

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 705**

21 Número de solicitud: 201230017

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

A61F 2/30 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

04.01.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.08.2013

Fecha de la concesión:

20.05.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

27.05.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/000007

73 Titular/es:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED EN BIOINGENIERÍA, BIOMATERIALES Y
NANOMEDICINA (CIBER-BBN) (50.0%)
C/ María de Luna, 11 Edif CEEI
50018 Zaragoza (Zaragoza) ES y
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VISSER, Rick;
ARRABAL GARCÍA, Pilar María;
BECERRA RATIA, José y
CIFUENTES RUEDA, Manuel**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **PÉPTIDO BIOMIMÉTICO RGD CON DOMINIO DE AFINIDAD POR EL COLÁGENO TIPO I Y
SUS USOS COMO FACTOR OSTEOGÉNICO.**

57 Resumen:

Péptido biomimético RGD con dominio de afinidad por el colágeno tipo I y sus usos como factor osteogénico. La presente invención proporciona un péptido el cual presenta capacidad osteogénica. La presente invención también se refiere a la secuencia nucleotídica que codifica para dicho péptido así como a una construcción genética que contenga la secuencia nucleotídica, a un vector que contenga la construcción genética o la secuencia y a una célula hospedadora que contenga el vector. La invención también se refiere a composiciones que incluyan el péptido así como a los usos tanto del péptido, como de composiciones o como matrices que puedan incluirlo.

ES 2 417 705 B1

DESCRIPCIÓN**Péptido biomimético RGD con dominio de afinidad por el colágeno tipo I y sus usos como factor osteogénico.**

La presente invención se encuadra en el campo de la biomedicina.

- 5 Específicamente, se refiere a un péptido, así como a la secuencia nucleotídica que lo codifica, la construcción genética que la comprenda, un vector que comprenda la secuencia o la construcción, o la célula que comprende cualquiera de ellos el vector, y a sus usos como agentes osteogénicos, así como para la elaboración de un medicamento preferiblemente para la
- 10 regeneración ósea o para el recubrimiento de implantes o prótesis. La presente invención también se refiere a una composición o a una matriz que comprenda el péptido y al uso de la composición o la matriz para la elaboración de un medicamento preferiblemente para la regeneración ósea. También se refiere al uso del péptido o de la matriz o para el recubrimiento de implantes o prótesis.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- Debido a la incidencia socioeconómica del uso de implantes óseos, la
- 20 búsqueda de mejoras para evitar rechazos, o una mejor integración en el organismo de estos implantes se ha convertido en un objetivo primordial en la medicina actual. El limitado rendimiento biológico de los implantes ortopédicos existentes en la actualidad hace necesario estudiar nuevos desarrollos que permitan funcionalizar los implantes de forma que se pueda generar tejido
- 25 alrededor de los mismos permitiendo un buen desarrollo óseo.

- En el campo de la biología ósea, la adhesión de las células a los sustratos (ya sea la propia matriz extracelular o biomateriales implantados) es fundamental para la diferenciación de células progenitoras hacia el linaje osteoblástico, así
- 30 como para que se produzca la mineralización de la matriz y, por ello, la formación de hueso nuevo. Diversos grupos han demostrado que el recubrimiento de biomateriales de diversa naturaleza como fibronectina o con péptidos biomiméticos derivados de esta u otras proteínas de la matriz

extracelular, favorece su adhesión, crecimiento y/o diferenciación de células del linaje osteoblástico en su superficie, tanto in vitro como in vivo (García *et al.* 2005, *Journal of Dental Research*, 84(5): 407-413).

- 5 Al ser este tipo de péptidos biomiméticos secuencias pequeñas, la funcionalización de materiales con ellas puede llevar a cabo por simple adsorción, la cual es inespecífica, poco eficiente y que provoca la rápida liberación y eliminación de los péptidos de esta superficie, impidiendo su utilización a largo plazo. Además la liberación de estos péptidos puede dar
- 10 lugar a efectos secundarios en regiones diferentes a la de interés produciendo complicaciones en el tratamiento. La funcionalización de materiales también se puede realizar mediante reacciones químicas o enzimáticas, lo que produce un puente molecular covalente entre la superficie del material y el péptido e interés. Esto también presenta diversas desventajas, fundamentalmente en el
- 15 campo de la cirugía ya que provoca una alta manipulación del material a implantar con los consiguientes riesgos derivados así como un coste adicional para llevar a cabo la unión.

Para la formación de hueso, alguno de los factores que se han determinado

20 como más relevantes son las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs o *bone morphogenic proteins*). A pesar de la elevada capacidad osteogénica de las BMPs, estos factores presentan diversos problemas como son la elevada cantidad de los mismos que hay que administrar al paciente (alrededor de un millón de veces la concentración local natural alrededor del implante), lo que

25 supone un alto coste y la posible generación de efectos secundarios sistémicos indeseables. Además, en los estudios clínicos se ha descrito la producción de anticuerpos frente a estas proteínas en un porcentaje de los pacientes tratados (Granjeiro *et al.* 2005, *Braz J Med Biol Res*, 38(19):1463-73), por lo que no se recomienda un segundo tratamiento con estas proteínas.

30

Por todo lo descrito, resulta necesaria la búsqueda de sustitutos más inocuos para las proteínas BMPs o bien que permitan la reducción en las dosis a

emplear, así como que permitan la funcionalización de implantes o prótesis de forma sencilla sin requerir una gran manipulación del material.

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El desarrollo de biomateriales que permitan la osteointegración de prótesis e implantes, es uno de los campos que más desarrollo están sufriendo en la actualidad. La necesidad de conseguir elementos que impidan el rechazo de las prótesis e implantes, una mejor integración de los mismos en el paciente tratando de manipularlos lo menos posible para evitar efectos adversos, y una mejora en el desarrollo óseo alrededor de las mismas, hacen necesario el desarrollo de nuevos elementos y técnicas que mejoren los elementos preexistentes y que puedan ser utilizados en clínica humana.

La presente invención proporciona un péptido (péptido CBD-RGD de secuencia SEQ ID NO:1), el cual consta de una región que presenta la capacidad de unirse al colágeno tipo I mediante un dominio CBD modificado, y que lleva asociado un dominio RGD que permite el anclaje de células osteoblásticas, por lo que promueve la formación ósea allí donde se encuentra. Por ello, este péptido puede utilizarse de forma independiente para el tratamiento de enfermedades que requieran formación ósea como por ejemplo la consolidación de fracturas ya que puede unirse al colágeno tipo I, uno de los elementos mayoritarios en el hueso, y promover la formación ósea mediante el anclaje de células osteoblásticas y promoción de expresión de marcadores osteogénicos, sin necesidad de implantes o prótesis, o bien puede utilizarse unido estos implantes o prótesis, para la formación de hueso alrededor de los mismos, e incluso unido a matrices de colágeno tipo I bien independientes o bien que se asocien a los implantes o prótesis, promoviendo el desarrollo óseo alrededor del implante o prótesis.

Los autores de la invención demuestran como el péptido de la invención promueve un aumento del marcador de diferenciación osteoblástica fosfatasa

alcalina, tanto en células procedentes de médula ósea de rata, como en la línea preosteoblástica de ratón MC3T3-E1. En la presente invención también se demuestra una mayor producción de tejido óseo en esponjas absorbibles de colágeno tipo I (ACS o *absorbable collagen sponges*) que contienen el péptido de la invención implantadas en una localización ectópica en ratas, frente a esponjas sin el péptido.

