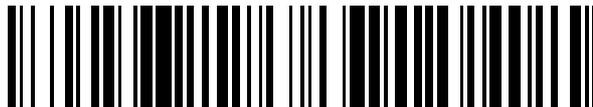


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 631**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2014 PCT/KR2014/007202**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16017844**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2014 E 14898754 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3196208**

54 Título: **Péptido que tiene inhibición de la activación y diferenciación de osteoclastos y uso del mismo**

30 Prioridad:

31.07.2014 KR 20140098362

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

02.07.2020

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, YONG JI;
KIM, EUN MI;
LEE, EUNG JI;
HAN, A REUM y
KWON, HYUN JUNG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 770 631 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptido que tiene inhibición de la activación y diferenciación de osteoclastos y uso del mismo

5 Campo técnico

Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud de patente coreana n.º 10-2014-0098362 presentada en la oficina de propiedad intelectual de Corea el 31 de julio de 2014.

10 La presente invención se refiere a un péptido que tiene una capacidad inhibidora de la actividad y diferenciación de osteoclastos y a un uso del mismo.

Técnica anterior

15 Los huesos soportan el tejido blando y el peso del cuerpo humano, y rodean a órganos internos para proteger a los mismos frente a impactos externos. Los huesos también son una de las partes importantes del cuerpo humano que soportan estructuralmente músculos y órganos y almacenan calcio u otros minerales esenciales, tales como fósforo y magnesio, en el cuerpo. Por tanto, tras completarse el crecimiento, los huesos adultos repiten los procedimientos de formación y resorción de retirar huesos antiguos y sustituirlos por nuevos huesos de manera muy dinámica y continua sin parada, hasta la muerte, manteniendo así el equilibrio entre los mismos. Esto se denomina remodelado óseo. La renovación de huesos mediante retirada de huesos antiguos y sustitución por nuevos huesos resulta esencial para la restauración del microdaño óseo provocado por el crecimiento y la tensión y el mantenimiento apropiado de las funciones de los huesos.

25 Se ha sabido que dos tipos de células están implicadas en gran medida en el remodelado óseo: los osteoblastos, que forman huesos; y los osteoclastos, que destruyen huesos. Los osteoblastos forman un activador de receptor de ligando de factor nuclear κ B (RANKL) y un receptor señuelo del mismo, es decir, osteoprotegerina (OPG). Cuando RANKL se une a RANK, que es un receptor en una superficie de células progenitoras de osteoclastos, las células progenitoras de osteoclastos maduran para dar osteoclastos, dando como resultado la resorción ósea. Sin embargo, la unión entre OPG y RANKL bloquea la unión entre RANKL y RANK, inhibiendo de ese modo la formación de osteoclastos y previniendo la resorción ósea innecesaria. La resorción o destrucción de huesos antiguos se produce mediante osteoclastos formados a partir de células sanguíneas (células madre hematopoyéticas) y produce poros en los huesos para liberar una pequeña cantidad de calcio al torrente sanguíneo, y el calcio se usa para mantener funciones físicas. Mientras tanto, los osteoblastos formados a partir de células óseas rellenan los poros con colágeno y cubren los precipitados (hidroxiapatita) de calcio e hidroxiapatita de fósforo, formando de ese modo nuevos huesos macizos y reconstruyendo el esqueleto. Se tarda aproximadamente 100 días hasta que se destruye el hueso para formarse de nuevo para dar nuevos huesos. Mientras que el 100% del contenido en calcio en el hueso se cambia dentro del plazo de 1 año en un niño, aproximadamente el 10-30% del esqueleto se reconstruye mediante el remodelado óseo en un adulto cada año. La densidad ósea sólo puede mantenerse como antes si la tasa osteoclástica es igual a la tasa osteogénica. El desequilibrio en tales huesos importantes puede provocar muchas enfermedades y, particularmente, son representativas las enfermedades asociadas con daño óseo debido a osteoporosis y metástasis ósea de células cancerosas.

45 La osteoporosis es un trastorno en el que la masa ósea se reduce por diversas causas y el riesgo de fractura ósea se aumenta de manera continua debido a la degeneración de la microestructura en el tejido óseo. Además, la osteoporosis es un estado en el que se ha reducido el contenido en minerales (por ejemplo, calcio) y sustratos de hueso y la osteoporosis se produce cuando la osteoclasia se vuelve superior a la osteogénesis desequilibrando el remodelado óseo. Los interiores de huesos normales tienen estructuras densas como una malla, pero en el caso de la osteoporosis, el intervalo entre las estructuras se vuelve más ancho, la microestructura se vuelve más delgada y debilitada y, por tanto, el hueso progresa hasta un estado en el que puede fracturarse fácilmente incluso por un impacto pequeño. La osteoporosis provoca una rápida pérdida ósea (el 2-3% cada año) en el momento del comienzo de la menopausia. Las enfermedades de osteoporosis se clasifican en: osteoporosis posmenopáusica en la que se aumenta el riesgo de compresión de la columna y fractura de hueso de la muñeca; osteoporosis senil que se desarrolla lentamente (el 0,5-1% cada año) en hombres y mujeres ancianos de más de 70 años de edad e induce pérdida ósea gradual de huesos de la cadera y la columna; y osteoporosis secundaria que se desarrolla por enfermedades (enfermedades endocrinas, enfermedades gastrointestinales y tumores malignos), fármacos (hormonas corticosteroides, quimioterapia anticancerosa, hormonas tiroideas, anticonvulsivos, antiplaquetarios, metotrexato, ciclosporina y GnRH), alcohol, tabaquismo o accidente, independientemente de la edad.

60 Los productos terapéuticos basados en bisfosfonato, tales como Fosamax (nombre genérico: alendronato) y Actonel (nombre genérico: risedronato), están usándose para el daño óseo provocado por las enfermedades de osteoporosis anteriores y la metástasis ósea de células cancerosas. La mayor parte de estas preparaciones basadas en bisfosfonato debilitan las funciones de osteoclastos que destruyen huesos e inducen la apoptosis de los mismos, retrasando o deteniendo de ese modo la pérdida de huesos. Sin embargo, en pacientes que toman bisfosfonatos, estos fármacos no tienen una acción de fomentar la formación de nuevos huesos, y la incidencia de necrosis crónica (osteonecrosis), fibrilación auricular grave, neutralización de huesos y articulaciones o dolor musculoesquelético ha

estado aumentando recientemente cada año. Por tanto, se concentra mucho interés en el desarrollo de agentes preventivos y terapéuticos para la osteoporosis, lo cual fomenta la formación de huesos en vez de suprimir la resorción ósea.

5 Descripción detallada de la invención

Problema técnico

10 Los presentes inventores se esforzaron por desarrollar péptidos que tuvieran actividad biológicamente eficaz y, como resultado, los presentes inventores establecieron que un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 tiene excelentes efectos de prevención y tratamiento de diversas enfermedades óseas provocadas por la destrucción ósea inhibiendo la actividad y diferenciación de osteoclastos y, por tanto, completaron la presente invención.

15 Por tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar un péptido que tenga una capacidad inhibidora de la actividad y diferenciación de osteoclastos.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición para prevenir o tratar enfermedades óseas.

20 Otros fines y ventajas de la presente invención resultarán más evidentes con la siguiente descripción detallada de la invención, reivindicaciones y dibujos.

Solución técnica

25 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que tiene una capacidad inhibidora de la actividad y diferenciación de osteoclastos, incluyendo el péptido una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3.

30 Los presentes inventores se esforzaron por desarrollar péptidos que tuvieran actividad biológicamente eficaz y, como resultado, los presentes inventores establecieron que un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 tiene excelentes efectos de prevención y tratamiento de diversas enfermedades óseas provocadas por la destrucción ósea inhibiendo la actividad y diferenciación de osteoclastos.

35 El péptido de la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Específicamente, el péptido de la presente invención consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3.

