ha implicado en la pérdida de hueso en la periodontitis, aflojamiento del implante ortopédico y otras formas de osteólisis inflamatoria crónica. El TNF- α está mediado por osteoclastos estimulados por lipopolisacáridos [Abu-Amer, Y., Ross, F. P., Edwards, J. y Teitelbaum, S. L. (1997) J. Clin. Invest. 100, 1557-1565]. El TNF- α juega un papel importante en la pérdida ósea inducida por deficiencia de estrógenos en la osteoporosis posmenopáusica [Cenci, S., Weitzmann, M. N., Roggia, C., Namba, N., Novack, D., Woodring, J. y Pacifici, R. (2000) J. Clin. Invest. 106, 1229-1237].

La interleucina-3 (IL-3), que es la citocina secretada principalmente por los linfocitos T activados, puede usarse como un enlace de conexión entre el sistema inmunológico y el sistema de células madre hematopoyéticas [J.W. Schrader, Interleukin-3, en: A.W. Thomson, M.T. Lotze (Eds.), Academic Press, Londres, RU, 2003, págs. 201-225]. La IL-3 actúa directamente sobre los precursores de osteoclastos de ratón y promueve la diferenciación celular en macrófagos, inhibiendo de esta manera la diferenciación de osteoclastos inducida por RANKL [S.M. Khapli, L.S. Mangashetti, S.D. Yogesha, M.R. Wani, J. Immunol. 171 (2003) 142-151]. En el precursor de osteoclastos, la IL-3 inhibe la fosforilación y degradación de IKB, evitando de esta manera la translocación nuclear de NF-KB, que se induce por RANKL. Además, la IL-3 inhibe la actividad de la c-Jun N-terminal quinasa (JNK) inducida por RANKL y regula negativamente la expresión de factores transcripcionales, c-Fos y NFATc1. La IL-3 inhibe la expresión de RANK en la etapa post-transcripcional y se confirmó que este procedimiento es irreversible, a través del experimento *in vivo* usando ratones.

Descripción detallada de la invención**Problema técnico**

Los presentes inventores se han esforzado por desarrollar un material que tenga una excelente actividad y

estabilidad en comparación con la interleucina-3 (IL-3) de origen natural a la vez que conservan las mismas funciones o funciones similares a las de la IL-3. Como resultado, los presentes inventores han seleccionado un péptido derivado de IL-3 que tiene una excelente actividad fisiológica (por ejemplo, capacidad inhibidora de la diferenciación de osteoclastos, capacidad de promoción de diferenciación osteogénica, etc.) entre una gran cantidad de péptidos candidatos y después han completado la presente invención.

Por lo tanto, Un aspecto de la presente invención es proporcionar un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para su uso en el alivio o el tratamiento de enfermedades óseas, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición para su uso en la promoción de la diferenciación osteogénica, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

También se desvela, pero no forma parte de la presente invención, un procedimiento para aliviar o tratar enfermedades óseas.

También se desvela, pero no forma parte de la presente invención, un procedimiento para promover la diferenciación osteogénica.

Otros fines y ventajas de la presente divulgación serán más obvios con la siguiente descripción detallada de la invención, las reivindicaciones y los dibujos.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Los presentes inventores se han esforzado por desarrollar un material que tenga una excelente actividad y estabilidad en comparación con la interleucina-3 (IL-3) de origen natural a la vez que conservan las mismas funciones o funciones similares a las de la IL-3. Como resultado, los presentes inventores han seleccionado un péptido derivado de IL-3 que tiene una excelente actividad fisiológica (por ejemplo, capacidad inhibidora de la diferenciación de osteoclastos, capacidad de promoción de diferenciación osteogénica, etc.) entre una gran cantidad de péptidos candidatos.

Los presentes inventores sintetizaron una pluralidad de péptidos derivados de IL-3 que exhiben las características descritas anteriormente, basado en restos implicados en funciones de IL-3 humana. Más específicamente, el péptido de la presente invención se preparó selectivamente sintetizando de forma arbitraria parcial varios restos de proteína IL-3 para buscar primero restos que puedan unirse a proteínas receptoras y después optimizar secuencias de aminoácidos de los restos predichos, y después, de estos péptidos candidatos, se exploraron los péptidos que tuvieran la actividad más excelente y de esta manera se preparó el péptido de la SEQ ID NO: 2 de la presente invención.

De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido de SEQ ID NO: 2 de la presente invención derivó de IL-3 humana (número de referencia de GenBank, AAH66275.1; SEQ ID NO: 3), que se muestran en la tabla 1. El péptido de SEQ ID NO 2 de la presente invención tiene actividad, tales como factores de crecimiento, realizando funciones similares a las de la IL-3 de origen natural para unirse a los receptores de la misma.

El péptido de la presente invención no solo tenía una fuerte capacidad inhibidora de la diferenciación de osteoclastos de una manera dependiente de la dosis, sino también promovió significativamente la diferenciación de osteoblastos (véanse las Figuras 3 a 8).

De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, el péptido de la presente invención inhibe el activador del receptor de la ruta de señalización del factor nuclear ligando kappa-B (RANKL)-RANK.

El péptido de la presente invención inhibió notablemente la activación de NF-KB mediada por RANKL y la translocación nuclear (véanse las Figuras 7a y 7b).

De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, el péptido de la presente invención inhibe la diferenciación de osteoclastos inducida por RANKL o citocinas inflamatorias, y las expresiones inducidas por RANKL o citocinas inflamatorias de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), catepsina K, o receptor TNF tipo 1 o tipo 2.

De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, las citocinas inflamatorias anteriores incluyen el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e IL-7; más específicamente, TNF- α , IL-1 β e IL-6; aún más específicamente, TNF- α e IL-1 β ; y más específicamente, TNF- α .

El péptido de la presente invención puede promover la diferenciación de osteoblastos.

De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, el péptido de la presente invención promueve las expresiones de marcadores de diferenciación de osteoblastos, tales como la osteocalcina (OCN), osteoprotegerina (OPG), sialoproteína ósea (BSP) y osteopontina (OPN).

5 Como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a una molécula en la que los restos de aminoácidos se unen entre sí a través de un enlace peptídico. Los péptidos de la presente invención pueden prepararse mediante, por ejemplo, el procedimiento sintético en fase sólida (técnicas de síntesis en fase sólida; Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart y col., Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) o el procedimiento sintético en fase líquida (Patente de EE.UU. N.º 5.516.891).

10 El péptido de la presente invención en sí mismo tiene una excelente estabilidad en comparación con la proteína IL-3 de origen natural, pero la estabilidad del mismo puede mejorarse aún más a través de la modificación de aminoácidos (véanse las Figuras 2a y 2b).

15 De acuerdo con la presente invención, el péptido de la presente invención tiene una estabilidad térmica muy excelente en comparación con la proteína IL-3 de origen natural. La proteína IL-3 de origen natural tiene una baja estabilidad de almacenamiento a largo plazo y de temperatura, es difícil de preparar y tiene un alto coste de producción. Sin embargo, el péptido de la presente invención puede producirse en masa de forma muy económica, puede prevenir el deterioro de la bioactividad tanto como sea posible debido a la estabilidad fisicoquímica del mismo a altas temperaturas y tiene efectos terapéuticos aún más mejorados al aumentar el período restante *in vivo* e *in vitro*. Por lo tanto, el péptido de la presente invención puede aplicarse favorablemente a productos que requieran un almacenamiento a largo plazo, tales como medicamentos, cuasi medicamentos y cosméticos.

20 De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, un grupo protector, que se selecciona del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenil metoxycarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y un polietilenglicol (PEG), pueden estar enlazados al N o C terminal de los péptidos.

25 La modificación de aminoácidos anterior mejora significativamente la estabilidad de los péptidos de la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "estabilidad" se refiere a la estabilidad de almacenamiento (por ejemplo, estabilidad a temperatura ambiente) así como a estabilidad "*in vivo*". El grupo protector anterior protege los péptidos de la presente invención del ataque de enzimas de escisión de proteínas *in vivo*.

30 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el alivio o tratamiento de enfermedades óseas, conteniendo la composición el péptido anterior como un principio activo, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona una composición para su uso en un procedimiento para promover la diferenciación osteogénica, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, conteniendo la composición el péptido como un principio activo.

35 Como la composición de la presente invención contiene los péptidos relacionados con IL-3 anteriores de la presente invención como un principio activo, las descripciones de los contenidos superpuestos entre las dos se omiten para evitar una complejidad excesiva de la memoria descriptiva debido a las descripciones repetitivas de las mismas.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedades óseas" se refiere a enfermedades, trastornos o afecciones asociados a la señalización mediada por RANKL e incluye enfermedades, trastornos, afecciones relacionadas con la regulación de la formación y resorción ósea, así como trastornos de reducción de masa ósea, incluyendo la reducción de la masa ósea, osteoporosis y osteólisis.

45 De acuerdo con una cierta realización de la presente invención, las enfermedades óseas, que pueden aliviarse o tratarse mediante la composición farmacéutica de la presente invención, incluyen osteoporosis, osteoporosis infantil, osteogénesis imperfecta, osteomalacia, necrosis ósea, raquitismo, osteomielitis, pérdida de hueso alveolar, enfermedad de Paget, hipercalcemia, hiperparatiroidismo primario, enfermedades óseas metastásicas, mieloma, pérdida ósea en artritis reumatoide, pérdida ósea resultante de cánceres, displasia fibrosa, enfermedad ósea aplásica, enfermedades metabólicas óseas o pérdida ósea con la edad, pero no se limitan a los mismos.

La composición de la presente invención puede usarse como una composición farmacéutica que contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido anterior que exhibe actividad de proteína IL-3, de la presente invención; y (b) una sal farmacéuticamente aceptable.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para lograr la efectividad o actividad del péptido relacionado con IL-3 anterior.

55 El vehículo farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente invención se usa convencionalmente para la formulación y los ejemplos de los mismos pueden incluir, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma acacia, fosfato cálcico, alginato, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo,

hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener además un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante y similares, además de los ingredientes anteriores. Los vehículos y preparaciones farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral y los ejemplos de la administración parenteral pueden incluir inyecciones intravenosas, subcutáneas, intramusculares, intraperitoneales, locales y transdérmicas.

La dosis apropiada de la composición farmacéutica de la presente invención varía dependiendo de factores, tales como el procedimiento de formulación, la forma de administración, la edad del paciente, el peso corporal, el sexo, la morbilidad y la comida, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la sensibilidad de respuesta. Un profesional experto puede determinar y prescribir fácilmente la dosis que sea eficaz para el tratamiento o prevención deseados. De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, la dosis diaria de la composición farmacéutica de la presente invención es 0,0005-1.000 mg/kg.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención se formula en una forma de dosificación unitaria o en un recipiente multidosis, usando un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con el procedimiento que se lleva a cabo fácilmente por una persona experta en la materia a la que pertenece la presente invención. Aquí, la forma de dosificación puede ser una solución en un medio oleaginoso o acuoso, una suspensión, una emulsión, un extracto, un polvo, gránulos, un comprimido, una cápsula o un gel (por ejemplo, un hidrogel), y puede incluir además un dispersante o estabilizador.

La composición de la presente invención puede usarse como una composición cosmética que contiene: (a) una cantidad cosméticamente eficaz del péptido derivado de IL-3 anterior; y (b) un vehículo cosméticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad cosméticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para alcanzar la efectividad de la composición de la presente invención descrita anteriormente.