Por todo lo expuesto, un primer aspecto de la invención se refiere a un péptido aislado que comprende SEQ ID NO:1 (péptido de la invención). En una realización preferida de este aspecto de la invención el péptido de la invención consiste en SEQ ID NO:1.

El péptido de la invención puede presentar variantes. Estas variantes se refieren a variaciones limitadas en la secuencia aminoacídica, que permiten el mantenimiento de la funcionalidad del péptido. Esto quiere decir que la secuencia de referencia y la secuencia de la variante son similares en conjunto, e idénticas en muchas regiones. Estas variaciones se generan por sustituciones, deleciones o adiciones. Dichas sustituciones se dan entre aminoácidos que presentan similares características como por ejemplo en cuanto a polaridad, tamaño o carga, e incluyen, aunque sin limitarse, sustituciones entre ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp), entre lisina (Lys) y arginina (Arg), entre asparagina (Asn) y glutamina (Gln), entre serina (Ser) y treonina (Thr), y entre los aminoácidos que componen el grupo alanina (Ala), leucina (Leu), valina (Val) e isoleucina (Ile). Las variaciones pueden ser generadas artificialmente como por ejemplo mediante mutagénesis o síntesis directa. Estas variaciones no provocan modificaciones esenciales en las características o propiedades esenciales del péptido, por lo que dichas variantes mantienen su actividad biológica.

El péptido puede ser producido de forma artificial como por ejemplo, aunque sin limitarse, de forma recombinante, de forma sintética, o mediante la combinación de estos 2 métodos.

Los péptidos adicionalmente pueden encontrarse en forma madura o bien formando parte de una proteína mayor como un precursor o una proteína de fusión. Los péptidos adicionalmente pueden incluir secuencias secretoras, secuencias que permitan su purificación como colas de histidinas, 5 prosecuencias o secuencias que aumenten su estabilidad durante la producción de la proteína.

Los términos “péptido”, “polipéptido”, “proteína” o “secuencia aminoacídica” se usan de forma intercambiable en la presente invención, y se refieren a una 10 forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados.

El polipéptido de la invención es codificado por, al menos un polinucleótido que da como resultado el péptido de la invención. Un ejemplo de polinucleótido que 15 codifica para el péptido de la invención es por ejemplo, aunque sin limitarse, el polinucleótido de secuencia SEQ ID NO:2. Debido a la degeneración del código genético, en el cual diversos tripletes de nucleótidos dan lugar a un mismo aminoácido, existen diversas secuencias de nucleótidos que dan lugar a una misma secuencia aminoacídica. Estos diferentes tripletes que codifican para un 20 mismo aminoácido son conocidos en el estado de la técnica. Por todo ello otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada que codifica para el péptido de la invención (secuencia nucleotídica de la invención), o a una secuencia nucleotídica complementaria a dicha secuencia nucleotídica aislada. En una realización preferida la secuencia nucleotídica 25 aislada comprende SEQ ID NO:2. En otra realización preferida de este aspecto de la invención la secuencia nucleotídica aislada consiste en SEQ ID NO:2.

Los términos “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usan aquí de manera 30 intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados. Se refieren por tanto a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra.

Cualquiera de las secuencias nucleotídicas de la invención pueden encontrarse en la naturaleza y obtenerse por aislamiento mediante métodos conocidos en el estado de la técnica, u obtenerse de manera artificial mediante métodos de clonación y selección convencional, o mediante secuenciación.

Adicionalmente a la secuencia codificante, la secuencias de la invención pueden llevar otros elementos como por ejemplo aunque sin limitarse, intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5' o 3', sitios de unión a ribosomas, o secuencias estabilizadoras. Estos polinucleótidos adicionalmente también pueden incluir secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que puedan ser útiles por ejemplo, aunque sin limitarse, para aumentar la estabilidad del péptido generado a partir de él o permitir una mejor purificación del mismo.

La secuencia nucleotídica de la invención, para dar lugar al péptido de la invención puede encontrarse incluido en construcciones genéticas. Por ello otro aspecto de la presente invención se refiere a una construcción genética que comprende la secuencia nucleotídica de la invención (construcción genética de la invención). Esta construcción genética puede llevar incluidas secuencias de control unidas operativamente a la secuencia nucleotídica de la invención.

El término "secuencia de control", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a secuencias nucleotídicas que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias a las que están ligadas. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa. Ejemplos de secuencias de control, son por ejemplo, pero sin limitarse, promotores, señales de inicio de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, señales de poliadenilación o activadores transcripcionales.

La expresión "unidos operativamente", tal y como se utiliza en la presente

descripción, se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a un polinucleótido, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia
5 codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región del ADN, generalmente “aguas arriba” o “*upstream*” del punto de inicio de la
10 transcripción, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles. Las secuencias de control dependen del origen de la célula en la que se quiere expresar el ácido nucleico. Ejemplos de promotores procariotas
15 incluyen, por ejemplo, pero sin limitarnos, los promotores de los genes *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacI*, *tet*, *gal*, *trc*, o *tac* de *E. coli*, o el promotor del gen *alfa-amilasa* de *B. subtilis*. Para la expresión de un ácido nucleico en una célula procariota también es necesaria la presencia de un sitio de unión ribosomal situado “*upstream*” de la secuencia codificante. Secuencias de control apropiadas para
20 la expresión de un polinucleótido en células eucariotas son conocidas en el estado de la técnica.

Tanto la secuencia nucleotídica de la invención como la construcción genética de la invención que comprende la secuencia nucleotídica de la invención,
25 pueden introducirse, por ejemplo, en un vector de clonación o un vector de expresión para permitir su replicación o su expresión. Preferiblemente, dicho vector es un vector apropiado para la expresión y purificación del péptido de la invención. Por todo ello, otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector que comprende la secuencia nucleotídica de la invención, o la
30 construcción genética de la invención (vector de la invención).

El término “vector de clonación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN en la que se puede integrar otro

fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. Ejemplos de vectores de expresión son, pero sin limitarse, plásmidos, cósmidos, fagos de ADN o cromosomas artificiales de levadura.

- 5 El término “vector de expresión”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un vector de clonación adecuado para expresar un ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo tras ser introducido en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico se encuentra, generalmente, unido operativamente a secuencias control.

10

El término “expresión” se refiere al proceso por el cual se sintetiza un polipéptido a partir de un polinucleótido. Incluye la transcripción de la secuencia nucleotídica en un ARN mensajero (ARNm) y la traducción de dicho ARNm en una proteína o polipéptido. La expresión puede tener lugar en una célula

15 hospedadora, pero también mediante cualquier proceso de expresión proteica *in vivo*.

20

El polinucleótido de la invención así como la construcción genética de la invención o el vector de la invención, pueden introducirse en una célula hospedadora para su amplificación o expresión. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende la secuencia nucleotídica de la invención, la construcción genética de la invención o el vector de la invención (célula de la invención).

