

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 949**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**A61L 27/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2016 PCT/KR2016/003505**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016 WO16163711**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2016 E 16776814 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3281946**

54 Título: **Péptido que tiene capacidad de unión a circonia**

30 Prioridad:

**06.04.2015 KR 20150048441**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.05.2020**

73 Titular/es:

**SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB  
FOUNDATION (50.0%)**

**1 Gwanak-ro Gwanak-gu  
Seoul 08826, KR y**

**NANO INTELLIGENT BIOMEDICAL ENGINEERING  
CORPORATION CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PARK, YOON JEONG;**

**SUH, JIN SOOK;**

**CHUNG, CHONG-PYOUNG;**

**LEE, JUE-YEON y**

**KIM, YEONSU**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 762 949 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 capacidad de unión a circonia

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un péptido que se une específicamente a la superficie de la circonia, y más particularmente, a un conjugado peptídico obtenido uniendo un fármaco funcional al péptido, para permitir que el fármaco se fije de forma segura a la superficie de la circonia para mantener de este modo la actividad del fármaco durante un largo período.

**Técnica antecedente**

Los materiales para implantes a implantar *in vivo*, en particular, los materiales para implantes dentales, se utilizan extensamente como dientes artificiales capaces de reemplazar los dientes perdidos, para restablecer la función masticadora de algunos o todos los dientes faltantes. La tasa de éxito y el pronóstico a largo plazo del tratamiento con implantes están afectados por la cantidad y calidad del hueso del sitio del implante en el paciente, y dependen de la estabilidad del implante. La estabilidad del implante se puede dividir en la fijación física, que se obtiene cuando el implante se pone en contacto con el hueso circundante tras su colocación, y la fijación biológica resultado de la formación de nuevo tejido óseo alrededor del implante y de la aparición de osteointegración en el hueso circundante después de la colocación del implante (Guía para la evaluación de materiales de circonia, Korea Food & Drug Administration, 2011).

Cuando se coloca un implante en el hueso alveolar de un paciente adulto, la estabilidad del implante se reduce mientras se produce la reabsorción ósea para formar hueso nuevo en el hueso existente. Sin embargo, al tiempo que se forma hueso nuevo alrededor del implante, la estabilidad del implante aumenta gradualmente de nuevo por osteointegración entre el implante y el hueso alveolar. Sin embargo, en el caso de pacientes de edad avanzada, en los que es difícil asegurar la estabilidad inicial del implante, importante para la osteointegración, debido a la cantidad o calidad insuficiente de hueso, puede ocurrir una falla temprana del implante, y si se aplica una carga al implante que tiene una baja estabilidad inicial, el micromovimiento puede provocar una osteointegración retrasada. Hasta ahora, para superar tales limitaciones, se ha intentado aumentar la estabilidad inicial del implante cambiando la longitud o el diámetro del mismo, o tratando la superficie del implante para aumentar su capacidad de adherirse a los osteocitos. Sin embargo, aún es difícil asegurar la estabilidad inicial del implante después de la colocación del mismo mediante tales cambios físicos (Nakamura K *et al.*, International Journal of Prosthodontics 23:299-309, 2010).

Por lo tanto, en el caso no solo de pacientes de edad avanzada con una cantidad y calidad óseas insuficientes, sino también de pacientes adultos en general, es esencial aplicar factores biológicos para estimular la osteointegración inicial después de la colocación del implante y acortar el período de tratamiento. Hasta ahora, aún no se ha comercializado un producto obtenido inmovilizando químicamente una sustancia fisiológicamente activa en la superficie de un implante dental. Sin embargo, en el caso de apatita, que se utiliza como material sintético para aumentar la cantidad de hueso durante la colocación del implante, se han realizado estudios sobre el uso de apatita junto con un material fisiológicamente activo tal como proteína de matriz extracelular, factor de crecimiento tisular o proteína morfogenética ósea. Además, se han desarrollado productos tales como GEM21S (que contiene PDGF), INFUSE (que contiene BMP-2) y similares, obtenidos aplicando apatita junto con una sustancia fisiológicamente activa o recubriendo la superficie de apatita con una sustancia fisiológicamente activa. Sin embargo, hay problemas en el sentido que, después de implantar estos productos *in vivo*, la sustancia fisiológicamente activa no se fija de manera segura a la superficie del material de apatita y se libera fácilmente de la superficie del material de apatita, para degradarse por la exposición a la sangre sistémica y, por lo tanto, la actividad fisiológica de la sustancia fisiológicamente activa se puede reducir y la sustancia fisiológicamente activa puede provocar efectos secundarios en tejidos distintos del tejido óseo. Por este motivo, para la regeneración de tejido por un implante, se precisa que una sustancia fisiológicamente activa se fije de forma segura a la superficie del biomaterial del implante, de forma que la actividad eficaz de la misma se pueda mantener durante un largo período (documento KR 10-1213355).