La composición cosmética de la presente invención puede formularse en cualquier forma de dosificación que se prepare convencionalmente, y los ejemplos de la misma pueden incluir una solución, una suspensión, una emulsión, una pasta, un gel, una crema, una loción, un polvo, un jabón, un limpiador que contiene tensioactivo, un aceite, una base en polvo, una base de emulsión, una base de cera y un pulverizador, pero no se limitan a los mismos. Más específicamente, la composición cosmética de la presente invención puede prepararse en una forma de dosificación de una loción emoliente, emulsión nutricional, crema nutricional, crema de mensaje, esencia, crema para ojos, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, paquete facial, pulverizador o polvo.

En los casos en los que la forma de dosificación de la presente invención es una pasta, una crema o un gel, el componente vehículo del mismo puede incluir fibras animales, fibras vegetales, cera, parafina, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicol, silicona, bentonita, sílice, talco u óxido de zinc.

En los casos en que la dosificación de la presente invención es un polvo o un aerosol, el componente vehículo del mismo puede incluir lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio o un polvo de poliamida. En los casos en los que la forma de dosificación de la presente invención es especialmente un pulverizador, la forma de dosificación puede incluir adicionalmente un propulsor, tales como, clorofluorohidrocarbano, propano/butano o dimetil éter.

En los casos en los que la forma de dosificación de la presente invención es una solución o una emulsión, el componente vehículo del mismo puede incluir un disolvente, un solubilizante o un emulsionante, por ejemplo agua, etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, aceite de 1,3-butilglicol, ésteres grasos de glicerol, polietilenglicol o ésteres de ácido graso de sorbitán.

En los casos en los que la forma de dosificación de la presente invención es una suspensión, el componente vehículo del mismo puede incluir diluyentes líquidos, tales como agua, etanol y propilenglicol; agentes de suspensión, tales como, alcohol isoestearílico etoxilado, éster de polioxietilen sorbitol y éster de polioxietilen sorbitano; celulosa microcristalina; hidróxido de metal aluminio; bentonita; agar; o tragacanto.

En los casos en los que la forma de dosificación de la presente invención es un limpiador que contiene tensioactivo, el componente vehículo del mismo puede incluir sulfato de alcohol alifático, éter sulfato de alcohol alifático, monoéster de sulfosuccinato, isotinato, derivados de imidazolio, taurato de metilo, sarcosinato, éter sulfato de amida de ácido graso, alquil amido betaína, alcohol alifático, glicérido de ácido graso, dietanolamida de ácido graso, aceite vegetal, derivados de lanolina o éster de ácido graso de glicerol etoxilado.

Los componentes contenidos en la composición cosmética de la presente invención incluyen composiciones que se usan comúnmente en la composición cosmética, además de los péptidos, como principios activos, y el componente vehículo de los mismos, y por ejemplo, puede incluir adyuvantes comunes, tales como un antioxidante, un estabilizante, un solubilizante, vitaminas, un pigmento y un sabor.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para aliviar o tratar enfermedades óseas, incluyendo el procedimiento administrar a un sujeto una composición que contiene el péptido anterior como principio activo.

- 5 De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un procedimiento para promover la diferenciación osteogénica, incluyendo el procedimiento poner en contacto las células con una composición que contiene el péptido anterior como principio activo.

Ya que el procedimiento de la presente invención usa la composición descrita anteriormente, las descripciones de los contenidos superpuestos entre las dos se omiten para evitar una complejidad excesiva de la memoria descriptiva debido a las descripciones repetitivas de las mismas.

10 **Efectos ventajosos**

Las características y ventajas de la presente invención se resumen como sigue:

- (i) Los péptidos de la presente invención pueden ejercer las mismas funciones o similares a la interleucina-3 (IL-3) de origen natural y tienen una penetración muy excelente en la piel debido al pequeño tamaño de los mismos.
- 15 (ii) Los péptidos de la presente invención inhiben la activación y la translocación nuclear de NF-KB a través de la inhibición del activador del receptor de la ruta de señalización del factor nuclear ligando kappa-B (RANKL)-RANK, e inhiben la expresión de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), cathepsina K, o receptor TNF tipo 1 o tipo 2, inducida por RANKL o citocinas inflamatorias, inhibiendo de esta manera la diferenciación de osteoclastos, de manera dependiente de la concentración.
- 20 (iii) Además, los péptidos de la presente invención pueden contribuir a la diferenciación de osteoblastos promoviendo las expresiones de marcadores de diferenciación de osteoblastos, tales como la osteocalcina (OCN), osteoprotegerina (OPG), sialoproteína ósea (BSP) y osteopontina (OPN).
- (iv) Por lo tanto, la excelente actividad y estabilidad del péptido de la presente invención puede aplicarse muy favorablemente a medicinas, cuasi medicamentos y cosméticos.

Breve descripción de los dibujos

- 25 La Figura 1 ilustra gráficos que muestran resultados de ensayos de cromatografía en fase líquida de alto rendimiento de péptidos de SEQ ID NO: 1 (Figura 1a) y SEQ ID NO: 2 (Figura 1b) preparados mediante el ejemplo sintético 1 de la presente invención (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención).
- La Figura 2 ilustra gráficos que muestran resultados de pruebas de estabilidad de péptidos de SEQ ID NO: 1 (Figura 2a) y SEQ ID NO: 2 (Figura 2b) preparados mediante el ejemplo sintético 1 de la presente invención (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención).
- 30 La Figura 3 ilustra los efectos inhibitorios de la diferenciación de osteoclastos mediante el tratamiento con un péptido de SEQ ID NO: 1 (Figura 3a) y un péptido de SEQ ID NO: 2 (Figura 3b), preparados mediante el ejemplo sintético de la presente invención (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención).
- La Figura 4 ilustra el efecto inhibidor sobre la enzima promotora de diferenciación de osteoclastos mediante el tratamiento con un péptido de SEQ ID NO: 1 (Figura 4a) y un péptido de SEQ ID NO: 2 (Figura 4b), preparados mediante el ejemplo sintético de la presente invención (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención).
- 35 La Figura 5 ilustra los efectos inhibitorios sobre el ARNm de los marcadores de diferenciación de osteoclastos, TRAP y Cathepsina, por un péptido de SEQ ID NO: 1 (Figura 5a) y un péptido de SEQ ID NO: 2 (Figura 5b), preparados mediante el ejemplo sintético de la presente invención (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención).
- 40 La Figura 6 ilustra los efectos inhibitorios sobre el ARNm de los receptores de TNF tipo 1 y tipo 2 mediante el tratamiento con un péptido de SEQ ID NO: 1 (Figura 6a) y un péptido de SEQ ID NO: 2 (Figura 6b), preparados mediante el ejemplo sintético de la presente invención (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención).
- La Figura 7 ilustra los efectos inhibitorios de la señal de RANKL mediante el tratamiento con un péptido de SEQ ID NO: 1 (Figura 7a) y un péptido de SEQ ID NO: 2 (Figura 7b), preparados mediante el ejemplo sintético de la presente invención (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención).
- 45 La Figura 8 ilustra los resultados de promoción de diferenciación de osteoblastos mediante el tratamiento con un péptido de SEQ ID NO: 1 (Figura 8a) y un péptido de SEQ ID NO: 2 (Figura 8b), preparados mediante el ejemplo sintético de la presente invención (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención).
- 50 La Figura 9 ilustra que el tratamiento con un péptido de SEQ ID NO: 1 (Figura 9a) y un péptido de SEQ ID NO: 2 (Figura 9b), preparado mediante un ejemplo sintético de la presente invención, aumentó la expresión de p-Smad1/5/8, que es una señal BMP2 (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención).

Modo para llevar a cabo la invención

- 55 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los ejemplos. Estos ejemplos son solo para ilustrar la presente invención más específicamente, y será evidente para aquellos expertos en la materia que el ámbito de la presente invención no está limitado por estos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo sintético 1: Síntesis de Asn-Cys-Ser-Asn-Met-Ile-Cys-Glu-Ile-Ile-Thr-His (SEQ ID NO:1, no forma parte de la presente invención).

A 700 mg de resina de cloruro de cloro tritilo (resina CTL, Nova Biochem N.º de Cat 01-64-0021) introducida en un reactor se añadieron 10 ml de cloruro de metileno (MC), seguido de agitación durante 3 minutos. Después de retirar la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF), seguido de agitación durante 3 minutos y después se retiró de nuevo el disolvente. Se pusieron 10 ml de una solución de diclorometano (DCM) en el reactor y se añadieron 200 mmol de Fmoc-L-His (Trt)-OH (Bachem, Swiss) y 400 mmol de diisopropil etilamina (DIEA), después de lo cual la mezcla se disolvió bien con agitación y después la reacción se llevó a cabo con agitación durante 1 hora. Después de la reacción, el material resultante se lavó y se disolvieron metanol y DIEA (2:1) en DCM, seguido de una reacción durante 10 minutos y después el material resultante se lavó con una cantidad excesiva de DCM/DMF (1:1). Después de retirar la solución, se añadieron 10 ml de DMF, seguido de agitación durante 3 minutos y después se retiró de nuevo el disolvente. Se pusieron 10 ml de una solución de desprotección (piperidina al 20 %/DMF) en el reactor, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se retiró la solución. Se añadió la misma cantidad de solución de desprotección y después la reacción se mantuvo nuevamente durante 10 minutos, seguido de la retirada de la solución. El material resultante se lavó dos veces con DMF, una vez con MC y una vez con DMF, durante 3 minutos cada uno, preparando de esta manera la resina His(Trt)-CTL. Se pusieron 10 ml de una solución de DMF en un nuevo reactor y se añadieron 200 mmol de Fmoc-Thr(tBu)-OH (Bachem, Suiza), 200 mmol de HoBt y 200 mmol de Bop, y la mezcla se disolvió bien mediante agitación. Se pusieron 400 mmol de N,N-diisopropiletilamina (DIEA) por división dos veces en el reactor y después la agitación se llevó a cabo durante al menos 5 minutos hasta que se disolvieron todos los sólidos. La solución mixta de aminoácidos disueltos se puso en el reactor que contenía la resina desprotegida, seguido de una reacción con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de retirar el líquido de reacción, la agitación se llevó a cabo usando una solución de DMF tres veces durante 5 minutos cada una, seguido de la eliminación. Se tomó una pequeña cantidad de la resina reaccionada para verificar el grado de reacción mediante la prueba de Kaiser (prueba de Ninhidrina). Usando la solución de desprotección, la reacción de desprotección se llevó a cabo dos veces de la misma manera que se describió anteriormente, para producir la resina Thr(tBu)-His(Trt)-CTL. Después de lavar con DMF y MC, se realizó nuevamente la prueba de Kaiser y después se realizó la siguiente prueba de fijación de aminoácidos de la misma manera que se describió anteriormente. Basado en la secuencia de aminoácidos seleccionada, la reacción en cadena se realizó en el orden de Fmoc-Ile, Fmoc-Ile, Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Ile, Fmoc-Met, Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Cys(Trt) y Fmoc-Asn(Trt). El grupo protector de Fmoc se retiró haciendo reaccionar dos veces con la solución de desprotección durante 10 minutos cada uno y después realizando bien el lavado. Se añadieron anhídrido acético, DIEA e hidroxibenzotriazol (HoBt) para dirigir la acetilación durante 1 hora y después la resina de peptidilo preparada se lavó tres veces secuencialmente con DMF, MC y metanol, se secó bajo el flujo de gas nitrógeno y se secó completamente al vacío en pentóxido de fósforo (P₂O₅). Se añadieron 30 ml de una solución de salida [95 % de ácido trifluoroacético (TFA), agua destilada al 2,5 % y tioanisol al 2,5 %] y la reacción se mantuvo durante 2 horas mientras la mezcla se agitaba intermitentemente a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con una pequeña cantidad de solución y después se mezcló con una solución madre. La destilación se realizó a presión reducida para reducir el volumen total a la mitad y después se añadieron 50 ml de éter frío para inducir la precipitación. En lo sucesivo, los precipitados se recogieron por centrifugación, seguido de lavado dos veces con éter frío. Después se retiró la solución madre, seguido de un secado suficiente en atmósfera de nitrógeno, sintetizando de esta manera 0,5 g de péptido 1 no purificado, NH₂-Asn-Cys-Ser-Asn-Met-Ile-Cys-Glu-Ile-Ile-Thr-His-OH (rendimiento: 89,9 %). El peso molecular se determinó como 1375,4 Da (valor teórico: 1377,6 Da) mediante el uso de un sistema de análisis de peso molecular (Figura 1a). El péptido de la presente invención que consiste en SEQ ID NO: 2 (NH₂-Arg-Arg-Lys-Leu-Thr-Phe-Tyr-Leu-Lys-Thr-Leu-Glu-OH) también se sintetizó por el mismo procedimiento (rendimiento: 92,1 %). El peso molecular se determinó como 1568,5 Da (valor teórico: 1567,9 Da) mediante el uso de un sistema de análisis de peso molecular (Figura 1b).