25

El término “célula hospedadora” o “célula huésped”, tal y como se utilizan en la presente descripción se refieren a cualquier organismo procariota o eucariota que es recipiente de un vector de expresión, de clonación o de cualquier otra molécula de ADN. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas como, por ejemplo, pero sin limitarse, *E. coli*, o eucariotas como por ejemplo,

30 aunque sin limitarse células vegetales, levaduras, células de insectos, células de anfibios o células de mamífero.

Debido a la capacidad de inducir la formación de hueso que presenta el péptido

de la invención, este puede ser utilizado como factor osteogénico, preferiblemente “in vitro”, por ejemplo para la formación de hueso de forma que posteriormente este hueso pueda ser implantado en pacientes. Este péptido puede ser utilizado directamente o ser producido mediante la secuencia nucleotídica de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para llevar a cabo esta función osteogénica. Por ello, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del péptido de la invención, de la secuencia nucleotídica de la invención, de la construcción genética, del vector de la invención o de la célula de la invención como agente osteogénico. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de la invención, de la secuencia nucleotídica de la invención, de la construcción genética, del vector de la invención o de la célula de la invención como agente osteogénico “*in vitro*”.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de la invención, la secuencia nucleotídica de la invención, la construcción genética de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para elaboración de un medicamento. Alternativamente se refiere al péptido de la invención, la secuencia nucleotídica de la invención, la construcción genética de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de la invención, la secuencia nucleotídica de la invención, la construcción genética de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas. Alternativamente se refiere al péptido de la invención, la secuencia nucleotídica de la invención, la construcción genética de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso del

péptido de la invención, la secuencia nucleotídica de la invención, la construcción genética de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones óseas donde la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos. Alternativamente se refiere al péptido de la invención, la secuencia nucleotídica de la invención, la construcción genética de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones óseas donde la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos.

El péptido de la invención puede encontrarse para su utilización de forma independiente o incluido dentro de una composición con otros elementos que proporcionen ventajas al péptido de la invención. Por tanto otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende el péptido de la invención (composición de la invención). Uno de los elementos más utilizados para promover la osteogénesis es el uso de las proteínas BMPs. En los ejemplos de la invención se demuestra que la combinación del péptido de la invención con proteínas BMPs (proteínas morfogénica ósea o *bone morphogenetic proteins*), y más concretamente con la proteína BMP-2, presenta un efecto superior al producido por la proteína BMP-2 de forma independiente. El mayor efecto de los péptidos usados en combinación hace que usados juntos se reduzca la cantidad de BMP a utilizar para promover la osteogénesis y por tanto se eliminan los costes y los efectos secundarios del uso de grandes cantidades de estas proteínas, así como la posibilidad de su diseminación sistémica. Esto hace que dentro de los elementos que se pueden incluir dentro de la composición para potenciar el efecto del péptido de la invención se encuentren las proteínas BMP. Por ello, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP. En una realización más preferida de este aspecto de la invención la proteína BMP es la proteína BMP-2

o la proteína BMP-7. En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención la proteína BMP es la proteína BMP-2.

Debido a la capacidad osteogénica del péptido de la invención o de la combinación del péptido de la invención junto a las proteínas BMPs, otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que comprende el péptido de la invención como agente osteogénico, `preferiblemente “*in vitro*”. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP como agente osteogénico, preferiblemente “*in vitro*”. En una más realización preferida de este aspecto de la invención, la proteína BMP es la proteína BMP-2 o la proteína BMP-7. En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención la proteína BMP es la proteína BMP-2.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que comprende el péptido de la invención para la elaboración de un medicamento, o alternativamente a una composición que comprende el péptido de la invención para su uso como medicamento. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7 y más preferiblemente BMP-2, para la elaboración de un medicamento, o alternativamente a una composición que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7 y más preferiblemente BMP-2, para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que comprende el péptido de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas, o alternativamente para su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que comprende el péptido de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas donde

la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos, o alternativamente a una composición que comprende el péptido de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas donde la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos.

Otra realización preferida se refiere al uso de una composición que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7 y más preferiblemente BMP-2, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas, o alternativamente a una composición que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7 y más preferiblemente BMP-2, para su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7 y más preferiblemente BMP-2, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas donde la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos, o alternativamente a una composición que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7 y más preferiblemente BMP-2, para su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas donde la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos.

Debido a la capacidad del péptido de promover la formación de hueso allí donde se encuentra como se demuestra en la presente invención, una de las aplicaciones del péptido de la invención es el recubrimiento de implantes o

prótesis para provocar la osificación alrededor o sobre los mismos de forma que estos queden integrados de forma adecuada en el organismo. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de la invención para el recubrimiento de implantes o prótesis. Además, gracias a la capacidad del péptido de la invención de unirse a colágeno tipo I y permanecer anclado al mismo promoviendo la osificación en la región a la que se encuentra anclado, el péptido de la invención también resulta útil para el recubrimiento de prótesis que previamente han sido recubiertas con colágeno tipo I para mejorar la compatibilidad con el organismo y por su capacidad osteoconductora. Por tanto, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de la invención para el recubrimiento de implantes o prótesis donde el implante o prótesis ha sido previamente recubierto con colágeno tipo I.

Debido a que el péptido se puede encontrar incluido dentro de una composición, estas presentan similar utilidad que el péptido de la invención de forma aislada. Por tanto, una de las aplicaciones fundamentales de la composición de la invención es el recubrimiento de implantes o prótesis para provocar la osificación alrededor o sobre los mismos de forma que estos queden integrados de forma adecuada en el organismo. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que comprende el péptido de la invención para el recubrimiento de implantes o prótesis. Una realización preferida se refiere al uso de una composición que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7 y más preferiblemente BMP-2, para el recubrimiento de implantes o prótesis. Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7 y más preferiblemente BMP-2, para el recubrimiento de implantes o prótesis donde el implante o prótesis ha sido previamente recubierto con colágeno tipo I.

El recubrimiento de prótesis o implantes en la presente invención puede ser un recubrimiento total o parcial en función de las necesidades de cada caso.

Se entiende por “implante” en la presente invención todo aquel objeto o material biocompatible que se inserta o se fija en el organismo y que tiene como función sustituir o mejorar una estructura biológica normal, dañada o ausente.

5

Se entiende por “prótesis” en la presente invención todo aquel elemento artificial que sirve para sustituir una parte del organismo dañada, o bien que proporciona una parte del organismo previamente ausente por cualquier causa.

- 10 En la presente invención, los medicamentos que comprenden el péptido de la invención, la secuencia nucleotídica de la invención, la construcción genética de la invención, el vector de la invención, o la composición de la invención comprenden estos elementos en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por "cantidad terapéuticamente efectiva" la cantidad de de estos
- 15 elementos que produzcan el efecto deseado. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia del individuo al que le va a ser administrado el medicamento.

- 20 Por otro lado, los diferentes elementos de la invención en función de su naturaleza pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Además los diferentes elementos pueden combinarse con otros elementos como por ejemplo otro/s principio/s
- 25 activo/s, excipiente/s y/o vehículo/s farmacéuticamente aceptable/s.

- El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la. Así pues, los excipientes
- 30 podrían tener la función de mantener los elementos unidos, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El “vehículo farmacéuticamente aceptable”, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición.

Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Como se demuestra en los ejemplos el péptido puede llevar a cabo su acción de forma independiente o unido a una matriz de colágeno como son las esponjas absorbibles de colágeno (ACS). Esto se debe a la capacidad que tiene el péptido de la invención de anclarse al colágeno y permanecer unido a él sin producirse apenas dispersión del péptido. De esta forma el efecto se lleva a cabo de forma localizada en la región donde se implanta la matriz de colágeno. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una matriz de colágeno tipo I (matriz de la invención) que comprende el péptido de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una matriz de colágeno tipo I que comprende el péptido de la invención para la elaboración de un medicamento, o alternatively se refiere a una matriz de colágeno que comprende el péptido de la invención para su uso como medicamento.

Se entiende por “matriz de colágeno” en la presente invención a cualquier estructura porosa compuesta total o parcialmente por colágeno tipo I, obtenida

de cualquier fuente natural o artificial.

- Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una matriz de colágeno tipo I que comprende el péptido de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas, o alternatively se refiere a una matriz de colágeno que comprende el péptido de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de una matriz de colágeno tipo I que comprende el péptido de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones óseas donde la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos, o alternatively se refiere a una matriz de colágeno que comprende el péptido de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas donde la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos.
- Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una matriz de colágeno tipo I que comprende el péptido de la invención para el recubrimiento de implantes o prótesis.

- El péptido de la invención también presenta utilidad tanto de forma independiente como integrado en matrices de colágeno tipo I para la diferenciación de diversos tipos celulares, como por ejemplo, aunque sin limitarse, diferenciación a cardiomiocitos o fibroblastos. En caso de utilizarse matrices de colágeno que comprenden el péptido y según el tipo celular utilizado, la matriz puede presentar diversas aplicaciones. Por ejemplo, en caso de diferenciarse a cardiomiocitos, la matriz que comprende el péptido de la invención presentaría utilidad para el tratamiento de enfermedades que necesiten regeneración miocárdica, como por ejemplo, aunque sin limitarse, infarto de miocardio, enfermedad isquémica cardiaca. Por otro lado, en caso de

diferenciarse a fibroblastos, la matriz que comprende el péptido de la invención presentaría utilidad para el tratamiento de enfermedades que necesiten regeneración corneal, o regeneración de la piel, como por ejemplo, aunque sin limitarse, lesiones corneales, síndrome de ojo seco, quemaduras, úlceras vasculares crónicas.

La matriz de colágeno además del péptido de la invención puede llevar otros elementos útiles para la osteogénesis, como por ejemplo aunque sin limitarse proteínas BMPs. En los ejemplos de la invención se demuestra como en esponjas de colágeno tipo I cargadas con el péptido de la invención y la proteína morfogénica 2 la formación de hueso es mayor que solo con la proteína BMP, uno de los elementos más utilizados para promover la osificación. Por todo esto, otro aspecto de la invención se refiere a una matriz de colágeno tipo I que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7 y más preferiblemente BMP-2.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una matriz de colágeno tipo I que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7, y más preferiblemente BMP-2, para la elaboración de un medicamento, o alternatively se refiere a una matriz de colágeno que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7, y más preferiblemente BMP-2, para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una matriz de colágeno tipo I que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7, y más preferiblemente BMP-2, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas, o alternatively se refiere a una matriz de colágeno que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7, y más preferiblemente BMP-2, para su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas. Una realización preferida de este aspecto de la invención se

refiere al uso de una matriz de colágeno tipo I que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7, y más preferiblemente BMP-2, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones óseas donde la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos, o alternativamente se refiere a una matriz de colágeno que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7, y más preferiblemente BMP-2, para su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas donde la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una matriz de colágeno tipo I que comprende el péptido de la invención y al menos una proteína BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7, y más preferiblemente BMP-2, para el recubrimiento de implantes o prótesis.

Debido al recubrimiento de las prótesis o implantes con el péptido de la invención o la matriz de la invención, estas prótesis presentan la capacidad de regenerar hueso y por tanto presentan similar utilidad que el péptido o la matriz de la invención, permitiendo la aplicación del péptido o la matriz de forma localizada minimizando la dispersión, provocando un mejor efecto en su utilización. Por tanto otro aspecto de la invención se refiere a una prótesis o implante recubierto por el péptido de la invención. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una prótesis o implante recubierto por el péptido de la invención para la elaboración de un medicamento o alternativamente para su uso como medicamento. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una prótesis o implante recubierto por el péptido de la invención para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas, o alternativamente para su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas. Una realización de este aspecto de la invención se refiere al uso de una prótesis o implante recubierto por el péptido

de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones óseas donde la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos, o alternativamente para su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas donde la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a una prótesis o implante recubierto por una matriz de colágeno tipo I que comprende el péptido de la invención y preferiblemente al menos una proteína BMP, más preferiblemente BMP-2 o BMP-7 y aun más preferiblemente BMP-2..

15 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una prótesis o implante recubierto por una matriz de colágeno tipo I que comprende el péptido de la invención y preferiblemente al menos una proteína BMP, más preferiblemente BMP-2 o BMP-7 y aun más preferiblemente BMP-2 para la elaboración de un medicamento o alternativamente para su uso como medicamento.

20

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una prótesis o implante recubierto por una matriz de colágeno tipo I que comprende el péptido de la invención y preferiblemente al menos una proteína BMP, más preferiblemente BMP-2 o BMP-7 y aun más preferiblemente BMP-2 para el tratamiento y/o la

25 prevención de enfermedades o lesiones óseas, o alternativamente para su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de una prótesis o implante recubierto por una matriz de colágeno

tipo I que comprende el péptido de la invención y preferiblemente al menos una

30 proteína BMP, más preferiblemente BMP-2 o BMP-7 y aun más preferiblemente BMP-2 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones óseas donde la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales,

resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos, o alternativamente para su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas donde la enfermedad o lesión ósea se selecciona de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Con la intención de complementar la descripción que se ha llevado a cabo, así como de ayudar a un mejor entendimiento de las características de la invención, de acuerdo con algunos ejemplos realizados, se muestran aquí, con carácter ilustrativo y no limitante, las siguientes figuras:

Figura 1. Curva de liberación del péptido CBD-RGD de esponjas absorbibles de colágeno tipo I.

Figura 2. Actividad ALP en cultivos de células MC3T3-E1 (A) o células madre mesenquimales de rata (B) en respuesta a CBD-RGD soluble. N = 8; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Excepto donde se indique, las comparaciones están hechas con la condición control correspondiente al mismo número de días en cultivo.

Figura 3. Mineralización de la matriz extracelular por células madre mesenquimales de rata (A y B) en respuesta a CBD-RGD soluble. N=6; *

$p < 0,05$.

Figura 4. Contenido en calcio del hueso ectópico formado por ACSs cargadas con 300 ng BMP-2 ó 300 ng BMP-2 + 5 µg CBD-RGD, 14 y 21 días tras su implantación. N = 6; ** $p < 0,01$. Nótese que el valor de las barras correspondientes a BMP-2 es cero a ambos tiempos.