CrystEngComm 17(8), 1 de enero de 2015, páginas 1783-1790, divulga péptidos que se unen específicamente a circonia estabilizada con itria que se puede utilizar para generar material biomineralizado a base de circonia con propiedades fotoluminiscentes.

Dental Materials J. 30(6), 2011, páginas 935-940, divulga un motivo peptídico de unión a circonia y el método para identificar dicho motivo peptídico utilizando un sistema de presentación de péptidos en fagos.

Por consiguiente, los presentes inventores han realizado grandes esfuerzos para resolver los problemas descritos anteriormente que se producen en la técnica anterior y, como resultado, han identificado una secuencia peptídica corta que tiene una fuerte afinidad de unión por la superficie de un implante, y han descubierto que el péptido se une fácilmente a la superficie de un implante de circonia y se mantiene en un estado estable, completando de este modo la presente invención.

**Sumario de la invención**

Es un objeto de la presente invención proporcionar un péptido de unión a circonia representado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un conjugado peptídico que comprende un péptido fisiológicamente activo o una proteína fisiológicamente activa unida al péptido de unión a circonia, y un biomaterial que comprende el péptido de unión a circonia o el conjugado peptídico.

La realización de la presente invención se refleja en la reivindicación independiente 1.

Las realizaciones preferentes de la presente invención se reflejan en las reivindicaciones dependientes 2 a 10.

Para conseguir los anteriores objetos, la presente invención proporciona un péptido de unión a circonia representado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

La presente invención también proporciona un conjugado peptídico que comprende un péptido fisiológicamente activo o una proteína fisiológicamente activa unida al péptido de unión a circonia descrito anteriormente.

La presente invención también proporciona un biomaterial que comprende el péptido de unión a circonia descrito anteriormente o el conjugado peptídico descrito anteriormente.

**Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 muestra los resultados de un ensayo de unión realizado utilizando un complejo de avidina-biotina para medir las afinidades de unión de la secuencia peptídica de unión a circonia y una secuencia del Ejemplo Comparativo 1.

La FIG. 2 muestra los resultados de un ensayo de unión realizado utilizando un complejo de avidina-biotina para medir las afinidades de unión de la secuencia peptídica de unión a circonia y secuencias de los Ejemplos Comparativos 2 y 3.

La FIG. 3 muestra los resultados de un ensayo de unión realizado utilizando un complejo de avidina-biotina para medir la cantidad máxima de la secuencia peptídica de unión a circonia unida a la superficie del disco de circonia.

**Mejor modo de llevar a cabo la invención**

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. En general, las nomenclaturas utilizadas en el presente documento son las muy conocidas y comúnmente empleadas en la técnica.

En la presente invención, para fijar de forma segura una sustancia fisiológicamente activa para permitir que la actividad de la misma se mantenga durante un largo periodo, mediante el uso de un enlazador peptídico capaz de unirse a la superficie de un implante de circonia sin modificación química, se identificó una secuencia peptídica que tiene una afinidad de unión por un implante fabricado de circonia mediante la técnica de presentación en fagos, y se descubrió que el péptido puede estar presente en la superficie de circonia en un estado estable.

En un aspecto, la presente invención se dirige a un péptido de unión a circonia representado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En la presente invención, el péptido de unión a circonia se usa preferentemente a circonia, la cual se usa como biomaterial, sin modificación química, pero sin limitación a estos.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un conjugado peptídico que comprende un péptido fisiológicamente activo o una proteína fisiológicamente activa unida al péptido de unión a circonia.

En la presente invención, el conjugado del péptido de unión a circonia y el péptido fisiológicamente activo puede sintetizarse químicamente utilizando un sintetizador de péptidos. Específicamente, un dominio fisiológicamente activo puede unirse químicamente al extremo C o N del péptido de unión a circonia, sintetizando de este modo un conjugado de péptido de unión a circonia-péptido fisiológicamente activo (por ejemplo, una secuencia inductora de diferenciación osteogénica) que consiste en extremo N-péptido de unión a circonia-dominio fisiológicamente activo-extremo C o extremo N-dominio fisiológicamente activo-péptido de unión a circonia-extremo C.