[Tabla 1]

Secuencias y pesos moleculares de péptidos sintetizados			
N.º	Secuencia de aminoácidos	Valor de análisis (Espectrómetro de masas)	
		Valor analítico	Valor teórico
IL-3-1	Asn-Cys-Ser-Asn-Met-Ile-Cys-Glu-Ile-Ile-Thr-His	1375,4	1377,6
IL-3-2	Arg-Arg-Lys-Leu-Thr-Phe-Tyr-Leu-Lys-Thr-Leu-Glu	1568,5	1567,9

Ejemplo de prueba 1: Estabilidad térmica de los péptidos preparados

Se preparó una solución tampón de fosfato de 0,1 mg/ml a partir del péptido de SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención) o SEQ ID NO: 2, sintetizado en el ejemplo sintético 1, y el factor de crecimiento patrón (IL-3) adquirido de NIBSC (Reino Unido). Se colocó 1 ml de la solución preparada en cada vial de vidrio y se dejó reposar a 37 °C. La solución que se mantuvo a 37 °C se muestreó los días 0, 1, 3, 5, 10, 20 y 40, y se centrifugó durante cada día para retirar los péptidos o proteínas desnaturalizados. Se tomó el sobrenadante y se realizó la cuantificación usando HPLC (Figuras 2a y 2b, respectivamente).

Ejemplo de prueba 2: Verificación de los efectos inhibitorios de diferenciación de osteoclastos usando péptidos sintéticos

Con el fin de analizar la acción similar a IL-3 y la acción inhibitoria de los péptidos de SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención) y SEQ ID NO: 2, sintetizado en el ejemplo sintético 1, la tinción de TRAP se realizó usando la cepa Raw264.7 diferenciable en osteoclastos mientras se hace referencia a procedimientos, tales como la tinción con fosfatasa ácida resistente a tartrato (Rizzino, y col. Cancer Res. 48:4266(1988)).

Las líneas celulares Raw264.7 (ATCC) se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco, EE.UU.) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS, Sigma) usando cada uno un matraz de 250 ml para cultivo de tejidos. Las líneas celulares cultivadas se despegaron cuidadosamente del fondo del recipiente de cultivo usando una pipeta, seguido de centrifugación, para obtener solamente precipitados celulares. Los precipitados celulares se resuspendieron en medio de cultivo DMEM suplementado con FBS al 10 % y después se añadieron a una placa de 46 pocillos para placa de cultivo de tejidos a 1×10^4 células por cada pocillo. Para la inducción de la diferenciación, la muestra del blanco y las células RAW264.7 se trataron con 10 ng/ml de RANKL, 50 ng/ml de TNF- α y 1 μ g/ml o 10 μ g/ml de péptidos sintetizados disueltos en agua destilada al 10 % en un estado estéril y después se cultivaron al 5 % de CO₂ a 37 °C durante 72 horas. Después de 72 horas, el medio se cambió con el mismo líquido de cultivo y después la muestra del blanco y las células se trataron con 10 ng/ml de RANKL, 50 ng/ml de TNF- α y 1 μ g/ml o 10 μ g/ml de péptidos sintetizados y después se cultivaron en las mismas condiciones durante 48 horas. Después de completar el cultivo durante un total de cinco días, se retiró la capa superior. Para la fijación celular, se preparó un tampón de fijación que contiene 25 ml de una solución de citrato, 65 ml de acetona y 8 ml de formaldehído al 37 %. Las células se fijaron con el tampón de fijación durante 30 segundos y después se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). La solución de lavado se retiró y las células se tñieron con el kit de fosfatasa alcalina de leucocitos (Sigma, EE.UU.).

La Figura 3 ilustra los resultados inhibitorios de la diferenciación de células Raw264.7, de los cuales la diferenciación puede inducirse por RANKL y TNF- α , por IL-3-1 (Figura 3a) e IL-3-2 (Figura 3b) (IL-3-1 no forma parte de la presente invención). Como se muestra en la Figura 3b, el péptido de la presente invención puede inhibir la diferenciación inducida por RANKL y TNF- α de Raw264.7 en osteoclastos.

Ejemplo de prueba 3: Verificación de los efectos inhibitorios de diferenciación de osteoclastos usando péptidos sintéticos

Las células Raw264.7 se trataron en combinación con 10 ng/ml de RANKL, 50 ng/ml de TNF- α , o 1 o 10 μ g/ml del péptido sintetizado en el ejemplo sintético 1 para inducir la diferenciación durante cinco días y después se probó el grado de inhibición de la actividad de TRAP, un marcador de diferenciación de osteoclastos. Después del cultivo, se retiró el líquido de cultivo y después se añadieron 100 μ l de un tampón de lisis (tampón tris 20 mM, 3 % de triton X-100) para romper las paredes celulares. Se prepara una solución de reacción a partir de 500 μ l de una solución de citrato (ácido cítrico 18 mM, cloruro sódico 9 mM, tensioactivo 12 mM; pH 3,5), 50 μ l de una solución de tartrato y 500 μ l de un sustrato de fosfato 20 mM. Se añadieron 100 μ l del lisado y 100 μ l de la solución de reacción en la misma cantidad y después la reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 30 minutos. Para el análisis colorimétrico, la absorbancia se determinó a 405 nm utilizando un espectrofotómetro. Se validó que, en los casos en los que el tratamiento con el péptido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 junto con RANKL y TNF- α , los péptidos inhibieron la actividad de TRAP, que es un marcador de diferenciación de osteoclastos, de manera dependiente de la concentración (Figuras 4a y 4b) (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención).

Ejemplo de prueba 4: Verificación del efecto inhibitorio sobre el ARNm marcador de diferenciación de osteoclastos usando péptidos sintéticos

Las células Raw264.7 se trataron en combinación con 10 ng/ml de RANKL, 50 ng/ml de TNF- α , o el péptido de 1 o 10 μ g/ml sintetizado en el ejemplo sintético 1 para inducir la diferenciación durante cinco días y después se analizó el grado de inhibición de la expresión de ARNm de cathepsina K. Las figuras 5a y 5b muestran que los niveles de ARNm de cathepsina K se redujeron por el tratamiento con el péptido de la presente invención, respectivamente (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención). Además, las figuras 6a y 6b verifican que los niveles de expresión de ARNm de los receptores de TNF tipo 1 y tipo 2, que se han aumentado por el tratamiento con RANKL o TNF- α , se redujeron por el tratamiento con el péptido de la presente invención (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención). Las secuencias de cebador específicas de diana usadas en la PCR fueron las siguientes: Secuencia de cebador directo de TRAP, 5'-AAATCACTCTTTAAGAACAG-3' y secuencia de cebador inverso de TRAP, 5'-

TTATTGAATAGCAGTGACAG-3' (temperatura de hibridación, 45 °C); secuencia de cebador directo de cathepsina K, 5'-CCTCTCTTGGTGTCCATACA-3' y secuencia de cebador inverso de cathepsina K, 5'-ATCTCTCTGTACCCTCTGCA-3' (temperatura de hibridación, 53 °C); Secuencia de cebador directo de GAPDH, 5'-GGTGTGAACGGATTGGCCGTATTG-3' y secuencia de cebador inverso de GAPDH, 5'-CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGT-3' (temperatura de hibridación, 55 °C); secuencia de cebador directo del receptor de TNF tipo 1, 5'-acctttacgggtcccgaa-3' y secuencia de cebador inverso del receptor de TNF tipo 1, 5'-tccttacagccacacaccgt-3' (temperatura de hibridación, 55 °C); secuencia de cebador directo del receptor de TNF tipo 2, 5'-aggctggaaagccctaact-3' y secuencia de cebador inverso del receptor de TNF tipo 2, 5'-atgggggtactggagacagg-3' (temperatura de hibridación, 55 °C); y secuencia de cebador directo de actina, 5'-CGTGGGCCGCCCTAGGCA-3' y secuencia de cebador inverso de actina, 5'-TTGGCTTAGGGTTCAGGGG-3' (temperatura de hibridación, 55 °C).

Por lo tanto, los péptidos de la presente invención pueden inhibir todos de TRAP, cathepsina K y receptores de TNF tipo 1 y tipo 2, que se aumentan por RANKL y TNF- α (Figuras 5a y 5b y Figuras 6a y 6b) (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención).

Ejemplo de prueba 5: Verificación de la inhibición de la señal RANKL por péptidos sintéticos

Las células Raw264.7 se trataron con los péptidos sintetizados en el ejemplo sintético 1 y después de 30 minutos, se comprobó la translocación nuclear de NF-KB, que es una señal representativa de la proteína RANKL. El efecto de cada péptido se verificó mediante transferencia Western usando anticuerpo policlonal contra NF-KB (N.º de Cat. sc-372, SantaCruz, EE.UU.). El tratamiento con los péptidos de la presente invención confirmó la activación y la translocación nuclear de NF-KB (Figuras 7a y 7b) (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención). La fosforilación de c-Jun, que es otra señal representativa de la proteína RANKL, y la translocación nuclear del c-Jun fosforilado se confirmaron. El efecto de cada péptido se verificó mediante transferencia Western usando anticuerpos policlonales contra fosfo-c-Jun (N.º de Cat. sc-1694, SantaCruz, EE.UU.) (Figuras 7a y 7b) (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención).

Considerando los resultados de las pruebas de los ejemplos de prueba 1 a 5, los péptidos de la presente invención inhiben la diferenciación de osteoclastos de manera muy eficaz mediante la inhibición de la activación de la señalización de RANKL-RANK.

Ejemplo de prueba 6: Verificación sobre la promoción del gen marcador de diferenciación osteogénica por péptidos sintéticos

Las células MC3T3-E1 se trataron con 10 o 50 μ g/ml de los péptidos sintetizados en el ejemplo sintético 1 para inducir la diferenciación durante dos días y se llevaron a cabo las pruebas para verificar la expresión de ARNm de los marcadores de diferenciación de osteoblastos, tales como la osteocalcina (OCN), osteoprotegerina (OPG), sialoproteína ósea (BSP) y osteopontina (OPN). Las secuencias de cebador específicas de diana usadas en la PCR fueron las siguientes: Secuencia de cebador directo de OCN, 5'-gcgctctgtctcttgacct-3' y secuencia de cebador inverso de OCN, 5'-ttgttaggcggtcttcaagc-3' (temperatura de hibridación, 60 °C); secuencia de cebador directo de OPG, 5'-ctgcctggaagaagatcag-3' y secuencia de cebador inverso de OPG, 5'-ttgtgaagctgtgcaggaac-3' (temperatura de hibridación, 60 °C); secuencia de cebador directo de BSP, 5'-aaagtgaaggaaagcgacga-3' y secuencia de cebador inverso de BSP, 5'-gttcctctgcacctgcttc-3' (temperatura de hibridación, 60 °C); secuencia de cebador directo de OPN, 5'-GATGAATCTGACGAATCTCAC-3' y secuencia de cebador inverso de OPN, 5'-CTGCTTAATCCTCACTAACAC-3' (temperatura de hibridación, 50 °C). La Figura 8 muestra que, cuando las células se trataron con los péptidos de la presente invención, los niveles de ARNm de los genes, que son los marcadores de diferenciación de osteoblastos, fueron aumentados por los péptidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 1 no forma parte de la presente invención). Por lo tanto, el péptido de la presente invención puede promover la diferenciación de osteoblastos al aumentar las expresiones genéticas de OCN, OPG, BSP y OPN, que son marcadores de diferenciación de osteoblastos.