El péptido de la presente invención inhibe eficazmente la diferenciación y actividad de osteoclastos.

40 La destrucción ósea en articulaciones se produce mediante la activación de osteoclastos, y células precursoras mieloides que se diferencian a partir de células madre hematopoyéticas se diferencian para dar los osteoclastos en un entorno inflamatorio. Existen muchas quimiocinas y citocinas inflamatorias en articulaciones reumatoideas, y estas sustancias aumentan la expresión de varias moléculas necesarias para la diferenciación de osteoclastos, induciendo así la formación de osteoclastos. Se ha reconocido que el principal propósito terapéutico de la artritis reumatoide es suprimir la destrucción ósea para minimizar el daño articular.

45 Las sustancias esenciales para la diferenciación de células progenitoras mieloides para dar osteoclastos son el activador de receptor de factor nuclear kappa κ B (RANK), que se induce en la superficie de las células progenitoras, y el activador de receptor de ligando de factor nuclear κ B (RANKL), que es el ligando para RANK, y la unión de RANK y RANKL, la denominada interacción RANK-RANKL, es indispensable para la diferenciación de osteoclastos. Además, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) también desempeña un papel importante en la maduración y diferenciación de osteoclastos. La interacción RANK-RANKL y M-CSF son indispensables para la ruta de señalización principal de diferenciación de osteoclastos, pero los ligandos se unen a transductores de señales intracelulares DAP12 y FcR γ a través de varias clases de receptores de tipo inmunoglobulina en la superficie de las células progenitoras, proporcionando así señales coestimulantes. La ruta de señalización más central está configurada de tal manera que, tras la interacción RANKL-RANK, se induce la activación de NF- κ B a través de factor 6 asociado a receptor de TNF (TRAF6), que es un transductor de señales intracelulares, aumentando así la transcripción de genes necesarios para la formación de osteoclastos. A continuación, también se sabe que M-CSF es un material que es esencial para la diferenciación de osteoclastos, y se une a un receptor específico, tal como cFMS, que pertenece a una superfamilia de tirosina cinasas receptoras, para formar un complejo Src-PYK2, que entonces induce un material regulador de la transcripción, tal como NF- κ B, o realiza señalización intracelular a través de proteínas de integrina.

65 Según una realización de la presente invención, el péptido de la presente invención reduce las expresiones de fosfatasa alcalina resistente a tartrato (TRAP) y cathepsina K en asociación con la diferenciación de osteoclastos e

inhibe la translocación nuclear de NF- κ B, inhibiendo en última instancia la diferenciación y actividad de osteoclastos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a una molécula lineal en la que residuos de aminoácido se unen entre sí mediante un enlace peptídico. El péptido de la presente invención puede prepararse mediante métodos de síntesis química conocidos en la técnica, especialmente, técnicas de síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, *et al.*, Solid Phase Peptide Synthesis, 2^a. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111 (1984)) o técnicas de síntesis en fase líquida (patente estadounidense n.º 5.516.891).

Según una realización de la presente invención, un grupo protector, que se selecciona del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenilmetoxicarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y polietilenglicol (PEG), puede unirse al extremo N o C-terminal del péptido.

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

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para prevenir o tratar una enfermedad ósea, conteniendo la composición, como principio activo, el péptido anterior que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3.

Dado que la composición de la presente invención contiene, como principio activo, el péptido anterior compuesto por una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, de la presente invención, las descripciones de contenidos solapantes entre las mismas se omitirán para evitar una complejidad excesiva de la presente memoria descriptiva.

Tal como se valida en los siguientes ejemplos, el péptido que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 de la presente invención inhibe la diferenciación y actividad de osteoclastos, y por tanto es muy eficaz en la prevención o el tratamiento de una enfermedad ósea en asociación con la destrucción ósea.

La composición para prevenir o tratar una enfermedad ósea de la presente invención puede usarse para todas las enfermedades que se producen a partir de una acción osteoclástica excesiva, y puede usarse, por ejemplo, para daño óseo, osteoporosis, osteomalacia, raquitismo, osteítis fibrosa, una enfermedad ósea aplásica o una enfermedad ósea metabólica.

Según una realización de la presente invención, la composición de la presente invención puede prepararse para dar una composición farmacéutica que contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido anterior de la presente invención; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para obtener eficacia o actividad del péptido anterior.

El portador farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente invención se usa habitualmente en el momento de la formulación, y ejemplos del mismo pueden incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, 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 adicionalmente, además de los componentes anteriores, un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante y similares. Agentes y portadores farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en detalle en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19^a 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.

Una dosis adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo de diversos factores, tales como el método para la formulación, la manera de administración, la edad, peso corporal, sexo y morbilidad del paciente, la dieta, el momento de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la sensibilidad de respuesta. Mientras tanto, la dosis de la composición farmacéutica de la presente invención es de 0,0001-200 μ g al día.

La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para dar una forma de dosificación unitaria o un recipiente de múltiples dosis usando un excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable según el método

fácilmente llevado a cabo por un experto habitual en la técnica a la que se refiere la presente invención. En este caso, la forma de dosificación puede ser una disolución en un medio aceitoso 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 un estabilizador.

5

Efectos ventajosos

Características y ventajas de la presente invención se resumen de la siguiente manera:

10 (i) el péptido que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 tiene una capacidad inhibitoria de la actividad y diferenciación de osteoclastos, y es muy eficaz en la prevención o el tratamiento de enfermedad ósea en asociación con la destrucción ósea,

15 (ii) el péptido de la presente invención reduce las expresiones de TRAP y catepsina K en asociación con la diferenciación de osteoclastos e inhibe la translocación nuclear de NF- κ B, inhibiendo en última instancia la diferenciación y actividad de osteoclastos,

20 (iii) la presente invención proporciona una composición, que contiene el péptido anterior, para prevenir o tratar una enfermedad ósea.

Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 ilustra resultados de tinción de TRAP que verifican los cambios en los niveles de expresión de proteína TRAP durante la diferenciación de osteoclastos, mediante el tratamiento con péptidos de la presente invención.

a. Péptido de SEQ ID NO: 1, b. Péptido de SEQ ID NO: 2, c. Péptido de SEQ ID NO: 3.

30 La figura 2 ilustra resultados de RT-PCR que verifican los niveles de ARNm de TARP y catepsina K expresadas durante la diferenciación de osteoclastos, mediante el tratamiento con péptidos de la presente invención.

a. Péptido de SEQ ID NO: 1, b. Péptido de SEQ ID NO: 2, c. Péptido de SEQ ID NO: 3.

35 La figura 3 ilustra resultados de inmunotransferencia de tipo Western que verifican los cambios en la translocación nuclear de NF- κ B, fomentada durante la diferenciación de osteoclastos, mediante el tratamiento de los péptidos de la presente invención.

a. Péptido de SEQ ID NO: 1, b. Péptido de SEQ ID NO: 2, c. Péptido de SEQ ID NO: 3.

40 La figura 4 ilustra resultados de tinción de inmunohistoquímica que verifican los niveles de expresión de TRAP expresada durante la diferenciación de osteoclastos, mediante el tratamiento con los péptidos de la presente invención.

45 a. Péptido de SEQ ID NO: 1, b. Péptido de SEQ ID NO: 2, c. Péptido de SEQ ID NO: 3.

La figura 5 ilustra resultados de tinción de inmunohistoquímica que verifican los niveles de expresión de catepsina K expresada durante la diferenciación de osteoclastos, mediante el tratamiento con los péptidos de la presente invención.

50 a. Péptido de SEQ ID NO: 1, b. Péptido de SEQ ID NO: 2, c. Péptido de SEQ ID NO: 3

Modo para llevar a cabo la invención

55 A continuación, en el presente documento, se describirá en detalle la presente invención con referencia a ejemplos. Estos ejemplos sólo son para ilustrar la presente invención más específicamente.