El dominio fisiológicamente activo que es un péptido, es una sustancia que tiene actividad inductora de diferenciación osteogénica o una actividad antiinflamatoria necesaria para la colocación del implante y que regula la expresión génica y la función fisiológica *in vitro* o *in vivo*. Este dominio fisiológicamente activo que es un péptido, puede actuar como un agente de control cuando una sustancia que está implicada en la regulación funcional *in vivo* es deficiente o cuando aparece una patología anómala provocada por una secreción excesiva. Puede tener una forma L o D en vista de su estabilidad *in vivo*.

En la presente invención, el péptido fisiológicamente activo se selecciona preferentemente del grupo que consiste en péptidos funcionales antiinflamatorios, antimicrobianos, de adhesión celular, de regeneración de tejido óseo y de migración celular, pero sin limitación a estos.

5 En la presente invención, la proteína fisiológicamente activa se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un factor de regeneración tisular, un factor de crecimiento tisular, un factor de transcripción intracelular, una proteína de matriz extracelular y una proteína antiinflamatoria, pero sin limitación a estos.

10 En la presente invención, se puede formar un conjugado del péptido de unión a circonia con un péptido fisiológicamente activo o una sustancia de bajo peso molecular induciendo el enlace químico, utilizando un agente de reticulación. Si se induce el enlace químico utilizando un agente de reticulación, el conjugado se formará fácilmente mediante el agente de reticulación, debido a que el extremo N del péptido de unión a circonia tiene un grupo amino libre.

15 Los ejemplos de agente de reticulación que se puede utilizar en la presente invención incluyen, pero sin limitación, 1,4-bis-maleimidobutano (BMB), 1,11-bismaleimidotetraetilenglicol (BM[PEO]4), clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), succinimidil-4-[N-maleimidometilciclohexano-1-carboxi- [6-amidocaproato]] (SMCC) y su sulfonato (sulfo-SMCC), succinimidil 6-[3-(2-piridilditio)-ropionamido] hexanoato (SPDP) y su sulfonato (sulfo-SPDP), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) y su sulfonato (sulfo-MBS), y succinimidil [4-(p-maleimidofenil) butirato] (SMPB) y su sulfonato (sulfo-SMPB).

En otro aspecto, la presente invención también se dirige a un biomaterial que comprende el péptido de unión a circonia o el conjugado peptídico.

25 En la presente invención, el biomaterial es, preferentemente, un implante para trasplante *in vivo*, que está fabricado de: un metal cuya superficie está recubierta de circonia; un polímero natural; un polímero sintético; y circonia, pero sin limitación a estos.

30 En la presente invención, la circonia es, preferentemente, un material tetragonal obtenido mediante la adición del 3-5 % en peso de un estabilizante al óxido de circonio puro, pero sin limitación a esto.

35 En la presente invención, el polímero natural es, preferentemente, uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en colágeno, ácido alginico, ácido propilenglicolalginico, sulfato de condroitina y quitosano, pero sin limitación a estos. Además, el polímero sintético es, preferentemente, uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en ácido poliláctico y poliglicólico, poloxámero y propilenglicol, pero sin limitación a estos.

40 Cuando un metal recubierto de circonia, un polímero natural, un polímero sintético o un implante dental u ortopédico se implanta *in vivo*, una sustancia fisiológicamente activa puede estar unida covalentemente al péptido sin inducir un enlace químico, de forma que pueda estar presente en un estado estable mientras se puede mantener la actividad del mismo. Concretamente, se estimulará la migración, proliferación y diferenciación de las células asociadas a la regeneración de tejido óseo alrededor del implante, y finalmente puede producirse en poco tiempo un efecto de regeneración eficaz de tejido, de forma que el tiempo de tratamiento se pueda acortar. Además, se pueden reducir los efectos secundarios en todo el cuerpo u otros tejidos, que puedan inducirse debido a un enlace inestable en la superficie del implante. Por lo tanto, el implante es útil para el tratamiento quirúrgico regenerativo.

45 Como se emplea en el presente documento, el término "implante" se refiere a un material o procedimiento quirúrgico que se utiliza para implantar un material biocompatible en un área defectuosa, mediante una operación quirúrgica adicional, tal como injerto óseo u osteogénesis por distracción, para restablecer de este modo la función del área defectuosa. El área defectuosa entra en una fase de regeneración regular después de la osteointegración, que es la unión fisiológica, morfológica y directa de la superficie del cuerpo del implante colocado al tejido circundante, cuya función normal se mantiene.

50 Como se emplea en el presente documento, el término "circonia" se refiere, generalmente, al óxido de circonio (ZrO<sub>2</sub>). La circonia tiene ventajas porque tiene una buena biocompatibilidad y puede inducir una alta osteointegración después de la colocación inicial del implante, debido a que aumenta los iones de calcio a través de intercambio iónico y aumenta la movilidad celular para aumentar de este modo la adhesión de la circonia al hueso.