Ejemplo de prueba 7: Verificación sobre la promoción de la señal de diferenciación osteogénica por péptidos sintéticos

Para verificar si pSmad1/5/8, que es una señal implicada en la diferenciación osteogénica, se activó por los péptidos presentes, se dispensaron células MC3T3-E1 en placas de 6 pocillos a 2×10^5 células y después se cultivaron durante 24 horas en condiciones de 37 °C y 5 % de CO₂. Después de 24 horas, el medio se cambió con un medio sin suero y después las células se dejaron en inanición durante 24 horas, se trataron con los péptidos 10 μ g/ml o 50 ng/ml de BMP2, usado como control positivo, durante 30 minutos, se lavó con PBS y se disolvió en un tampón de lisis, obteniendo de esta manera proteínas, que después se sometieron a transferencia Western.

De acuerdo con los resultados anteriores, se confirmó que el tratamiento con el péptido de SEQ ID NO: 2 de la presente invención o de SEQ ID NO: 1 que no forma parte de la presente invención, condujo a la fosforilación de Smad1/5/8, y esto significa que la señal promotora de la formación ósea se transmite debido al tratamiento con los péptidos de la presente invención, de tal manera que se mantenga la diferenciación de osteoblastos (Figuras 9a y 9b, respectivamente).

Ejemplo de formulación 1: Loción Emoliente

La loción emoliente, que incluye nanosomas que contienen el péptido 1 o 2, preparados en el ejemplo sintético 1, y que tiene la siguiente composición, se preparó por un procedimiento general de preparación de loción para la piel.

[Tabla 2]

Composición de loción emoliente	
Componente	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	0,001
1,3-butilenglicol	6,0
glicerina	4,0
PEG 1500	1,0
hialuronato sódico	1,0
polisolvato 20	0,5
etanol	8,0
conservante, colorante	Adecuado
benzofenona-9	0,05
aroma	Pequeño
agua purificada	equilibrado
Total	100

5 Ejemplo de formulación 2: Crema hidratante

La crema nutricional, que incluye nanosomas que contienen el péptido 1 o 2, preparados en el ejemplo sintético 1, y que tiene la siguiente composición, se preparó por un procedimiento general de preparación de crema hidratante.

[Tabla 3]

Composición de crema hidratante	
Componente	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	0,001
Aceite de hierba de la pradera	3,0
alcohol cetearílico	1,5
ácido esteárico	1,5
estearato de glicerilo	1,5
Parafina líquida	10,0
cera	2,0
Polisolvato 60	0,6
sesquioleato de sorbitán	2,5
escualano	3,0
1,3-butilenglicol	3,0
glicerina	5,0
trietanolamina	0,5
acetato de tocoferilo	0,5
conservante, colorante	adecuado
aroma	adecuado
agua purificada	equilibrado
Total	100

Ejemplo de formulación 3: Loción Hidratante para la Piel

- 10 La loción nutricional para la piel, que incluye nanosomas que contienen el péptido 1 o 2, preparados en el ejemplo sintético 1, y que tiene la siguiente composición, se preparó por un procedimiento general de preparación de loción para la piel.

[Tabla 4]

Composición de loción hidratante para la piel	
Componente	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	0,002
1,3-butilenglicol	4,0
glicerina	4,0
alcohol estearílico	0,8
estearato de glicerilo	1,0
Trietanolamina	0,13
acetato de tocoferilo	0,3
parafina líquida	5,0
escualano	3,0
aceite de nuez de macadamia	2,0
Polisolvato 60	1,5
sesquioleato de sorbitán	0,5
polímero de carboxivinilo	1,0
conservante, colorante	adecuado
aroma	adecuado
agua purificada	equilibrado
Total	100

Ejemplo de formulación 4: Esencia

La esencia, que incluye nanosomas que contienen el péptido 1 o 2, preparados en el ejemplo sintético 1, y que tiene la siguiente composición, se prepararon por un procedimiento general de preparación de esencia.

5

[Tabla 5]

Composición de esencia	
Componente	Contenido (% en peso)
Nanosoma peptídico	0,005
glicerina	10,0
1,3-butilenglicol	5,0
PEG 1500	2,0
alantoína	0,1
DL-pantenol	0,3
EDTA-2Na	0,02
hidroxietilcelulosa	0,1
hialuronato sódico	8,0
polímero de carboxivinilo	0,2
trietanolamina	0,18
octildodeces-16	0,4
etanol	6,0
aroma, conservante, colorante	adecuado
agua purificada	equilibrado
Total	100

En lo sucesivo, la invención se describirá adicionalmente mediante diversas realizaciones que se dan para ilustrar meramente la invención:

Realizaciones

1. Un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

2. El péptido de la realización 1, en el que el péptido deriva de la proteína interleucina-3 (IL-3) humana.
 3. El péptido de la realización 1, en el que el péptido inhibe el activador del receptor de la ruta de señalización del ligando del factor nuclear kappa-B (RANKL)-RANK.
 - 5 4. El péptido de la realización 1, en el que el péptido inhibe la diferenciación de osteoclastos inducida por RANKL o citocinas inflamatorias.
 5. El péptido de la realización 1, en el que el péptido inhibe la expresión inducida por RANKL o citocinas inflamatorias de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), catepsina K, o receptor TNF tipo 1 o tipo 2.
 6. El péptido de la realización 4 o 5, en el que la citocina inflamatoria incluye factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, o IL-7.
 - 10 7. El péptido de la realización 1, en el que el péptido promueve la diferenciación de osteoblastos.
 8. El péptido de la realización 1, en el que el N o C terminal del péptido se une a un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenil metoxycarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y un polietilenglicol (PEG).
 - 15 9. Una composición farmacéutica para aliviar o tratar enfermedades óseas, conteniendo la composición el péptido de una cualquiera de las realizaciones 1 a 8 como un principio activo.
 10. La composición de la realización 9, en la que las enfermedades óseas incluyen osteoporosis, osteoporosis infantil, osteogénesis imperfecta, osteomalacia, necrosis ósea, raquitismo, osteomielitis, pérdida de hueso alveolar, enfermedad de Paget, hipercalcemia, hiperparatiroidismo primario, enfermedades óseas metastásicas, mieloma, pérdida ósea en artritis reumatoide, pérdida ósea resultante de cánceres, displasia fibrosa, enfermedades óseas aplásicas, enfermedades metabólicas óseas o pérdida ósea con la edad.
 - 20 11. Una composición para promover la diferenciación osteogénica, conteniendo la composición el péptido de una cualquiera de las realizaciones 1 a 8 como un principio activo.
 12. La composición de la realización 11, en la que la composición promueve la expresión de osteocalcina (OCN), osteoprotegerina (OPG), sialoproteína ósea (BSP) u osteopontina (OPN).
 - 25 13. Un procedimiento para aliviar o tratar enfermedades óseas, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto la composición que contiene el péptido de una cualquiera de las realizaciones 1 a 8 como un principio activo.
 14. El procedimiento de la realización 13, en el que las enfermedades óseas incluyen osteoporosis, osteoporosis infantil, osteogénesis imperfecta, osteomalacia, necrosis ósea, raquitismo, osteomielitis, pérdida de hueso alveolar, enfermedad de Paget, hipercalcemia, hiperparatiroidismo primario, enfermedades óseas metastásicas, mieloma, pérdida ósea en artritis reumatoide, pérdida ósea resultante de cánceres, displasia fibrosa, enfermedades óseas aplásicas, enfermedades metabólicas óseas o pérdida ósea con la edad.
 - 30 15. Un procedimiento para promover la diferenciación osteogénica, comprendiendo el procedimiento poner en contacto células con una composición que contiene el péptido de una cualquiera de las realizaciones 1 a 8 como un principio activo.
 - 35 16. El procedimiento de la realización 15, en el que la composición promueve la expresión de osteocalcina (OCN), osteoprotegerina (OPG), sialoproteína ósea (BSP) u osteopontina (OPN).
- Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a las características específicas, será evidente para los expertos en la materia que esta descripción es solo para una realización y no limita el ámbito de la presente invención. Por lo tanto, el ámbito sustancial de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

<110> Caregen Co. Ltd.

<120> Péptido para inhibir la diferenciación de osteoclastos y uso del mismo

<130> C32049WOEP-A

45 <150> KR 20130086939

<151> 23.07.2013

<160> 22

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> péptido IL-3-1
 <400> 1
 Asn Cys Ser Asn Met Ile Cys Glu Ile Ile Thr His
 1 5 10
 10 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido IL-3-2
 15 <400> 2
 Arg Arg Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu
 1 5 10
 20 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia de cebador directo de TRAP
 <400> 3
 aaatcactct ttaagaacag 20
 25 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> secuencia de cebador inverso de TRAP
 <400> 4
 ttattgaata gcagtgcag 20
 35 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebador directo de catepsina K
 <400> 5
 40 cctctcttgg tgtccataca 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia de cebador inverso de catepsina K
 <400> 6
 atctctctgt accctctgca 20

	<210> 7	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> secuencia de cebador directo de GAPDH	
	<400> 7	
	ggtgtgaacg gatttgccg tattg	25
10	<210> 8	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de cebador inverso GAPDH	
15	<400> 8	
	ccgttgaatt tgccgtgagt ggagt	25
20	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador directo del receptor de TNF tipo 1	
	<400> 9	
	acctttacgg cttcccagaa	20
25	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Secuencia de cebador inverso del receptor de TNF tipo 1	
	<400> 10	
	tccttacagc cacacaccgt	20
35	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador directo del receptor de TNF tipo 2	
40	<400> 11	
	aggctgaaa gccctaact	20
45	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador inverso del receptor de TNF tipo 2	
	<400> 12	
	atgggggtac tggagacagg	20
50	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador directo de actina	
5	<400> 13 cgtgggccgc cctaggca	18
	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Secuencia de cebador inverso de actina	
	<400> 14 ttggcttagg gttcagggg	20
	<210> 15	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de cebador directo de OCN	
20	<400> 15 gcgctctgtc tctctgacct	20
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de cebador inverso de OCN	
	<400> 16 ttgtaggcg gtctcaagc	20
30	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia de cebador directo de OPG	
	<400> 17 ctgcctggga agaagatcag	20
	<210> 18	
	<211> 20	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de cebador inverso de OPG	
	<400> 18 ttgtgaagct gtcaggaac	20
45	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

ES 2 745 544 T3

	<223> secuencia de cebador directo de BSP	
	<400> 19	
	aaagtgaagg aaagcgacga	20
5	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de cebador inverso de BSP	
10	<400> 20	
	gttccttctg cacctgcttc	20
	<210> 21	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador directo de OPN	
	<400> 21	
	gatgaatctg acgaatctca c	21
20	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> secuencia de cebador inverso de OPN	
	<400> 22	
	ctgcttaatc ctcactaaca c	21