Figura 5. Formación de hueso ectópico *in vivo*. A, B y C, D: ACSs cargadas con 300 ng BMP-2, recuperadas 14 y 21 días tras la cirugía, respectivamente. E, F and G, H: ACSs cargadas con 300 ng BMP-2 + 5 µg CBD-RGD, recuperadas 14 y 21 días tras la cirugía, respectivamente. Las imágenes b, d, f y h muestran detalles de B, D, F y H, respectivamente. Las muestras fueron teñidas con hematoxilina-eosina (A, B, E y F) o usadas para la detección de osteopontina por inmunocitoquímica (C, D, G y H). Flechas: osteocitos; puntas de flecha: trabéculas óseas. Escala figuras A, B, C, D, E, F, G y H 1cm – 400 µm. Escala figuras b, d, f y h 1cm – 100 µm.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1. Ensayo de pegada del péptido CBD-RGD a esponjas de colágeno tipo I

Se cortaron esponjas absorbibles de colágeno tipo I bovino (ACSs) en discos de 5 mm de diámetro y 1 mm de grosor. Las esponjas fueron lavadas con 25 mM tampón fosfato (PB), pH 6,2 y dejadas secar durante varias horas en una

cámara de flujo laminar. Una vez secas, se cargaron las esponjas con 5 µg CBD-RGD (2,95 µmol) en 10 µL of PB, pH 6,2 y se volvieron a dejar secar. Para cuantificar la liberación del péptido, las esponjas se lavaron secuencialmente con 15 µL de tampón fosfato salino (PBS), pH 7,2 y la
 5 concentración de CBD-RGD en las fracciones de lavado se estimó mediante espectrofotometría a 205 nm. Como control y para realizar el blanco del espectrofotómetro se usaron esponjas cargadas únicamente con vehículo, que fueron lavadas de la misma manera. N=4. Los resultados del experimento se muestran en la figura 1.

10

EJEMPLO 2. Ensayos de actividad fosfatasa alcalina sobre cultivos celulares

15 Para determinar el efecto del péptido CBD-RGD en forma soluble sobre células de la línea osteoblástica se cultivaron preosteoblastos de ratón MC3T3-E1 y células madre mesenquimales (MSCs) procedentes de médula ósea de rata en medio alpha-MEM (Sigma–Aldrich) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) y 2 mM L-glutamina, a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂
 20 (condiciones estándar). Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos (Nunc, Nunc) a una densidad de $7,5 \times 10^3$ células/pocillo e incubadas durante 3 horas bajo condiciones estándar. Una vez adheridas al fondo de los pocillos, las células fueron lavadas con alpha-MEM con 2% FBS y 2 mM L-glutamina e incubadas durante otra hora. Finalmente, el medio fue retirado de
 25 los pocillos y sustituido por alpha-MEM con 2% FBS, 2 mM L-glutamina, 0,2 mM L-ascorbato y CBD-RGD (0, 0,25, 1 ó 4 µM). La actividad fosfatasa alcalina (ALP) en los cultivos fue estimada tras 3 y 10 días de cultivo, lavando las células PBS y midiendo la actividad enzimática empleando un método basado en pNPP (Sigma Fast™ p-nitrophenyl phosphate tablets, Sigma–Aldrich). N=8
 30 para cada condición. Los resultados se muestran en las figuras 2A y 2B.

EJEMPLO 3. Ensayos de mineralización sobre cultivos celulares

Con el fin de determinar si el péptido CBD-RGD es capaz de promover la mineralización de la matriz extracelular en cultivos celulares, se sembraron células MSCs de rata a una densidad de 2×10^5 células/pocillo en placas de 12 pocillos, en medio alpha-MEM con 2% FBS, 2 mM L-glutamina, 0,2 mM L-ascorbato y CBD-RGD (0, 0,25, 1 o 4 μ M). Las células fueron cultivadas durante 21 días, con cambios completos de medio a los días 7 y 14. A los 21 días, los nódulos mineralizados fueron teñidos con rojo de alizarina S (Sigma-Aldrich) para su visualización y, finalmente, el colorante fue extraído para permitir su cuantificación espectrofotométrica. De forma resumida, las células fueron fijadas con formaldehído tamponado, teñidas con una solución 40 mM de rojo de alizarina S y lavadas abundantemente para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente, el colorante fue extraído con ácido acético, neutralizado con hidróxido amónico y cuantificado por medida de la absorbancia a 405 nm. N=6 para cada condición. Los resultados se muestran en la figura 3.

EJEMPLO 4. Cirugía de animales

El cuidado de los animales y los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo siguiendo las directrices de la legislación nacional (RD 1201/2005) e internacional (Directive 2010/63/EU) que regula la protección de animales empleados para fines científicos. Los procedimientos fueron igualmente aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Málaga. Para el estudio se usaron doce ratas macho Wistar de 3 meses de edad y tanto su estabulado como las cirugías se llevaron a cabo en las instalaciones del animalario de la Universidad de Málaga. Se cortaron discos de esponja absorbible de colágeno tipo I de 5 mm de diámetro y 1 mm de grosor, que se cargaron con 300 ng de BMP-2, 5 μ g CBD-RGD ó 300 ng BMP-2 + 5 μ g CBD-RGD, y se dejaron secar durante una hora en campana de flujo laminar antes de su implantación. Como control negativo se emplearon discos incubados únicamente con vehículo. Los animales fueron anestesiados, se les afeitó y desinfectó la región dorsal y se

realizó un corte longitudinal en la piel para implantar las ACSs en bolsillos musculares abiertos en los músculos dorsales. Tras la cirugía, los animales fueron mantenidos en jaulas individuales con acceso ilimitado a agua y comida. La mitad de los animales fueron sacrificados a los 14 días, mientras que la otra
 5 mitad se sacrificó en el día 21. En cada extracción, los implantes ectópicos fueron diseccionados de los tejidos circundantes y usados para medir su contenido en calcio (N=6 para cada condición) o ser sometidos a análisis histológico (N=3 para cada condición).

10

EJEMPLO 5. Medida de calcio en implantes ectópicos

Las muestras ectópicas extraídas para estimar su contenido en calcio fueron lavados con 0,9% NaCl durante 2 horas con varios cambios para eliminar el
 15 exceso de sangre. Cada implante fue incubado posteriormente en 0,5 ml de 10% HCl durante 24 horas a temperatura ambiente para solubilizar todo el calcio contenido. Se tomaron 10 µl de cada muestra para estimar su concentración de calcio empleando un método colorimétrico basado en el uso de o-cresolftaleína complexona (Calcium OCC, Cromatest). Los resultados se
 20 muestran en la figura 4.

EJEMPLO 6. Análisis histológico de las muestras in vivo

25 Los implantes ectópicos extraídos para su análisis histológico fueron fijados en 4% formaldehído tamponado neutro durante 18 horas, descalcificadas con Decalcifier II (Surgipath, Richmond, IL, USA) durante 4 horas e incluidas en parafina. Se realizaron cortes transversales de 10 µm de grosor, que fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H-E) o mediante inmunocitoquímica
 30 empleando un anticuerpo anti-osteopontina y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón biotinilado. Los resultados se muestran en la figura 5 y se detallan en el ejemplo 7.

EJEMPLO 7. Evaluación de la osificación ectópica *in vivo*.