Ejemplos

60 Ejemplo de síntesis 1: síntesis de péptido

Se pusieron 700 mg de resina de cloruro de cloro-tritilo (resina CTL, Nova Biochem, n.º de cat. 01-64-0021) en un recipiente de reacción y se añadieron 10 ml de cloruro de metileno (MC), seguido por agitación durante 3 minutos. Tras retirarse la disolución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF), seguido por agitación durante 3 minutos, y después se retiró de nuevo el disolvente. Se añadieron 10 ml de una disolución de diclorometano (DCM) en el reactor y se añadieron 200 mmol de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (Bachem, Suiza) y 400 mmol de diisopropiletilamina (DIEA), tras lo cual se disolvió bien la mezcla con agitación, seguido por reacción con agitación durante 1 hora. Tras la

reacción, se llevó a cabo un lavado. Después, se disolvieron metanol y DIEA (2:1) en DCM, seguido por reacción durante 10 minutos, y después se llevó a cabo un lavado con DCM/DMF (1:1) en exceso. Tras retirarse la disolución, se añadieron 10 ml de DMF, seguido por agitación durante 3 minutos, y después se retiró de nuevo el disolvente. Se pusieron 10 ml de una disolución de desprotección (20% de piperidina/DMF) en el recipiente de reacción, seguido por agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos, y después se retiró la disolución. Se añadió una cantidad igual de una disolución de desprotección, y después, de nuevo, se mantuvo la reacción durante 10 minutos, seguido por retirada de la disolución. Después, se llevó a cabo un lavado dos veces con DMF, una vez con MC y una vez con DMF, durante 3 minutos cada vez, preparando así Arg(Pbf)-resina CTL.

Se pusieron 10 ml de una disolución de DMF en un nuevo reactor y se añadieron 200 mmol de Fmoc-Leu-OH (Bachem, Suiza), 200 mmol de HoBt y 200 mmol de Bop, y se disolvió bien la mezcla con agitación. Después, se pusieron de manera dividida 400 mmol de N,N-diisopropiletilamina (DIEA) dos veces en el reactor, y después se llevó a cabo la agitación durante al menos 5 minutos hasta que se disolvieron todos los sólidos. Se puso la disolución mixta de aminoácido disuelto en el recipiente de reacción que contenía la resina desprotegida y se llevó a cabo la reacción con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras retirarse el líquido de reacción, se llevó a cabo la agitación usando una disolución de DMF tres veces durante 5 minutos cada vez, seguido por retirada. Se tomó una pequeña cantidad de la resina que había reaccionado para comprobar el grado de reacción mediante la prueba de Kaiser (prueba de ninhidrina). Se llevó a cabo una reacción de desprotección usando la disolución de desprotección, dos veces, de la misma manera que la descrita anteriormente, preparando así Leu-Arg(Pbf)-resina CTL. Tras un lavado suficiente con DMF y MC, se llevó a cabo de nuevo la prueba de Kaiser, y después se llevó a cabo la siguiente prueba de unión de aminoácido de la misma manera que la descrita anteriormente.

Basándose en la secuencia de aminoácidos seleccionada, se llevó a cabo una reacción en cadena en el orden de Fmoc-Phe, Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Val, Fmoc-Pro, Fmoc-Ser(tBu). Se retiró el grupo protector Fmoc mediante reacción dos veces con una disolución de desprotección durante 10 minutos cada vez, seguido por un buen lavado. Se añadieron anhídrido acético, DIEA e hidroxibenzotriazol (HoBt) para realizar la acetilación durante 1 hora, y después se lavó la resina de peptidilo preparada tres veces de manera secuencial con DMF, MC y metanol, se secó bajo el flujo lento de gas nitrógeno, y se secó completamente mediante secado a vacío bajo pentóxido de fósforo (P₂O₅). Después, se añadieron 30 ml de una disolución de salida (el 95% de ácido trifluoroacético (TFA), el 2,5% de agua destilada y el 2,5% de tianisol), y se mantuvo la reacción durante 2 horas mientras se agitaba de manera intermitente la mezcla a temperatura ambiente. Se obtuvo la resina mediante filtración, se lavó con una pequeña cantidad de una disolución y después se mezcló con disolución madre. Se destiló la mezcla resultante usando presión reducida de tal manera que se redujo el volumen total hasta aproximadamente la mitad y después se añadieron 50 ml de éter frío para inducir la precipitación. Después de eso, se recogieron los precipitados mediante centrifugación, seguido por lavado dos veces con éter frío. Se retiró la disolución madre, seguido por secado suficiente bajo atmósfera de nitrógeno, sintetizando así 0,80 g de péptido 1 sin purificar, Ser-Pro-Val-Glu-Phe-Leu-Arg (SEQ ID NO: 1, rendimiento: el 88,8%). A partir de la medición usando un sistema de análisis de peso molecular, se determinó que el peso molecular del mismo era de 846,7 (valor teórico: 846,9). Mediante el método anterior, se sintetizaron el péptido 2, Ile-Thr-Leu-Gln-Glu-Ile-Ile-Arg-Thr (SEQ ID NO: 2) y el péptido 3, Ala-Cys-Ile-His-Thr-Leu-Ser-Leu-Leu-Cys (SEQ ID NO: 3) (rendimientos: el 86,4% y el 83,2%, respectivamente). A partir de la medición usando un sistema de análisis de peso molecular, se determinó que los pesos moleculares eran de 1086,3 (valor teórico: 1086,3) y 1073,0 (valor teórico: 1073,3), respectivamente.

[Tabla 1]

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos	Valor de análisis (espectrómetro de masas)	
		Valor analítico	Valor teórico
1	Ser-Pro-Val-Glu-Phe-Leu-Arg	846,7	846,9
2	Ile-Thr-Leu-Gln-Glu-Ile-Ile-Arg-Thr	1086,3	1086,3
3	Ala-Cys-Ile-His-Thr-Leu-Ser-Leu-Leu-Cys	1073,0	1073,3

Ejemplo 1: tinción de TRAP

Se realizó un intento por verificar el nivel de proteína TRAP expresada durante la diferenciación de osteoclastos mediante tinción y observar la tendencia de reducción de la misma durante el tratamiento con péptidos.

Se sembraron macrófagos Raw 264.7 en una placa de 48 pocillos a 1x10⁴ células/pocillo y, al mismo tiempo, se trataron con péptidos con diferentes concentraciones (péptido solo o junto con RANKL 50 ng/ml) y se incubaron durante 5 días para inducir la diferenciación. Se llevó a cabo la tinción de TRAP usando el kit de fosfatasa ácida (Sigma Aldrich). Se añadió el tampón de fijación, seguido por reacción durante 30 segundos y lavado con agua

destilada. Se añadió una disolución de tinción a 200 ul por pocillo, seguido por reacción a 37°C durante 30 minutos y lavado con agua destilada. Se secó el producto resultante durante un día y después se observó usando un microscopio.

5 Se observó que, en comparación con un grupo de control en el que se indujo la diferenciación de osteoclastos mediante tratamiento con RANKL para aumentar la expresión de TRAP, la expresión de TRAP se redujo de una manera dependiente de la concentración en grupos tratados con péptidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 (figuras 1a a 1c).

10 Ejemplo 2: RT-PCR de TRAP y catepsina K

Se realizó un intento por verificar los niveles de ARNm de TRAP y catepsina K expresadas durante la diferenciación de osteoclastos mediante RT-PCR y por observar las tendencias de reducción de las mismas durante el tratamiento con péptidos que se observaron.