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
2. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido deriva de la proteína interleucina-3 (IL-3) humana.
3. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido inhibe el activador del receptor de la ruta de señalización del ligando del factor nuclear kappa-B (RANKL)-RANK.
4. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido inhibe la diferenciación de osteoclastos inducida por RANKL o por citocinas inflamatorias.
5. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido inhibe la expresión inducida por RANKL o por citocinas inflamatorias de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), catepsina K, o receptor TNF tipo 1 o tipo 2.
6. El péptido de la reivindicación 4 o 5, en el que la citocina inflamatoria incluye factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 o IL-7.
7. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido promueve la diferenciación de osteoblastos.
8. El péptido de la reivindicación 1, en el que el N o C terminal del péptido se une a un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenil metoxycarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y un polietilenglicol (PEG).
9. Una composición farmacéutica para su uso en el alivio o el tratamiento de enfermedades óseas, conteniendo la composición el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 como principio activo.
10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que las enfermedades óseas incluyen osteoporosis, osteoporosis infantil, osteogénesis imperfecta, osteomalacia, necrosis ósea, raquitismo, osteomielitis, pérdida de hueso alveolar, enfermedad de Paget, hipercalcemia, hiperparatiroidismo primario, enfermedades óseas metastásicas, mieloma, pérdida ósea en artritis reumatoide, pérdida ósea resultante de cánceres, displasia fibrosa, enfermedades óseas aplásicas, enfermedades metabólicas óseas o pérdida ósea debida a la edad.
11. Una composición para su uso en un procedimiento para promover la diferenciación osteogénica, conteniendo la composición el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 como principio activo.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la composición promueve la expresión de osteocalcina (OCN), osteoprotegerina (OPG), sialoproteína ósea (BSP) u osteopontina.
13. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en la que el procedimiento comprende poner en contacto las células con dicha composición.

Fig. 1a

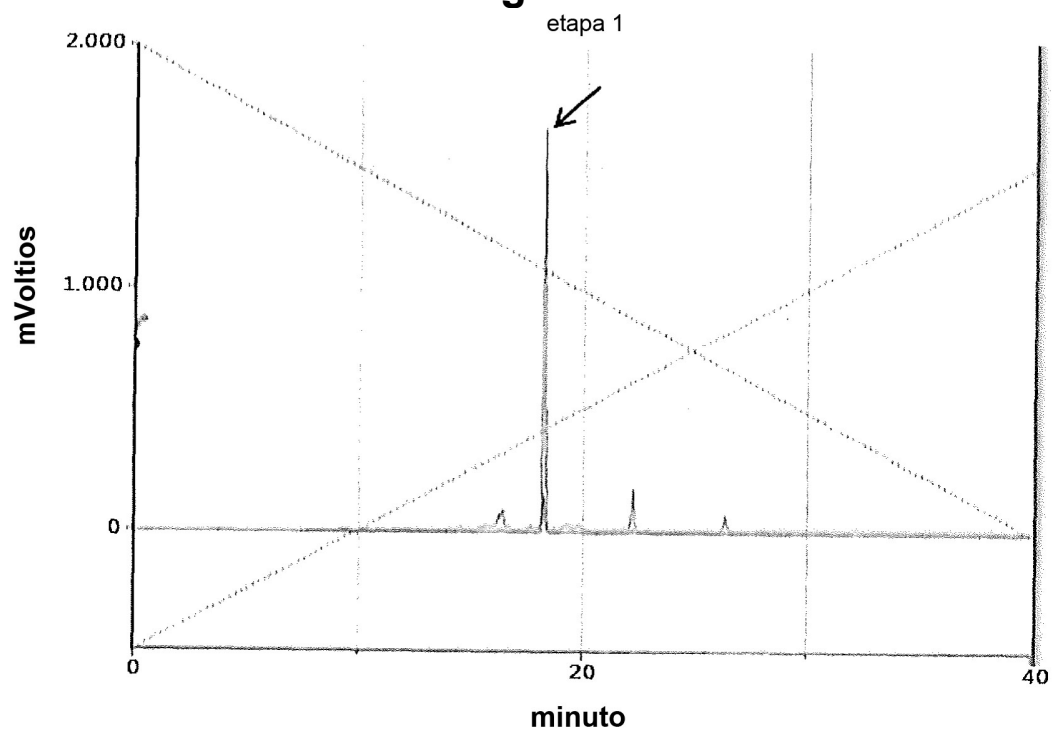


Fig. 1b

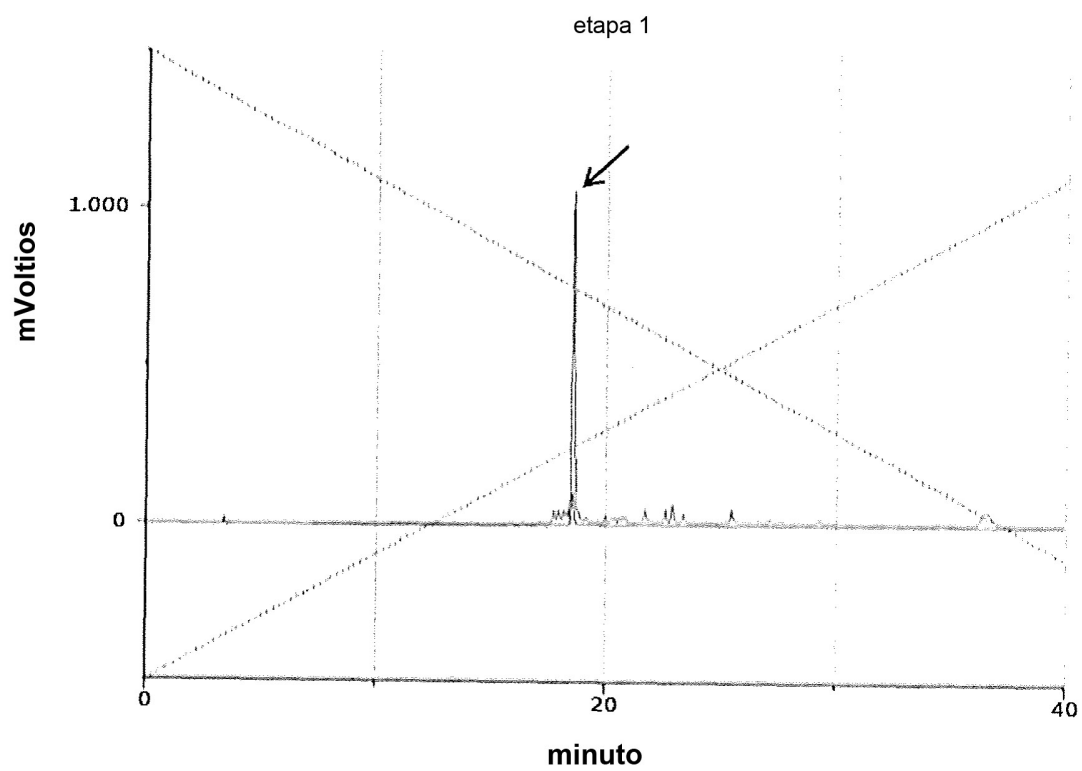


Fig. 2a

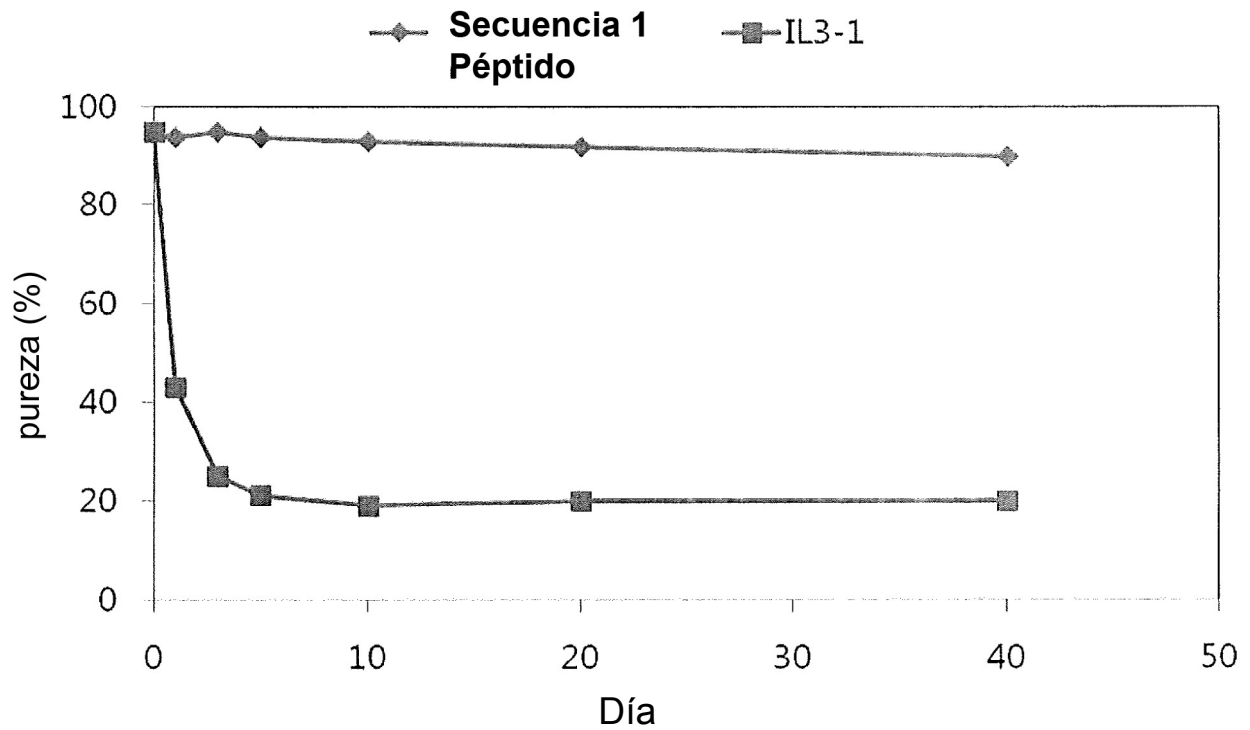
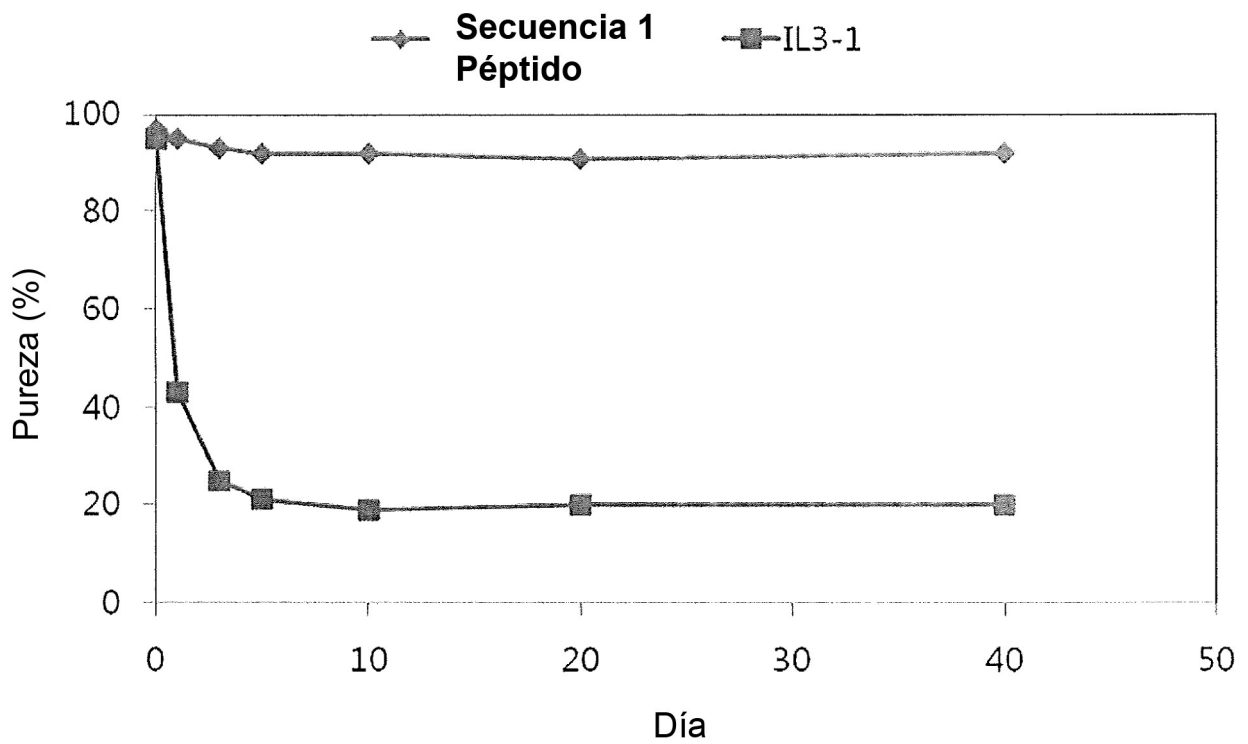