Las esponjas control, cargadas únicamente con vehículo, no pudieron ser recuperadas en ningún caso debido a la completa reabsorción de las mismas. Aquellas que fueron cargadas únicamente con CBD-RGD dieron lugar a un tejido fibrótico denso sin mostrar señal de osteogénesis en su interior, lo que indicó que el péptido solo no fue capaz de inducir la formación de hueso en un ambiente muscular. Las esponjas cargadas con 300 ng de BMP-2 tampoco mostraron indicios claros de osteogénesis a los 14 ó 21 días tras su implantación. Si bien la apariencia de estos implantes al día 14 mostraba cierta similitud con los primeros estadios de osificación ectópica, con una gran infiltración de células y la formación de material extracelular fuertemente eosinofílico, los implantes no fueron capaces de progresar hacia la formación de hueso y no se pudo apreciar ninguna organización trabecular en el día 21. En estos implantes, la expresión de osteopontina no estaba focalizada en áreas concretas, sino más bien se limitaba a pequeños grupos de células dispersos por las esponjas. Por el contrario, las ACSs que fueron cargadas con BMP-2 + CBD-RGD ya mostraban trabéculas óseas al día 14, con osteocitos claramente definidos dentro de la matriz mineralizada. Si bien estos implantes no experimentaron una gran progresión tras una semana más, aún se podían apreciar trabéculas de aspecto maduro en las esponjas al día 21. Estas observaciones correlacionan bien con la expresión de osteopontina detectada, la cual era mayor al día 14 y disminuía al día 21. Sin embargo, este marcador seguía expresándose abundantemente en las cercanías de las trabéculas óseas remanentes, indicando que en esas áreas seguía teniendo lugar un proceso osteogénico activo.

Cuando se analizaron los contenidos de calcio de los implantes, no fue posible detectar calcio en las ACSs cargadas únicamente con BMP-2 a ninguno de los tiempos analizados. Por el contrario, los implantes cargados con BMP-2 + CBD-RGD ya contenían cantidades detectables de calcio al día 14, multiplicándose esta cantidad por ocho en la semana siguiente.

EJEMPLO 8. Análisis estadísticos

- 5 Todos los datos fueron representados como la media \pm desviación estándar. El análisis estadístico de los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* se realizó mediante t de Student, comparando cada condición con el control correspondiente al mismo tiempo. El análisis de los datos obtenidos de la estimación del contenido de calcio de los implantes ectópicos se realizó
- 10 mediante t de Student, comparando las dos condiciones a un mismo tiempo. Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa SigmaPlot 11.0.

REIVINDICACIONES

1. Péptido aislado que comprende SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Péptido aislado según la reivindicación 1 que consiste en SEQ ID NO: 1.
3. Secuencia nucleotídica que codifica para un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
- 10 4. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 3 que comprende SEQ ID NO: 2.
5. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 4 que consiste en SEQ ID NO: 2.
- 15 6. Construcción genética que comprende una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
7. Vector que comprende una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o una construcción genética según la reivindicación 6.
- 20 8. Célula hospedadora que comprende una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, una construcción genética según la reivindicación 6 o vector según la reivindicación 7.
- 25 9. Composición que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
- 10.Composición según la reivindicación 9 que además comprende al menos una proteína BMP.
- 30 11.Composición según la reivindicación 10 donde la proteína BMP se selecciona de la lista que comprende BMP-2 y BMP-7.
- 35 12.Composición según la reivindicación 11 donde la proteína BMP es BMP-2.

13. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, de una
secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, de
una construcción genética según la reivindicación 6, de un vector según la
reivindicación 7, de una célula hospedadora según la reivindicación 8 o de
5 una composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 como
agente osteogénico *in vitro*.
14. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, de una
secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, de
10 una construcción genética según la reivindicación 6, de un vector según la
reivindicación 7, de una célula hospedadora según la reivindicación 8 o de
una composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para la
elaboración de un medicamento.
- 15 15. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, de una
secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, de
una construcción genética según la reivindicación 6, de un vector según la
reivindicación 7, de una célula hospedadora según la reivindicación 8 o de
una composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para la
20 elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de
enfermedades o lesiones óseas.
16. Uso según la reivindicación 15 donde el medicamento es para el tratamiento
y/o prevención de enfermedades o lesiones óseas seleccionadas de la lista
25 que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas,
pseudoartrosis y callos hipertróficos.
17. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o de una
composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para el
30 recubrimiento de implantes o prótesis.
18. Uso según la reivindicación 17 donde el implante o prótesis ha sido
previamente recubierto con colágeno tipo I.

19. Matriz de colágeno tipo I que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
- 5 20. Matriz según la reivindicación 19 que además comprende al menos una proteína BMP.
21. Matriz según la reivindicación 20 donde la proteína BMP se selecciona de la lista que comprende BMP-2 y BMP-7.
- 10 22. Matriz según la reivindicación 21 donde la proteína BMP es BMP-2.
23. Uso de una matriz según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22 para la elaboración de un medicamento.
- 15 24. Uso de una matriz según la reivindicación 23 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o lesiones óseas.
- 20 25. Uso de una matriz según la reivindicación 24 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones óseas seleccionadas de la lista que comprende: fracturas, fusiones espinales, resecciones óseas, pseudoartrosis y callos hipertróficos.
- 25 26. Uso de una matriz según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22 para el recubrimiento de implantes o prótesis.
27. Prótesis o implante recubierto por un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o por una matriz según cualquiera de las
- 30 reivindicaciones 19 a 22.