15 Se sembraron células Raw 264.7 en una placa de 48 pocillos a una densidad celular de 1×10^4 células/pocillo. Se trataron las células con RANKL 50 ng/ml y péptidos con diferentes concentraciones (10 y 50 ug/ml) y se incubaron durante 5 días en una incubadora. Tras recogerse las células con incubación completada, se trataron las células con disolución de extracción de ARN (Easy Blue, Intron) para preparar ARN y después se sintetizó ADNc usando premezcla de RT (Intron). Se llevó a cabo PCR usando cebadores con respecto a marcadores respectivos (catepsina K y TRAP) y premezcla de PCR (Intron). Después, se cargaron 5 μ l de productos de PCR en gel de agarosa al 1%, seguido por electroforesis, y después se investigaron las bandas usando Gel-Doc. Se observó que las expresiones de TRAP y catepsina K, como marcadores de diferenciación de osteoclastos inducidos mediante tratamiento con RANKL, se redujeron mediante el tratamiento con los péptidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 (figuras 2a a 2c).

Ejemplo 3: análisis por inmunotransferencia de tipo Western de la translocación de NF- κ B

30 Con el fin de investigar la translocación nuclear de NF- κ B fomentada durante la diferenciación de osteoclastos, se realizó un intento por observar el aumento del nivel de NF- κ B en el núcleo mediante tratamiento con RANKL tras el aislamiento de proteínas nucleares y observar la tendencia de reducción del mismo mediante el tratamiento con péptidos.

35 Se sembraron macrófagos Raw 264.7 de línea de macrófagos de ratón en una placa de 6 pocillos a una densidad celular de 5×10^5 células/pocillo. Se incubaron las células durante una noche, y después se intercambió un medio por un medio libre de suero, seguido por incubación durante 6 horas. Se trataron las células con RANKL 50 ng/ml y materiales, seguido por incubación durante 30 minutos. Se extrajeron las proteínas nucleares a partir de las células con tratamiento completado, seguido por cuantificación de BCA, y después se prepararon las muestras y se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE. Se transfirieron las proteínas nucleares sobre una membrana de nitrocelulosa y después se bloquearon usando leche desnatada al 5% durante 1 hora. Se diluyó anticuerpo primario anti-p65 de NF- κ B en una disolución de bloqueo a 1:1.000, y se incubó durante la noche en una nevera. Tras lavar tres veces con PBST durante 15 minutos cada vez, se incubaron las células usando un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo-HRP a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las células con PBST durante 15 minutos tres veces cada vez, y después se llevó a cabo el desarrollo de color usando disolución de ECL.

45 Se observó que la translocación nuclear de NF- κ B inducida mediante el tratamiento con RANKL se redujo mediante el tratamiento de los péptidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 (figuras 3a a 3c).

Ejemplo 4: tinción de inmunohistoquímica para TRAP

50 Se realizó un intento por volver a verificar más claramente el nivel de expresión de TRAP como marcador expresado durante la diferenciación de osteoclastos mediante tinción fluorescente y observar la tendencia de reducción de expresión de la misma mediante el tratamiento con los péptidos que se observó.

55 Se sembraron macrófagos Raw 264.7 en una placa de 48 pocillos a 2×10^4 células/pocillo y, al mismo tiempo, se trataron con los materiales con diferentes concentraciones. Cinco días después de la inducción de la diferenciación, se añadió paraformaldehído al 4% a las células, y después se incubaron las células y se fijaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras lavarse las células tres veces con PBS, se añadió Triton X-100 al 0,3% (en PBS), seguido por incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de eso, se lavaron las células con PBS tres veces. Tras la adición de BSA al 2% (en PBS), se incubaron las células y se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 hora. Se diluyó anticuerpo primario (TRAP) en BSA al 2% a 1:100, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras lavarse las células tres veces con PBS, se diluyó el anticuerpo secundario de fusión Texas Red, en BSA al 2% a 1:100, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS tres veces, se montaron las células usando una disolución de montaje que contenía DAPI y, al día siguiente, se llevó a cabo una observación al microscopio.

5 Se observó que, en comparación con un grupo de control en el que se indujo la diferenciación de osteoclastos mediante tratamiento con RANKL para aumentar la expresión de TRAP, la expresión de TRAP se redujo de una manera dependiente de la concentración para grupos tratados con péptidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 (figuras 4a a 4c).

Ejemplo 5: tinción de inmunohistoquímica para catepsina K

10 El nivel de expresión de catepsina K como marcador expresado durante la diferenciación de osteoclastos volvió a confirmarse claramente mediante tinción fluorescente y se observó la tendencia de reducción de expresión de la misma mediante el tratamiento con los péptidos.

15 Se sembraron macrófagos Raw 264.7 en una placa de 48 pocillos a 2×10^4 células/pocillo y, al mismo tiempo, se trataron con los materiales con diferentes concentraciones. Cinco días tras la inducción de la diferenciación, se añadió paraformaldehído al 4% a las células, y después se incubaron las células y se fijaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se lavaron las células tres veces con PBS, se añadió Triton X-100 al 0,3% (en PBS), seguido por incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos, y después se lavaron las células tres veces con PBS. Tras la adición de BSA al 2% (en PBS), se incubaron las células y se bloquearon a temperatura ambiente durante 20 1 hora. Se diluyó el anticuerpo primario (catepsina K) en BSA al 2% a 1:100, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras lavarse las células tres veces con PBS, se diluyó anticuerpo secundario de fusión con FITC en BSA al 2% a 1:100, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS tres veces, se montaron las células usando una disolución de montaje que contenía DAPI y, al día siguiente, se llevó a cabo una observación al microscopio.

25 En comparación con un grupo de control en el que se indujo la diferenciación de osteoclastos mediante tratamiento con RANKL para aumentar la expresión de catepsina K, la expresión de catepsina K se redujo de una manera dependiente de la concentración para grupos tratados con péptidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 (figuras 5a a 5c).

30 <110> CAREGEN Co, .LTD.

<120> Péptidos que tienen actividades para inhibir la diferenciación y actividad de osteoclastos y usos de los mismos

35 <130> PP140079

<150> Documento KR 2014/0098362

40 <151> 31-07-2014

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

45 <210> 1

<211> 7

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Péptido 1

<400> 1

Ser Pro Val Glu Phe Leu Arg
1 5

60 <210> 2

<211> 9

65 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Péptido 2
<400> 2
10 Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Arg Thr
1 5
<210> 3
<211> 10
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Péptido 3
<400> 3
25 Ala Cys Ile His Thr Leu Ser Leu Leu Cys
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad ósea,
5 en el que la enfermedad ósea es daño óseo, osteoporosis, osteomalacia, raquitismo, osteítis fibrosa, una enfermedad ósea aplásica o una enfermedad ósea metabólica.
- 10 2. Péptido para su uso según la reivindicación 1, en el que el péptido reduce la expresión de fosfatasa alcalina resistente a tartrato (TRAP).
3. Péptido para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el péptido reduce la expresión de catepsina K.
- 15 4. Péptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el péptido inhibe la translocación nuclear de NF- κ B.