Fig. 2b



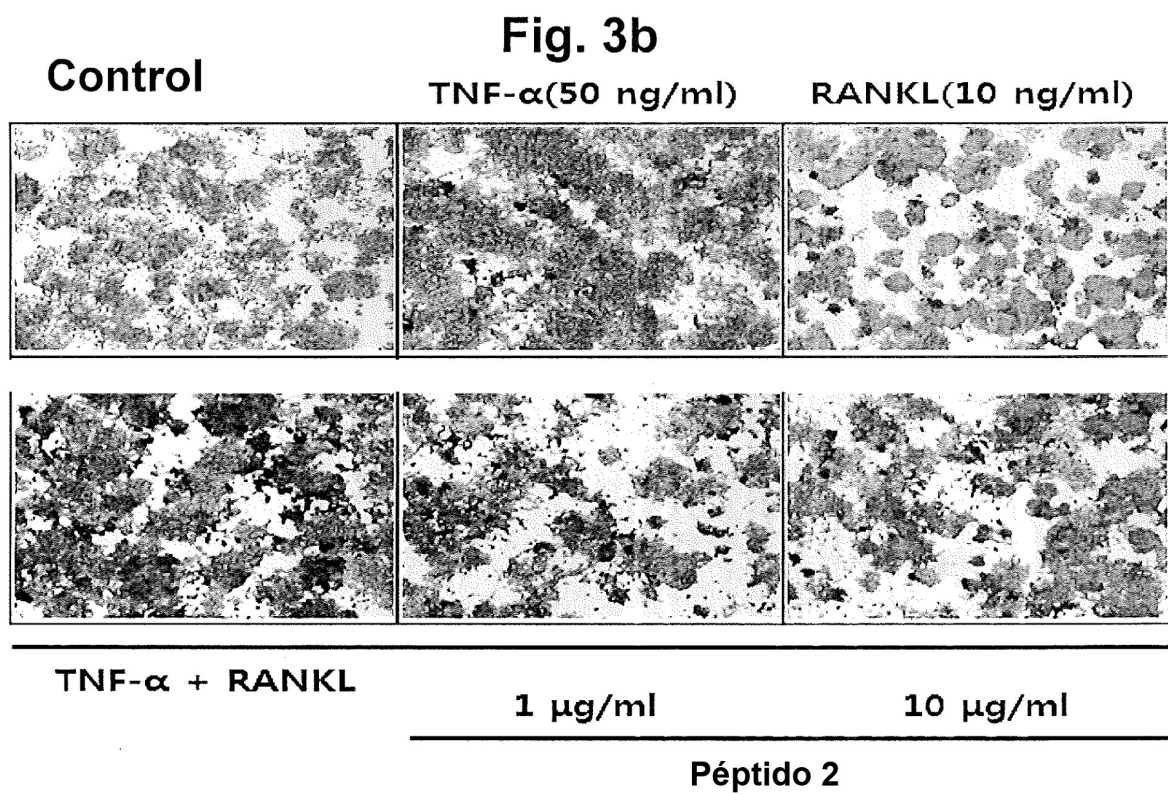
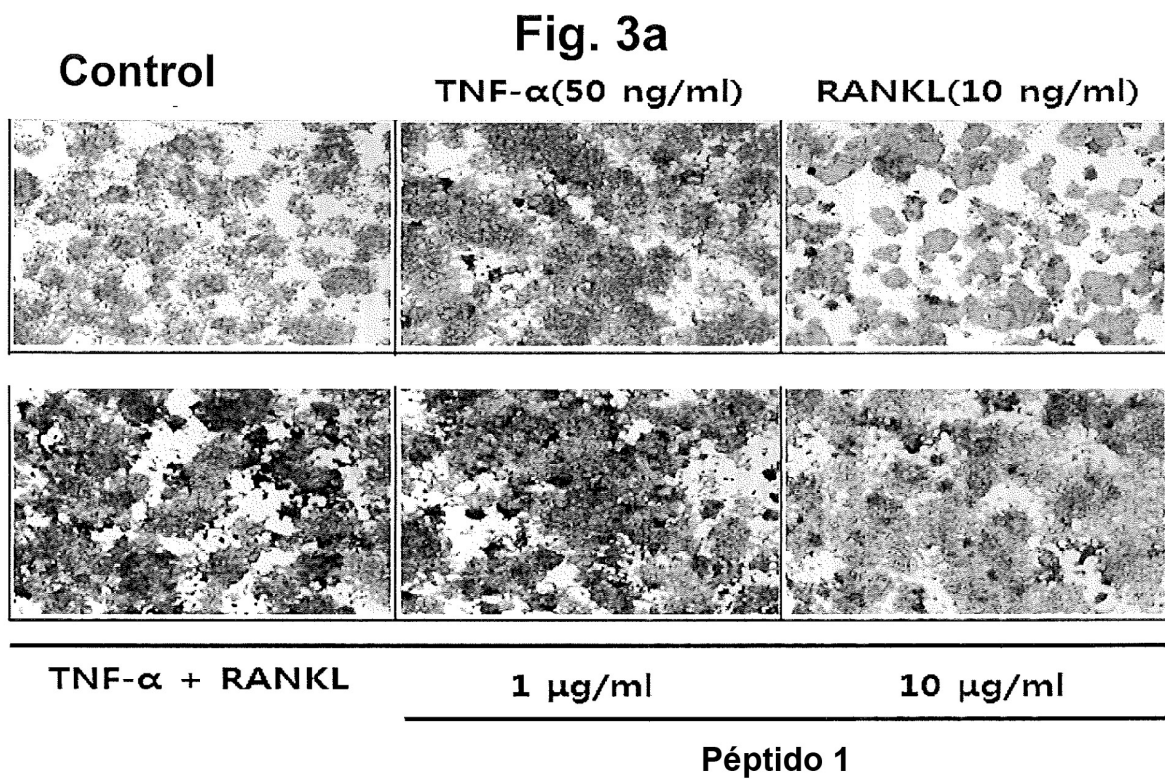