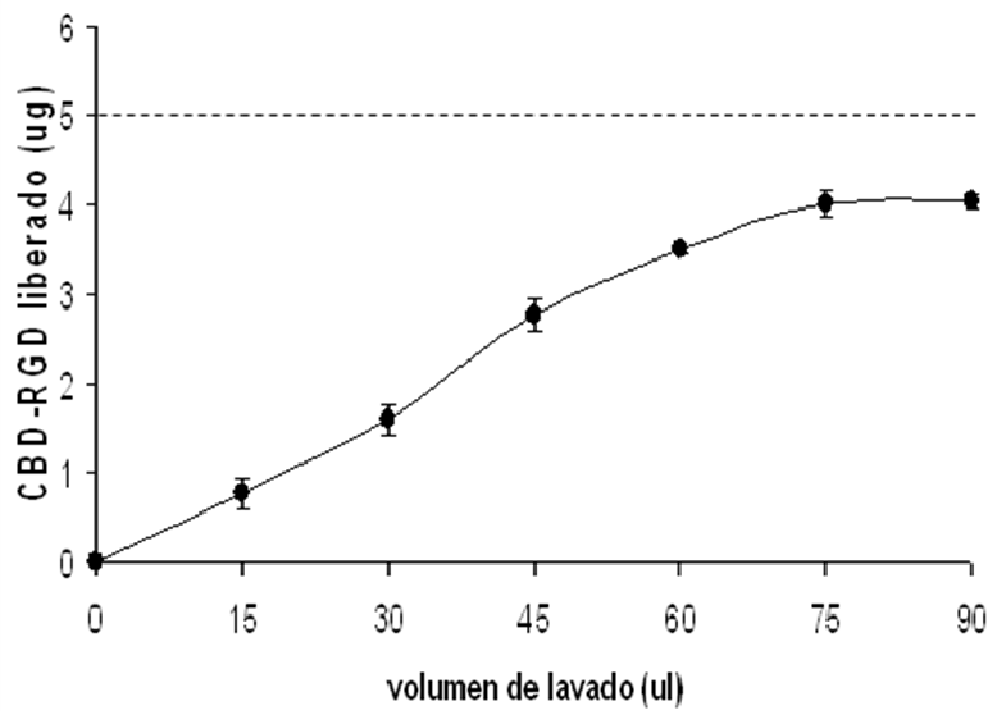
Fig. 1

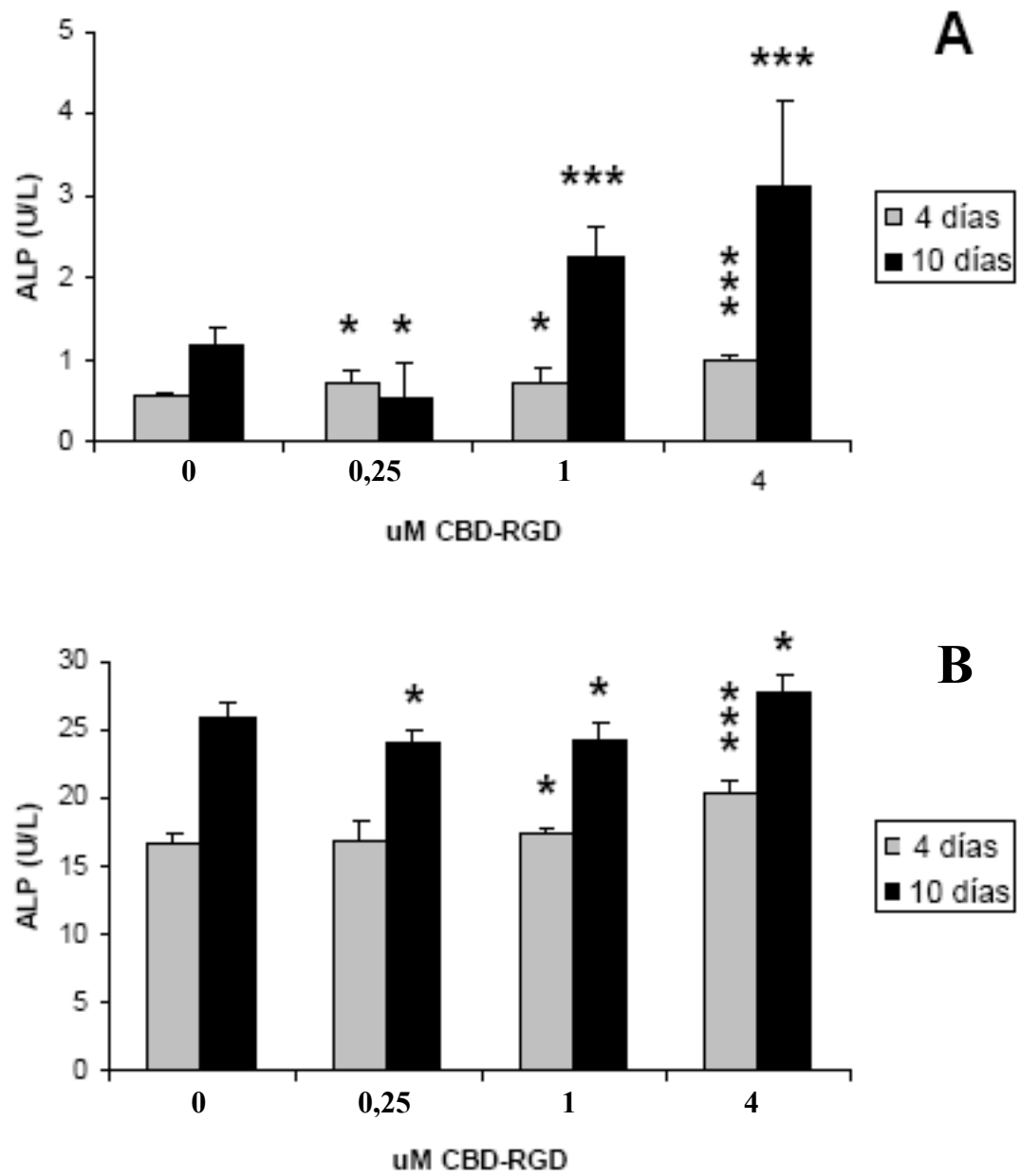
Fig. 2

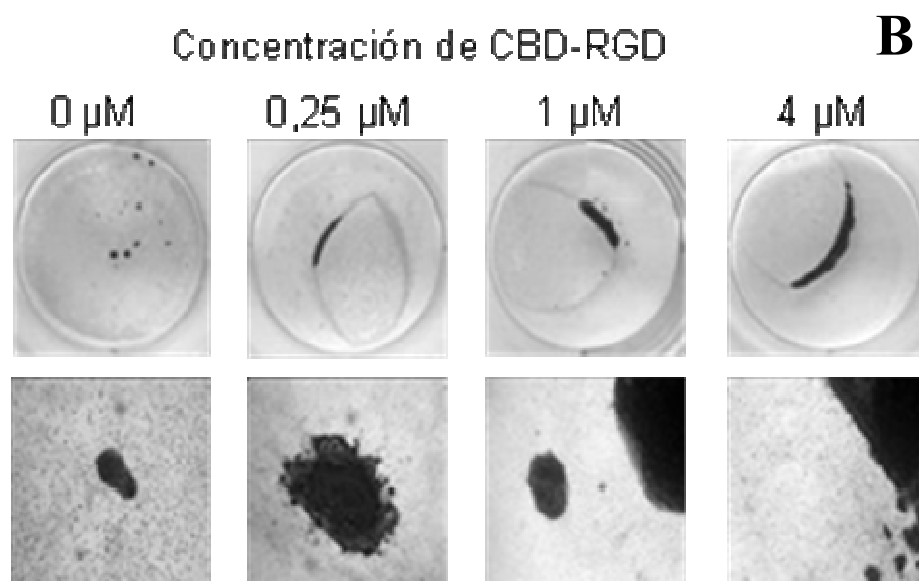
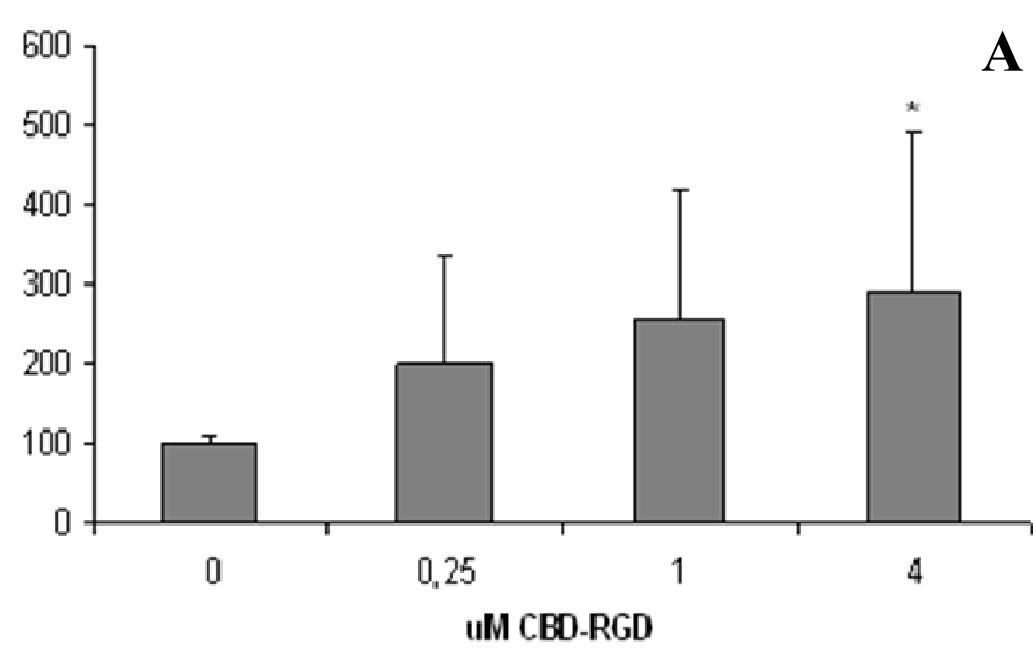
Fig. 3