Fig. 1a

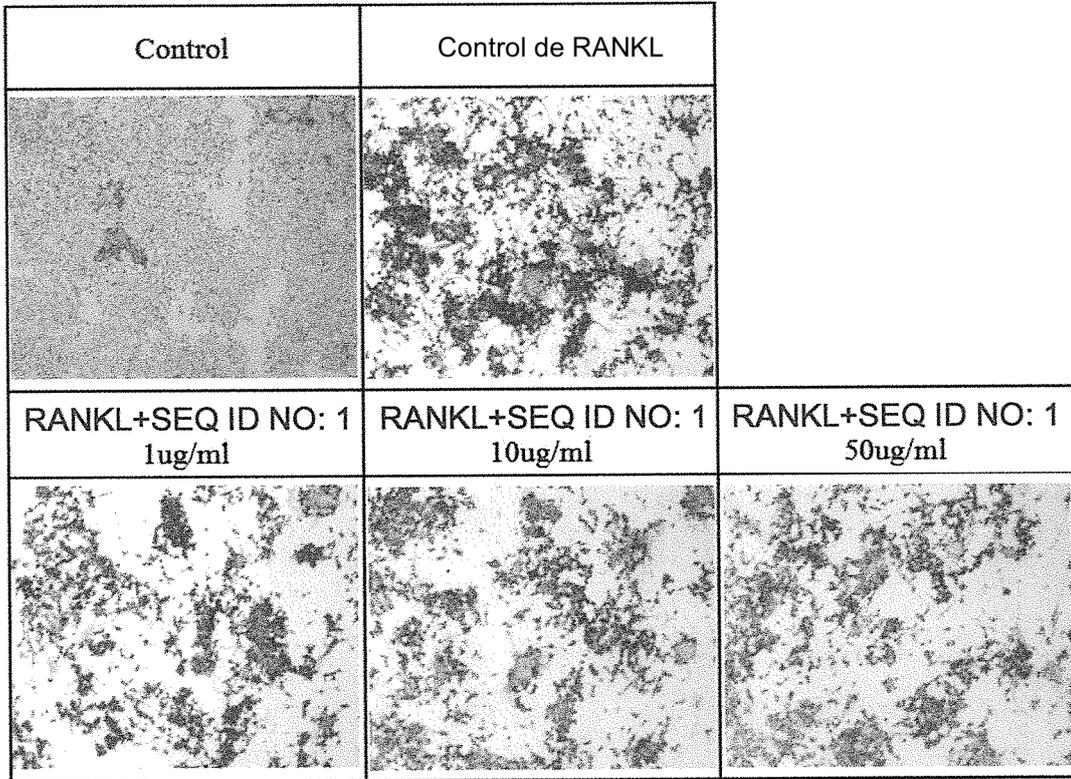


Fig. 1b

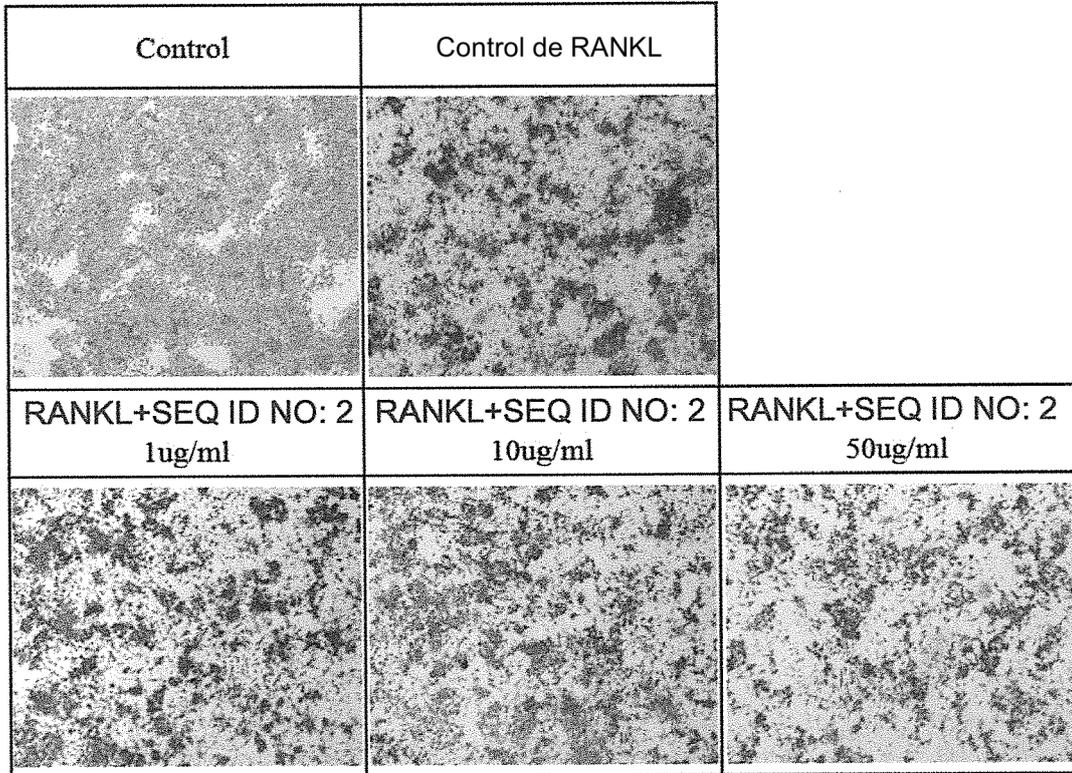


Fig. 1c

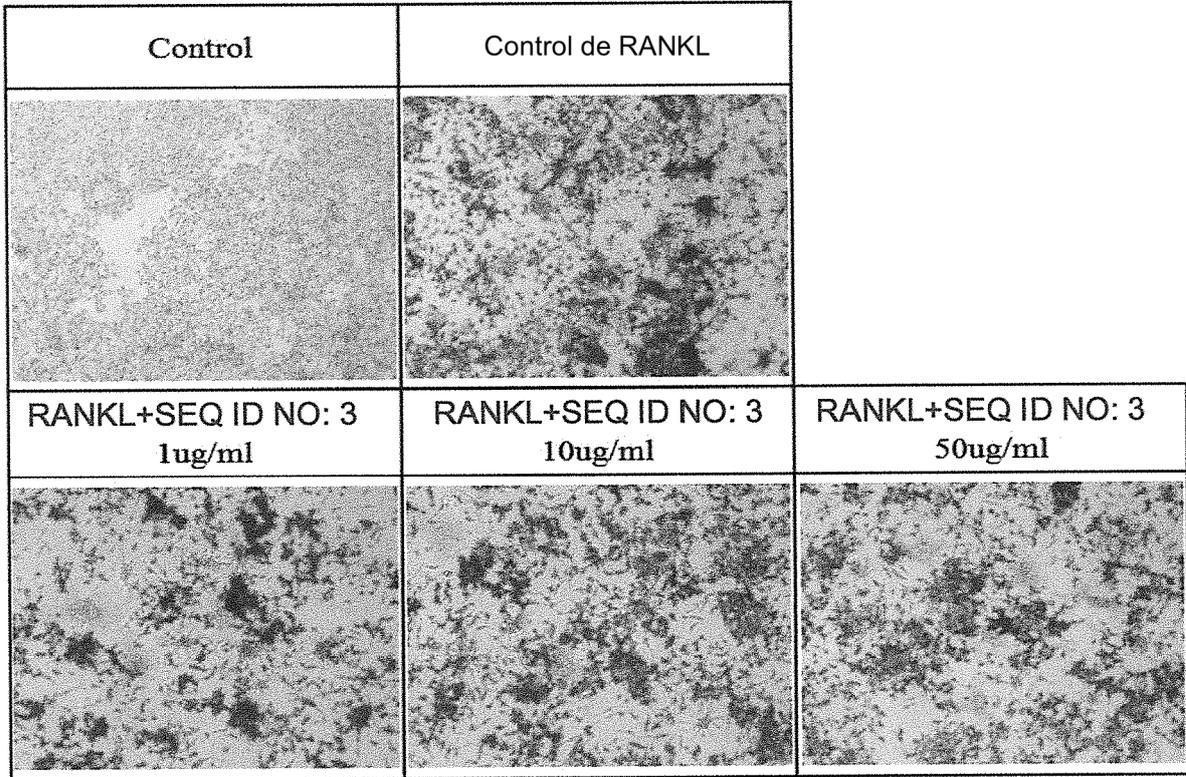
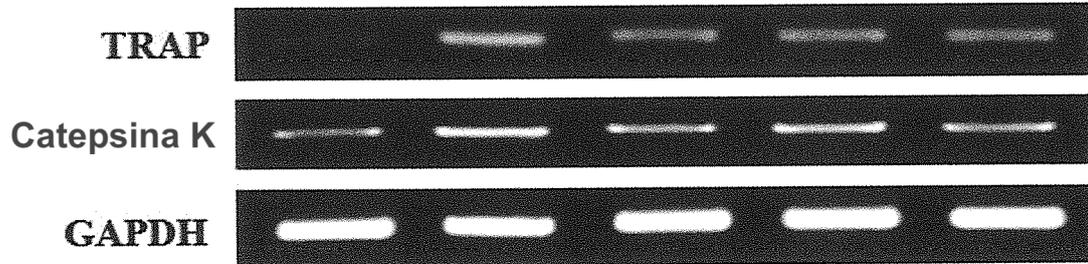
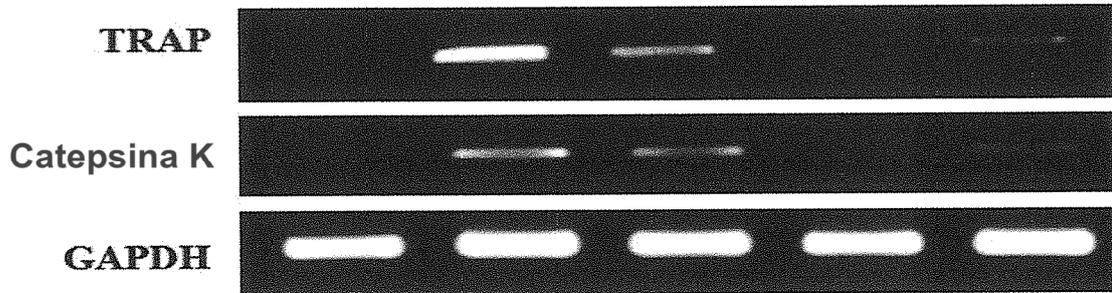