Fig. 4a

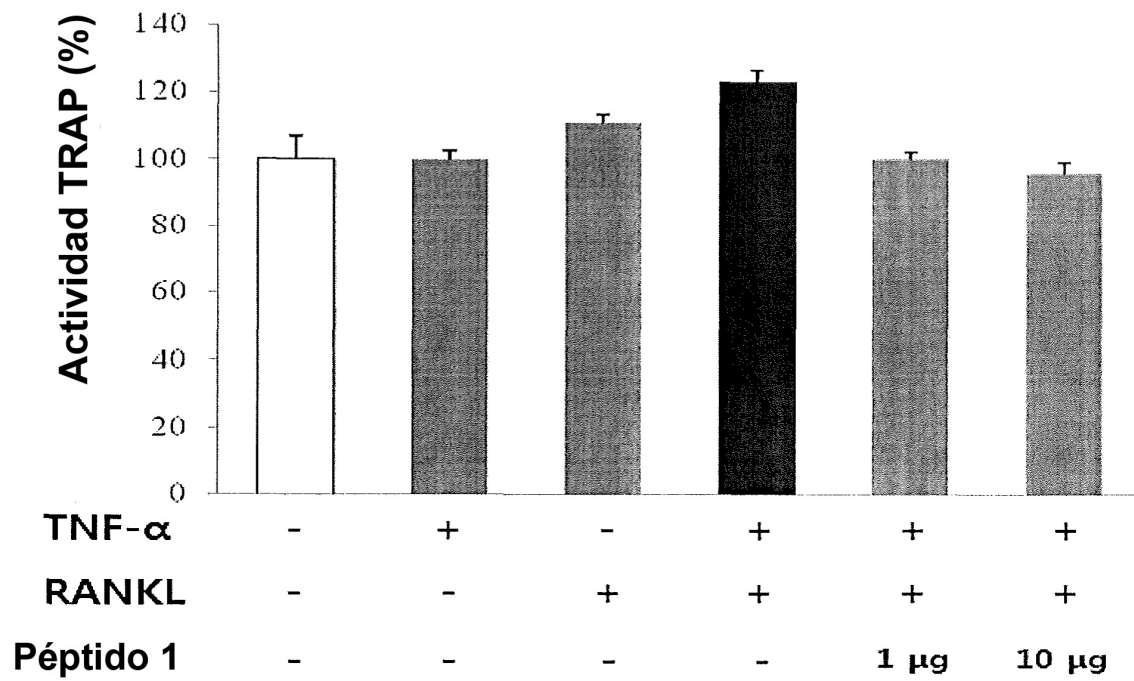


Fig. 4b

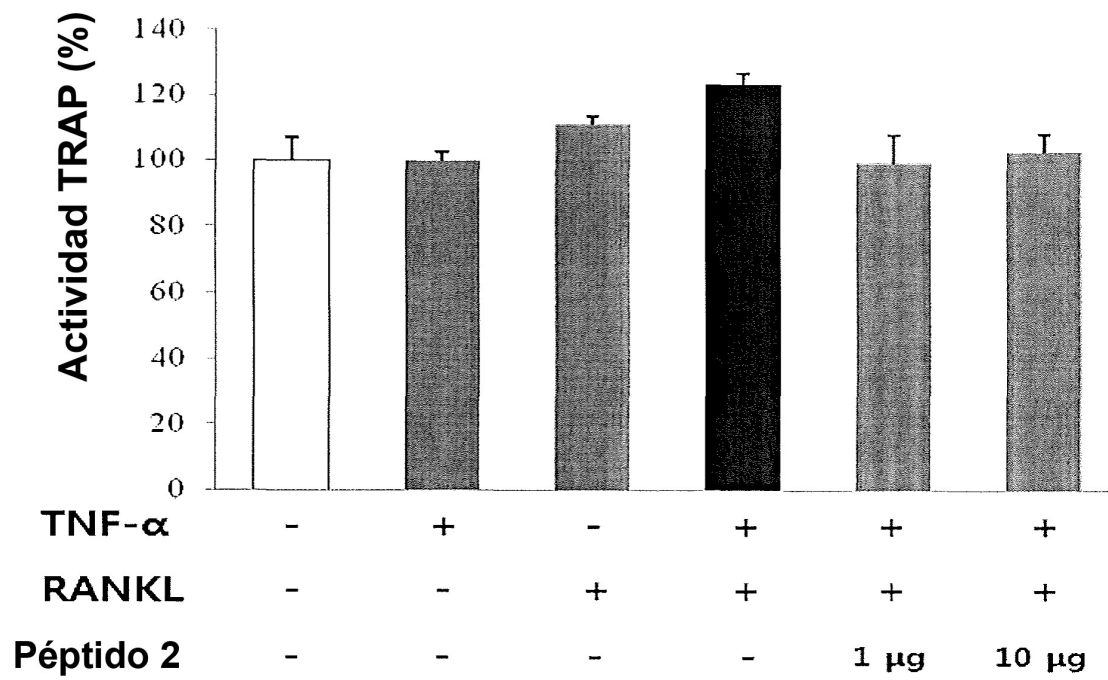


Fig. 5a

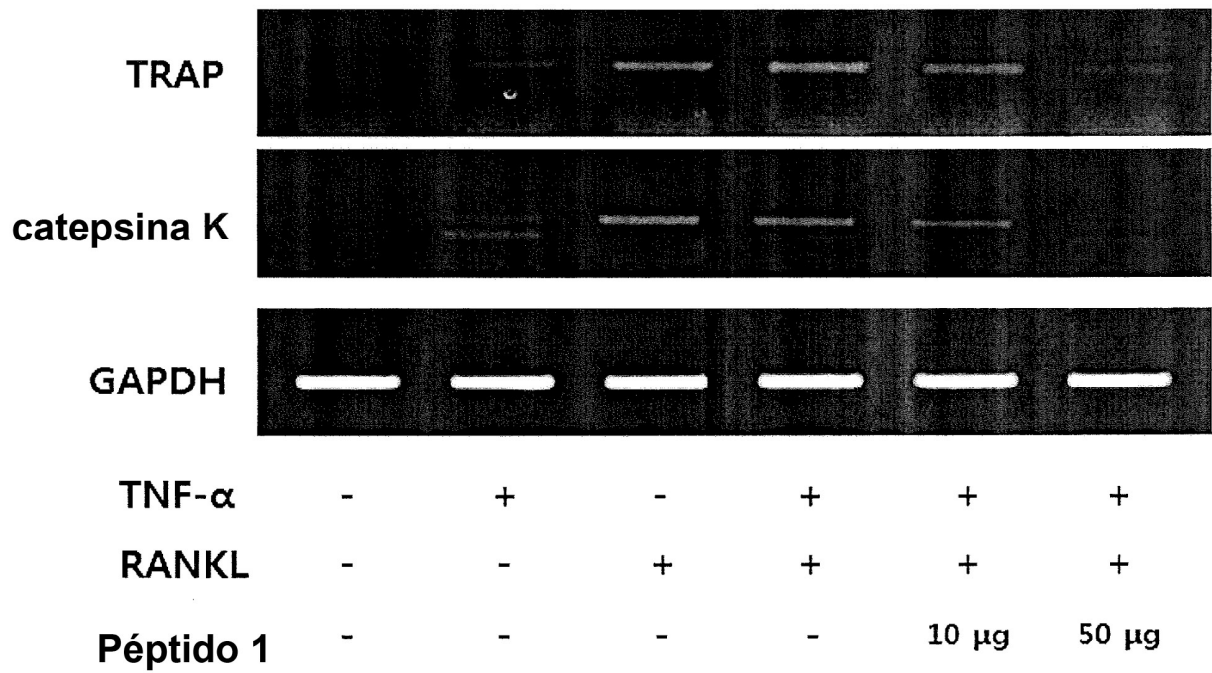


Fig. 5b

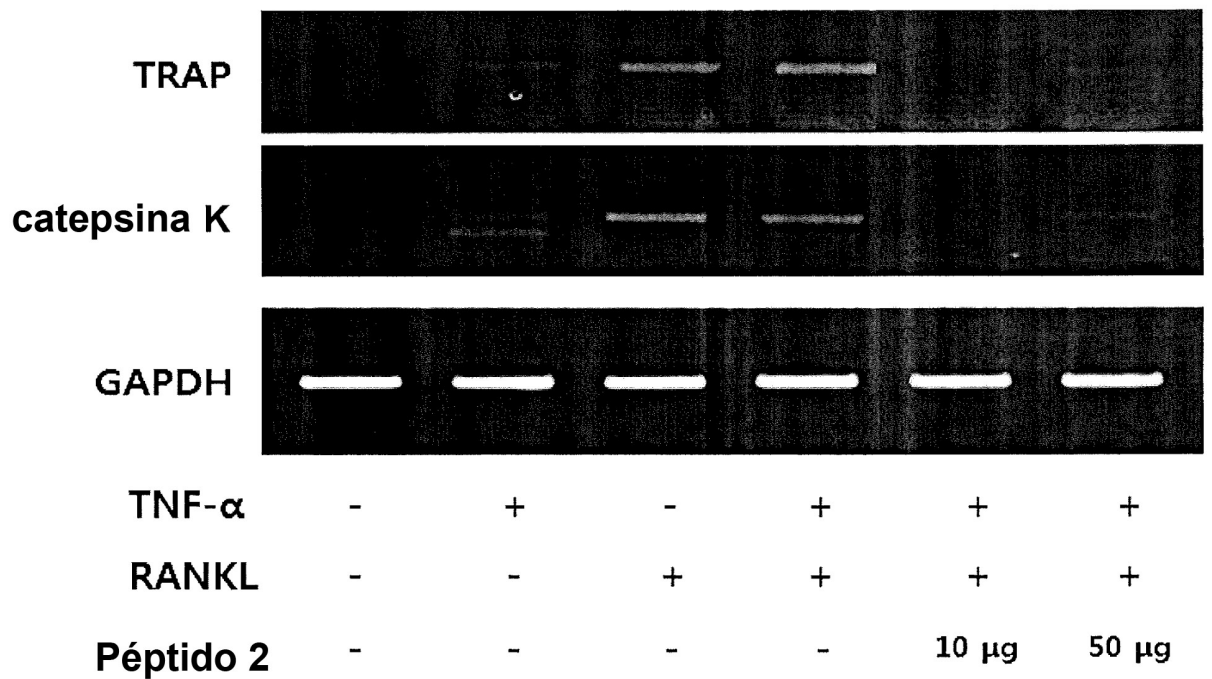


Fig. 6a

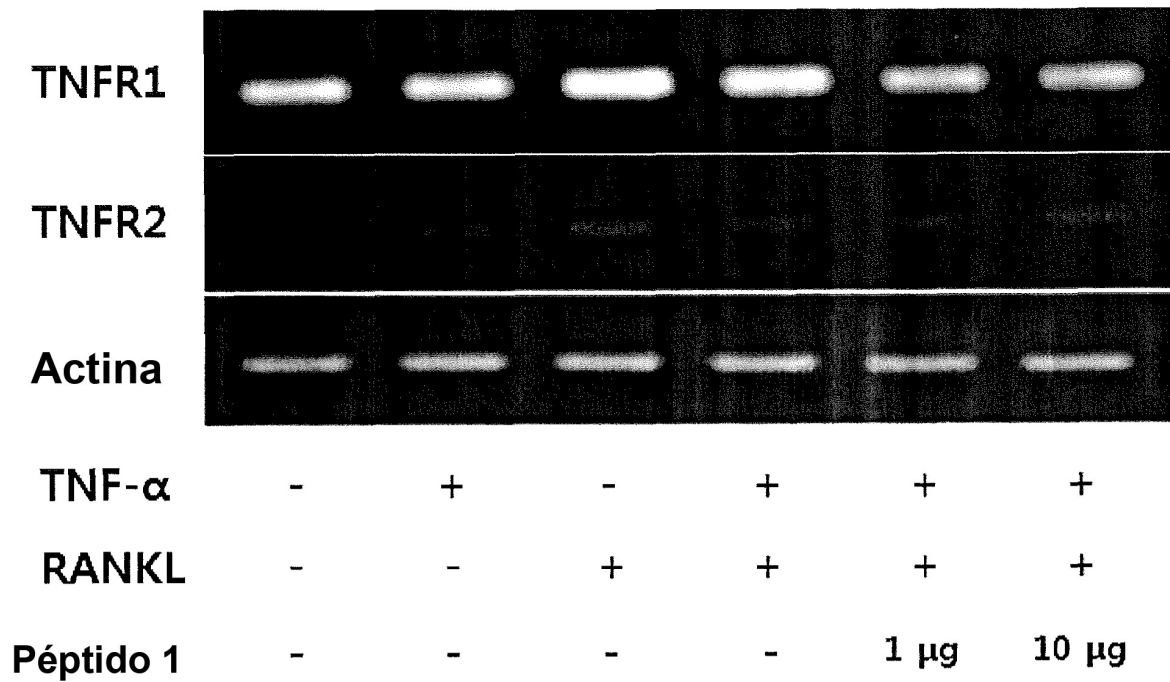


Fig. 6b