Fig. 4

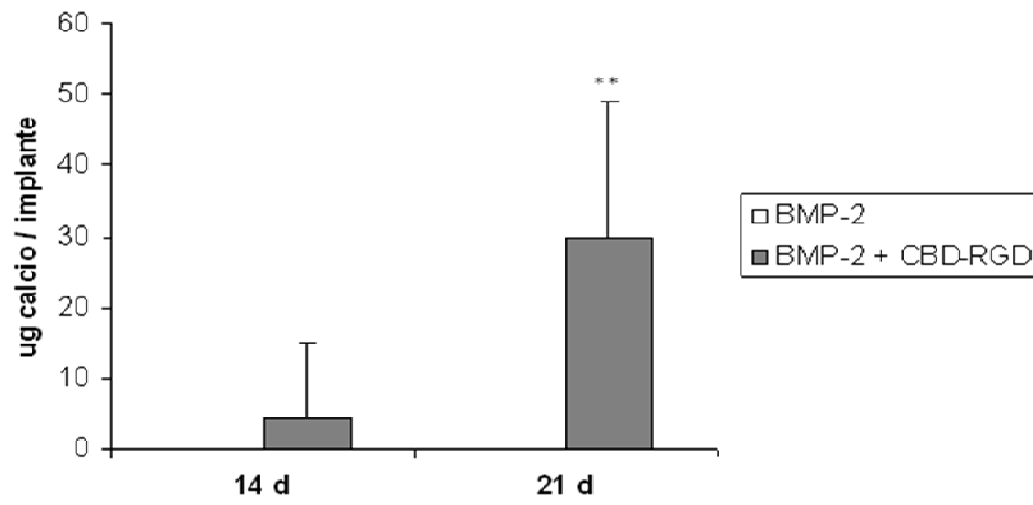
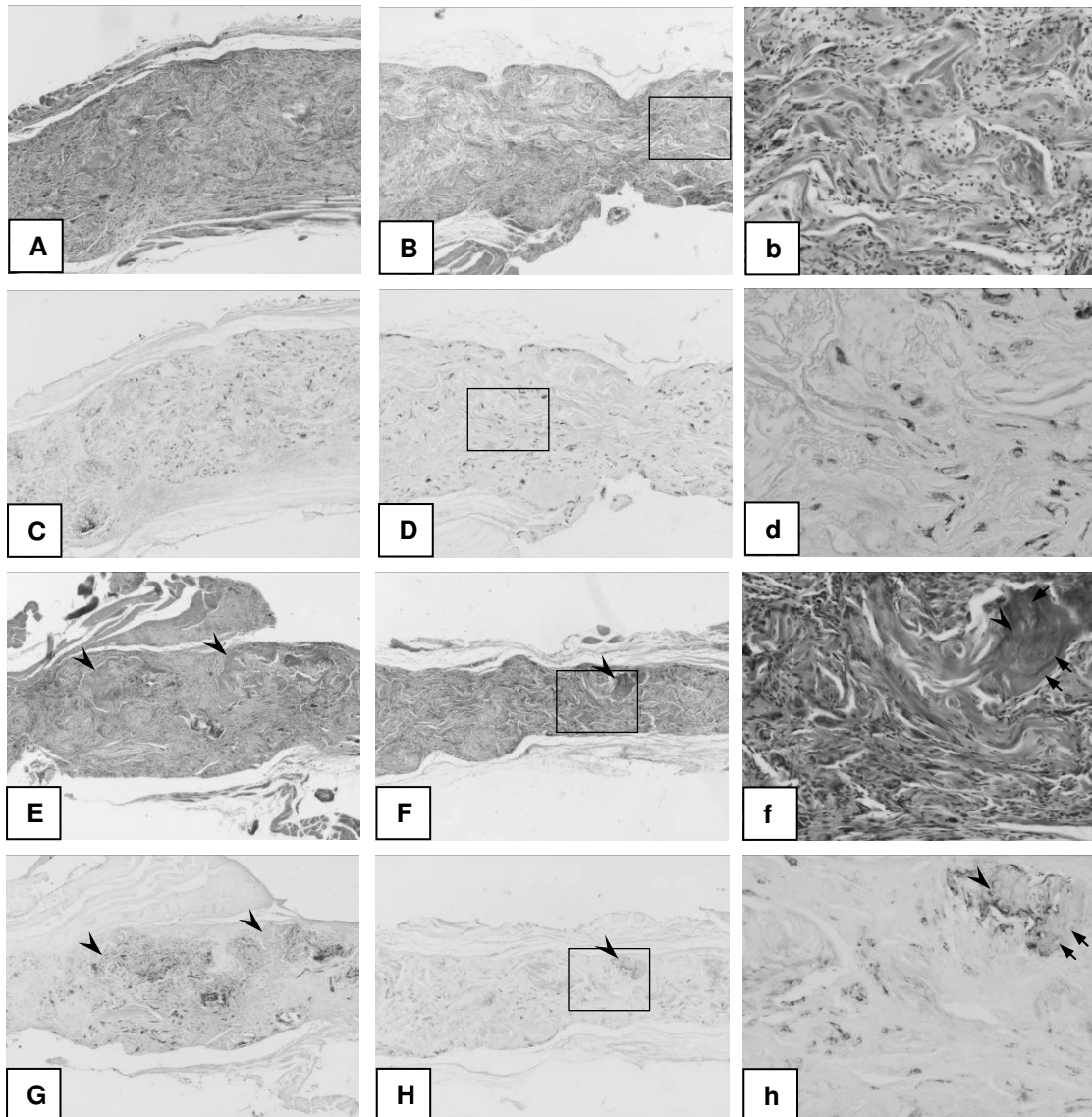


Fig. 5



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería,
Biomateriales y Nanomedicina
Universidad de Málaga

<120> Péptido biomimético RGD con dominio de afinidad por el colágeno
tipo I y sus usos como factor osteogénico

<130> ES2318.3

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido CBD-RGD

<400> 1

Trp	Arg	Glu	Pro	Ser	Phe	Met	Ala	Leu	Ser	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser
1				5					10				15	

<210> 2
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia codificante del péptido CBD-RGD

<400> 2
tggcgcggaac cgagcttcat ggctctgagc cgtcgcggtg atagc

45