Fig. 2a



muestra	control	RANKL			
		-	SEQ ID NO: 1		
ug/ml		0,05	1	10	50

Fig. 2b



muestra	control	RANKL			
		-	SEQ ID NO: 2		
ug/ml		0,05	1	10	50

Fig. 2c

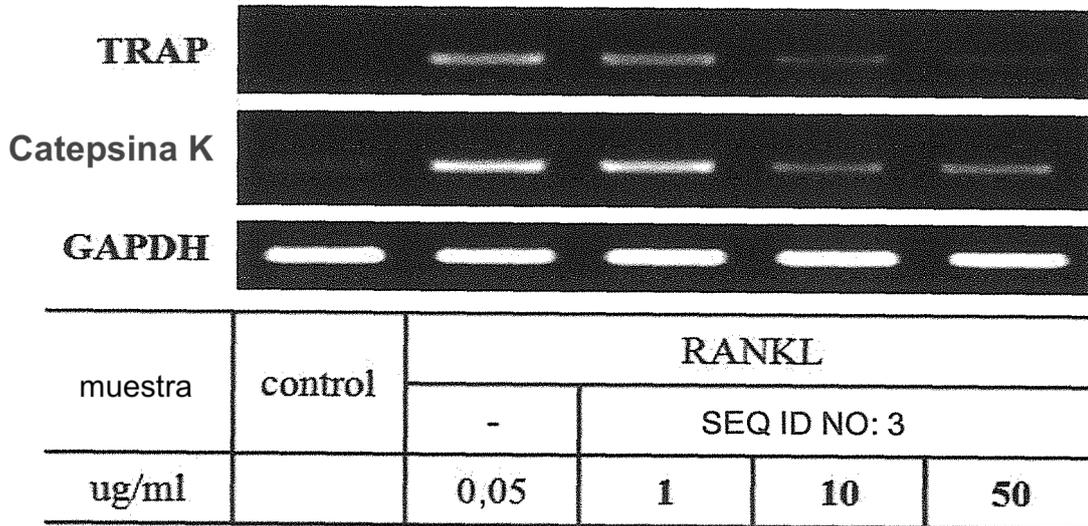
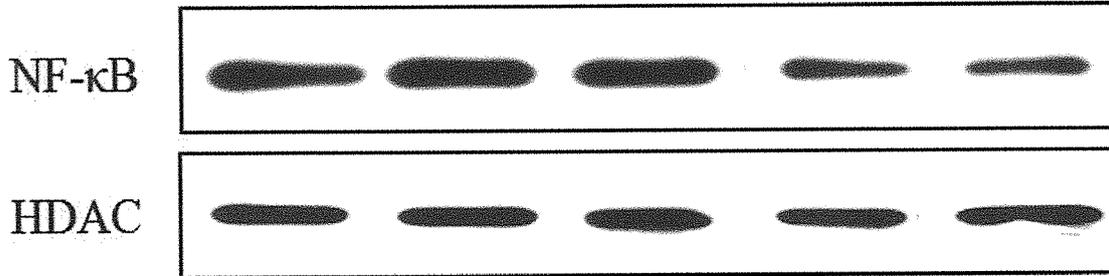


Fig. 3a



muestra	control	RANKL			
		-	SEQ ID NO: 1		
ug/ml		0,05	1	10	50

Fig. 3b

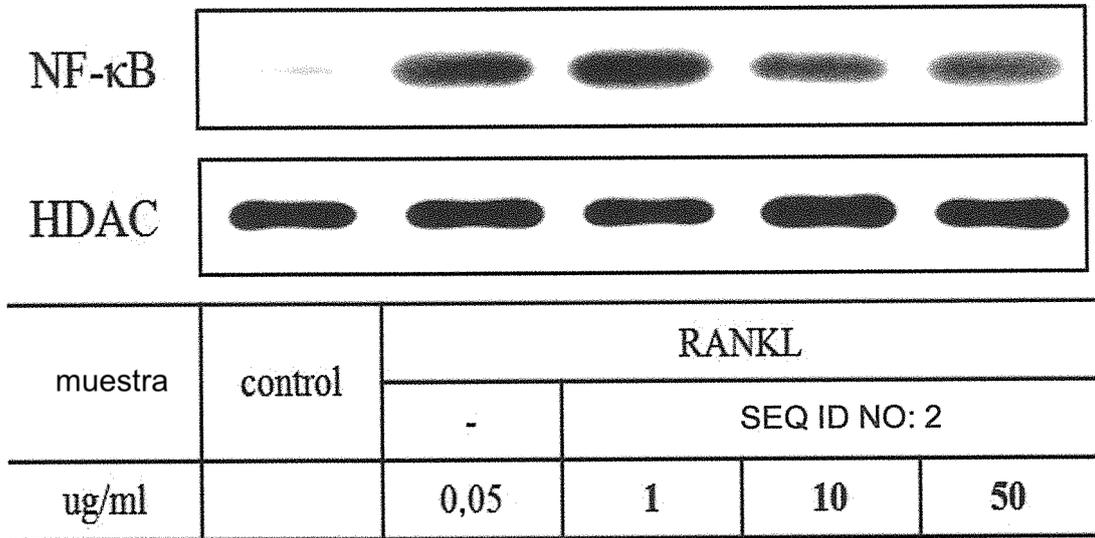
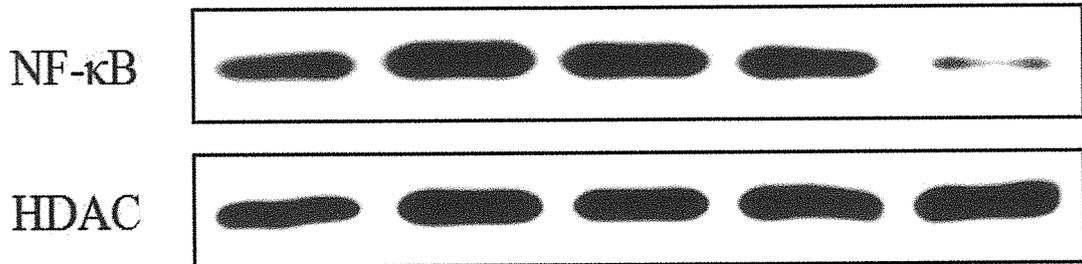