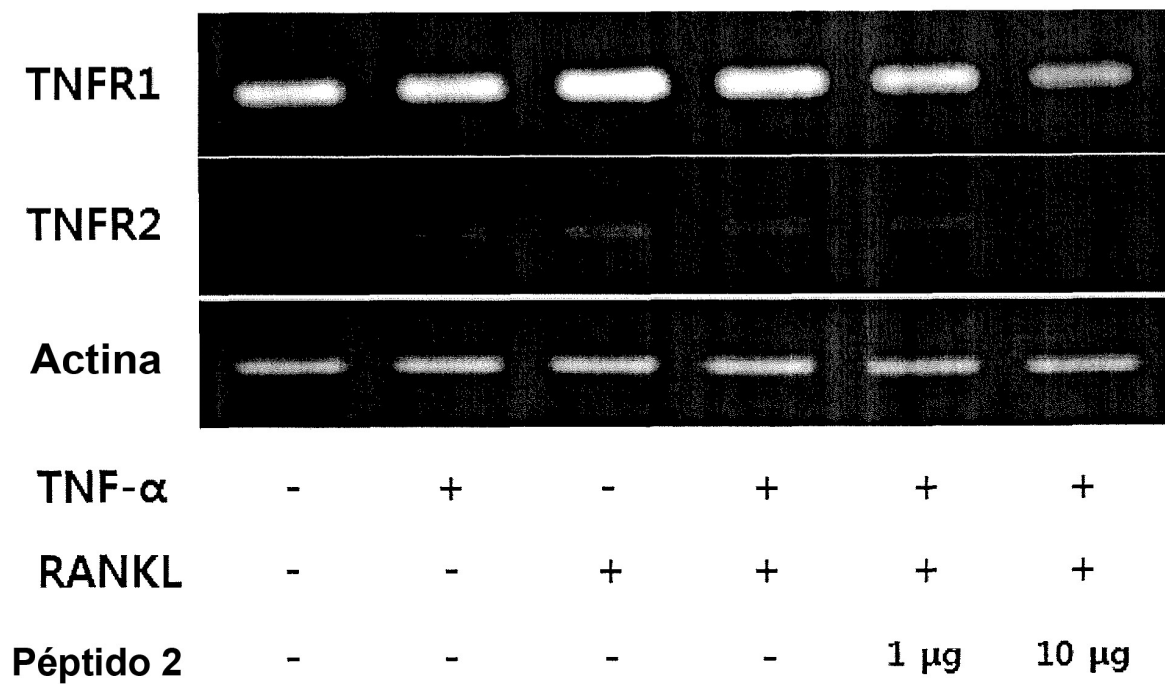


Fig. 7a

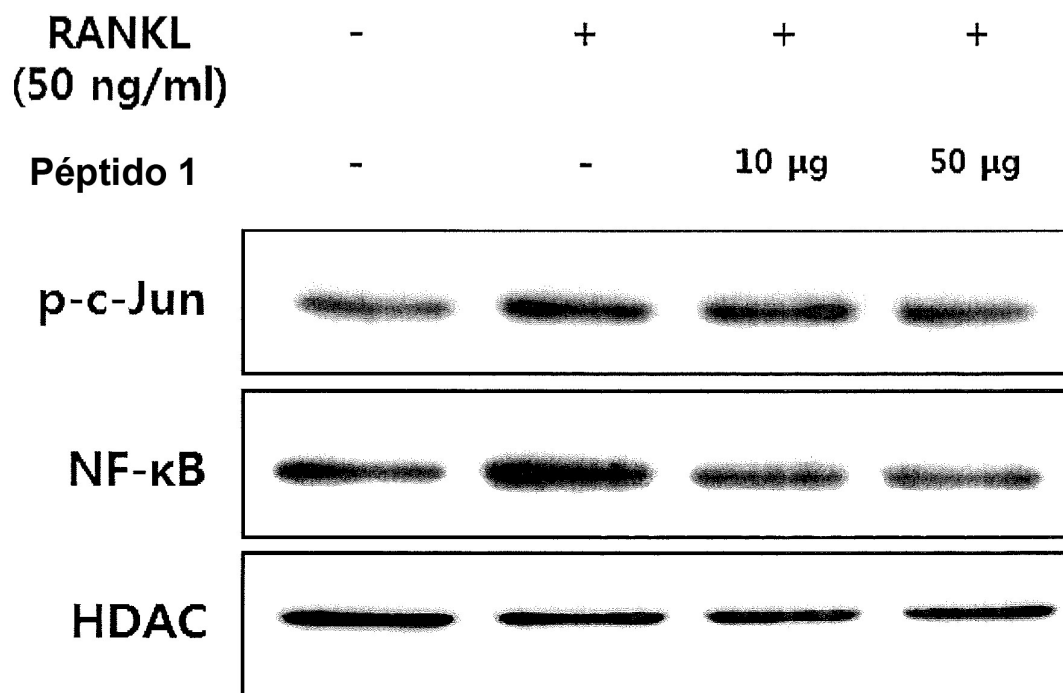


Fig. 7b

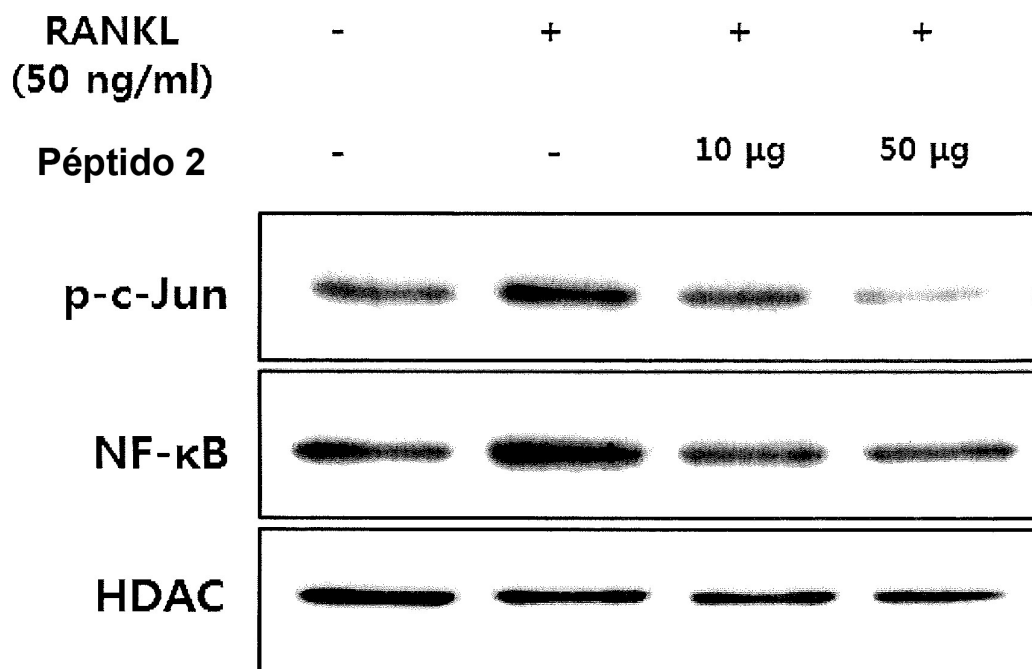


Fig. 8a

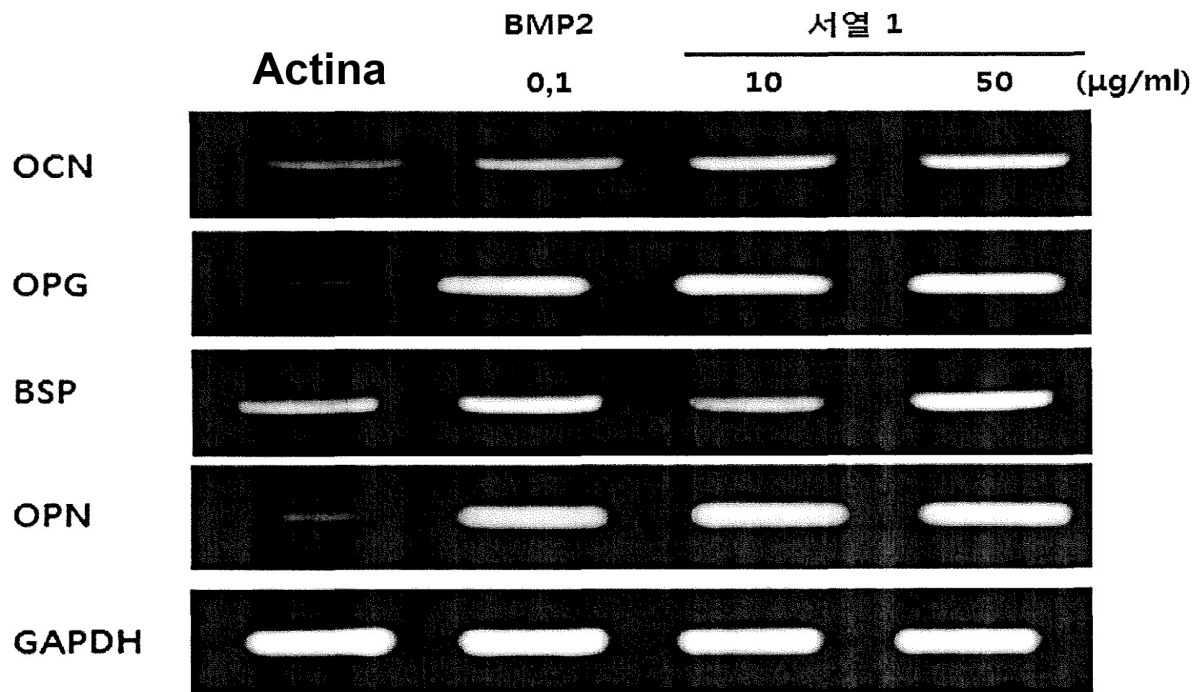


Fig. 8b

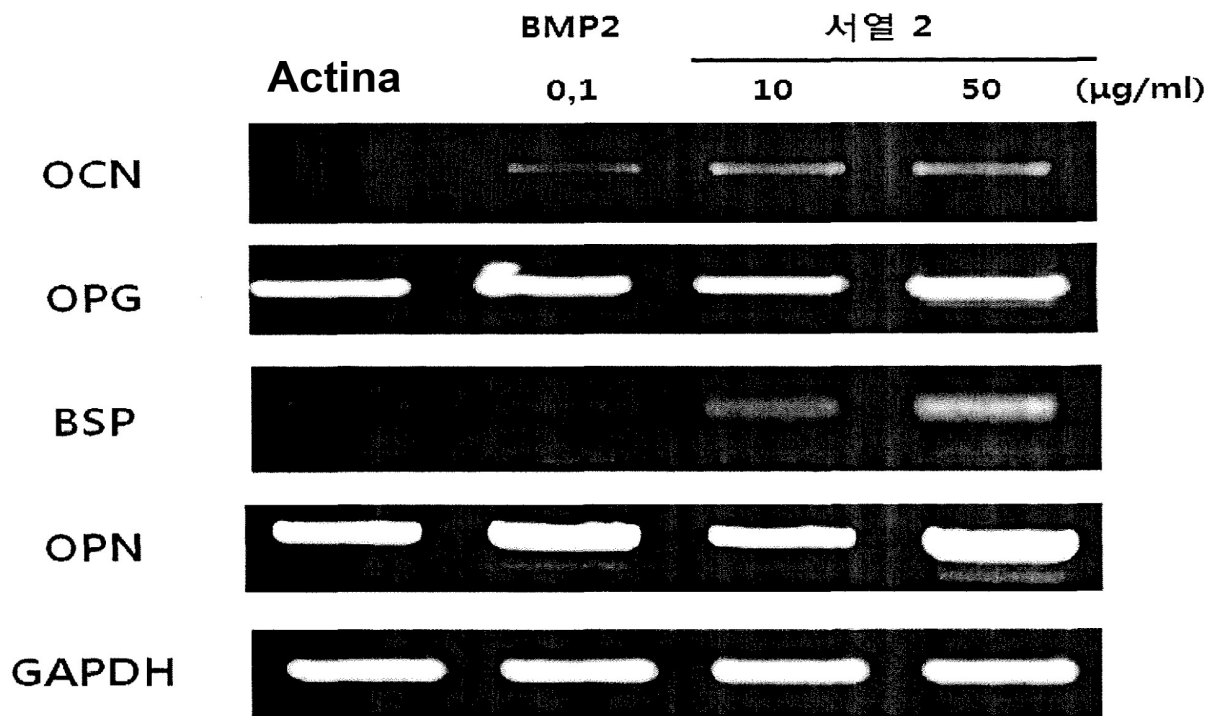


Fig. 9a

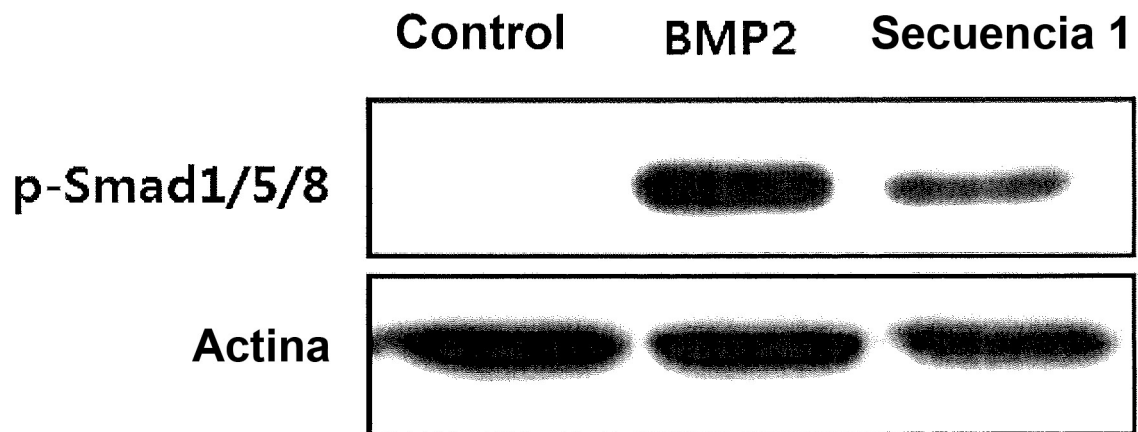


Fig. 9b