Fig. 3c



muestra	control	RANKL			
		-	SEQ ID NO: 3		
ug/ml		0,05	1	10	50

Fig. 4a

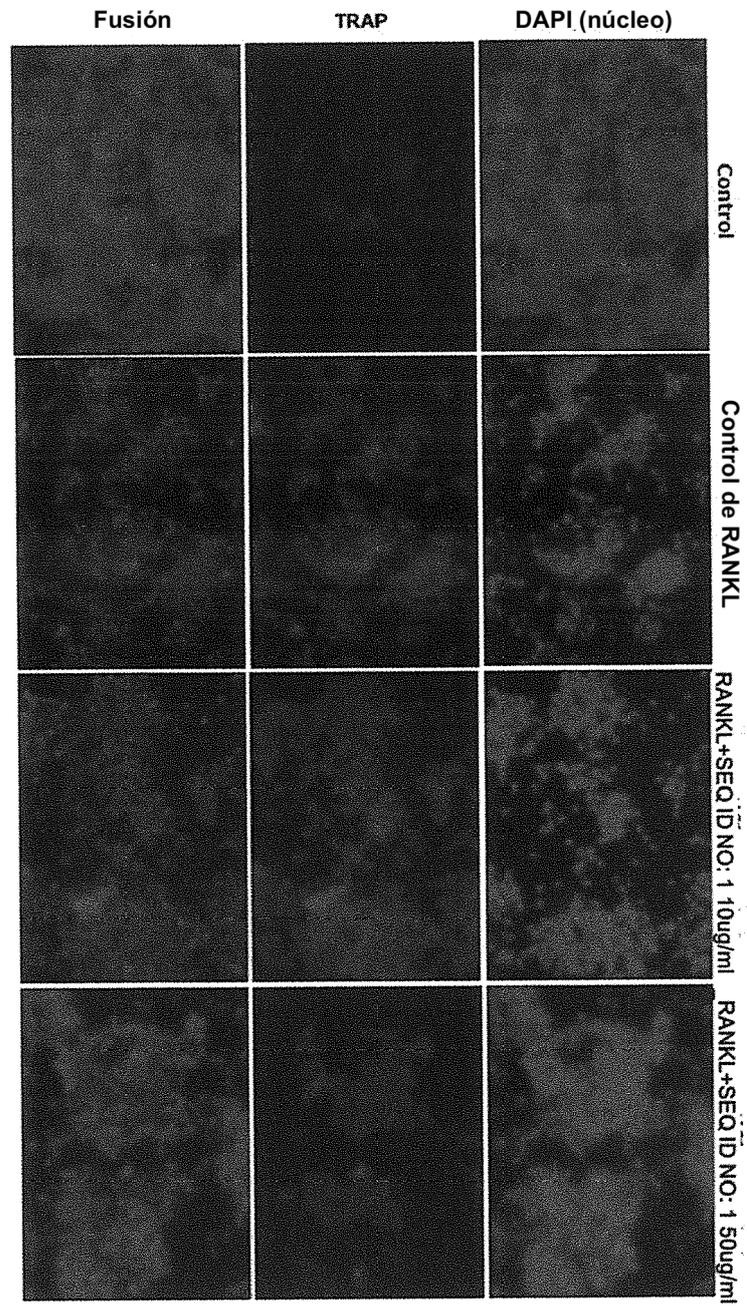


Fig. 4b

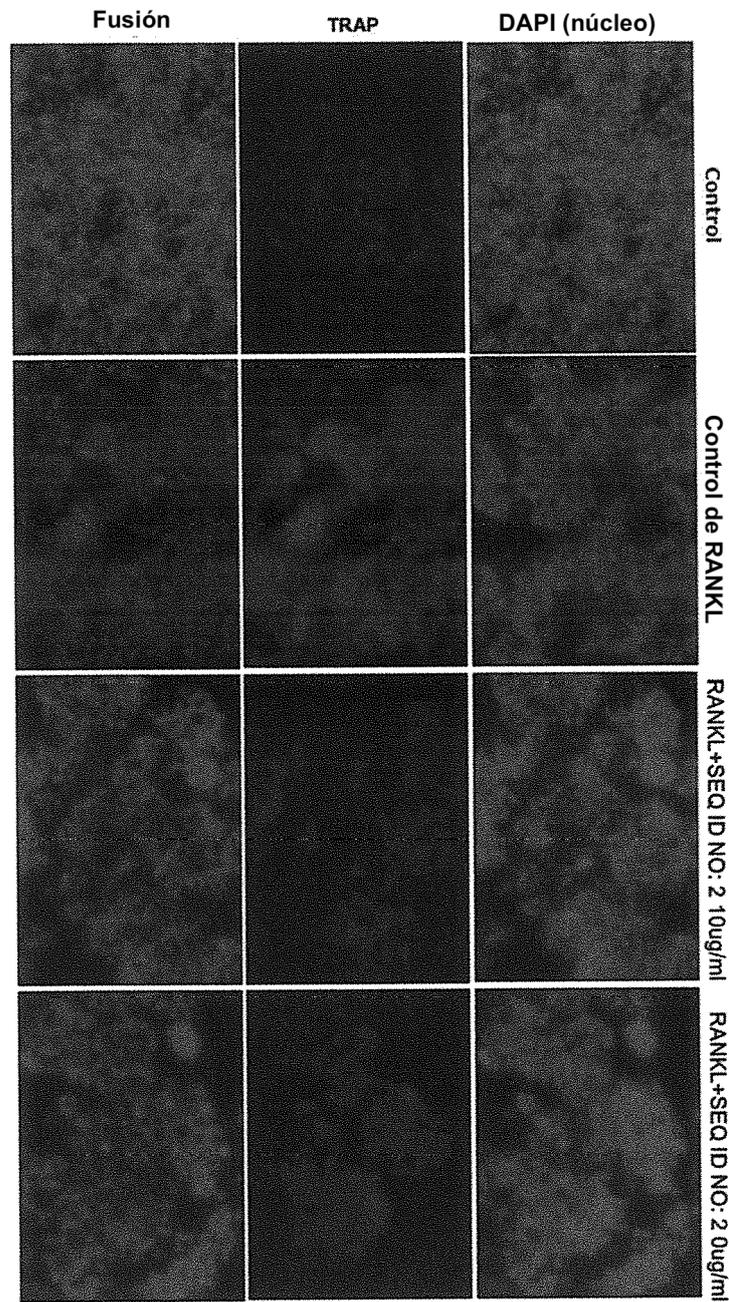


Fig. 4c

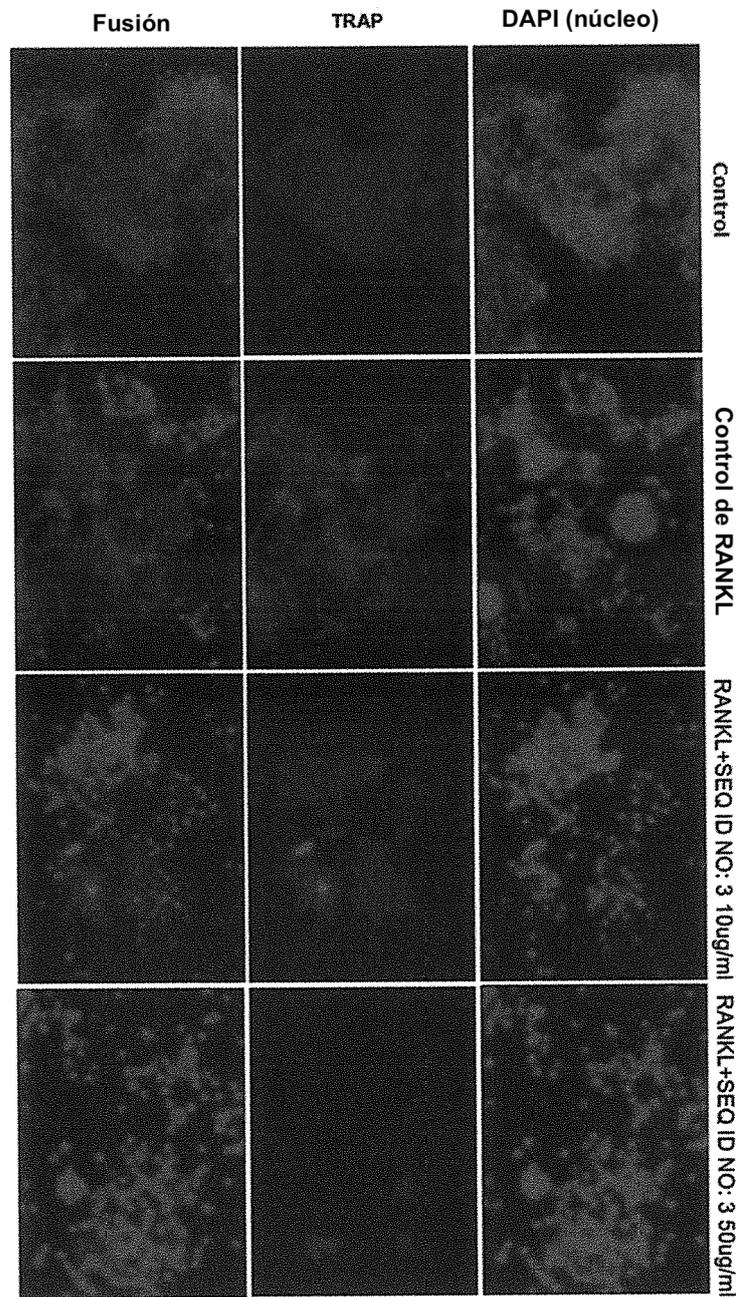


Fig. 5a

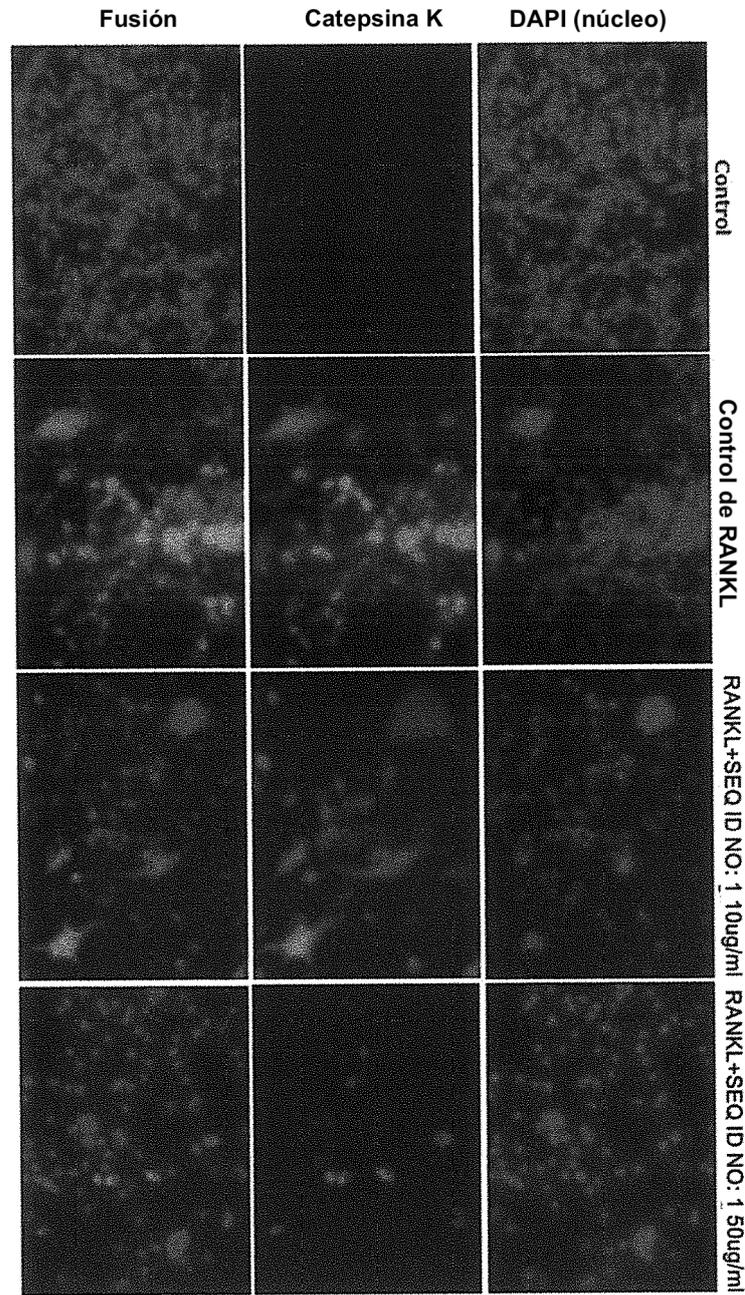


Fig. 5b

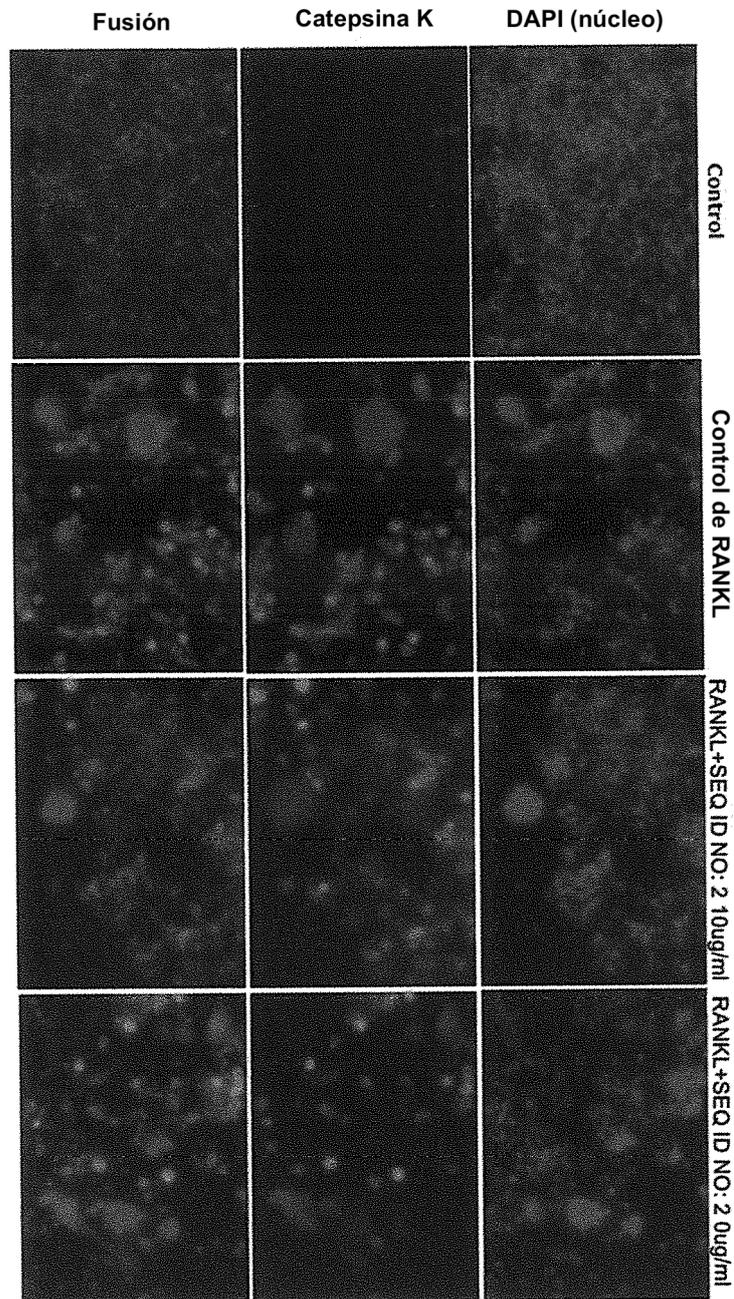


Fig. 5c