55 El titanio puro, que actualmente se usa extensamente como material para implantes, tiene el problema de que puede mostrar reacciones alérgicas a los metales, o tiene la desventaja de que es muy probable que las bacterias se adhieran al mismo. Por este motivo, en el caso de pacientes con inmunidad reducida, debe tenerse en cuenta la aplicación de un implante fabricado de otro material biocompatible. En los últimos años, se informó que un implante cerámico fabricado de circonia, que se utiliza como sustituto del titanio, tiene una excelente biocompatibilidad, muestra la mayor resistencia mecánica entre los materiales cerámicos, puede resistir cambios rápidos de temperatura y tiene excelentes propiedades estéticas. Debido a tales ventajas, la circonia se utiliza extensamente como material para dientes artificiales.

En la presente invención, se utilizó adicionalmente una nueva técnica de presentación en fagos, llamada "selección sustractiva", para excluir la posibilidad de seleccionar una secuencia que se una a materiales distintos de la superficie del disco de circonia.

5 Como se emplea en el presente documento, la expresión "selección sustractiva" se refiere a una técnica de presentación en fagos que puede utilizarse para identificar una secuencia que se une a un material específico sin unirse a otros materiales específicos. En la técnica de selección sustractiva, se aplica una biblioteca de fagos a un material que no se desea que se una, y se recuperan los fagos no unidos, después de lo cual se aplican los fagos a un material que desea que se una, y luego se descartan los fagos no unidos y se recuperan los fagos unidos  
10 (Munirathinam, Gnanasekar *et. al.*, Novel Phage Display-Based Subtractive Screening To Identify Vaccine Candidates of Brugia malayi, Infect Immun., 72:4707-4715, 2004).

**Ejemplos**

15 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con mayor detalle en referencia a los ejemplos. Será obvio para un experto en la materia que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del ámbito de la presente invención.

**Ejemplo 1: Identificación de la secuencia peptídica de unión a circonia utilizando presentación en fagos**

20 Para identificar una secuencia peptídica específica que se une a la superficie del disco de circonia, se utilizó la técnica de presentación en fagos. Se aplicaron a la superficie del disco de circonia fagos M13 marcados con una biblioteca de péptidos aleatorios con una alta diversidad y complejidad, después de lo cual se eliminaron por lavado los fagos no unidos y se recuperaron los fagos unidos. Estos procedimientos se repitieron varias veces. Se utilizó adicionalmente  
25 un procedimiento de selección sustractiva, y se analizó la secuencia de ADN de un péptido unido al fago finalmente obtenido, identificando de este modo una secuencia peptídica de unión a circonia. La selección sustractiva es una técnica de presentación en fagos que puede utilizarse para identificar una secuencia que se une a un material específico sin unirse a otros materiales específicos.

30 En este ejemplo, se usaron pocillos de una placa de poliestireno para identificar un péptido de unión a circonia a través de presentación en fagos y, así, esta técnica se aplicó para excluir secuencias que se unen a la placa de poliestireno además de a la superficie del disco de circonia.

Tabla 1

Clon	Secuencia de ADN	Secuencia de aminoácidos
n° 1	5'-GTGAGT.CCG.TTT.GGT.ACT.AAG.TGG.TCT.CCG.TTT.GTT-3'	VSPFGTKWSPFV
n° 2	5'-GTGAGT.CCG.TTT.GGT.ACT.AAG.TGG.TCT.CCG.TTT.GTT-3'	VSPFGTKWSPFV
n° 3	5'-GTGAGT.CCG.TTT.GGT.ACT.AAG.TGG.TCT.CCG.TTT.GTT-3'	VSPFGTKWSPFV
n° 4	5'-GTGAGT.CCG.TTT.GGT.ACT.AAG.TGG.TCT.CCG.TTT.GTT-3'	VSPFGTKWSPFV
n° 5	5'-GTGAGT.CCG.TTT.GGT.ACT.AAG.TGG.TCT.CCG.TTT.GTT-3'	VSPFGTKWSPFV
n° 6	5'-GTGAGT.CCG.TTT.GGT.ACT.AAG.TGG.TCT.CCG.TTT.GTT-3'	VSPFGTKWSPFV
n° 7	5'-GTGAGT.CCG.TTT.GGT.ACT.AAG.TGG.TCT.CCG.TTT.GTT-3'	VSPFGTKWSPFV
n° 8	5'-GTGAGT.CCG.TTT.GGT.ACT.AAG.TGG.TCT.CCG.TTT.GTT-3'	VSPFGTKWSPFV
n° 9	5'-GTGAGT.CCG.TTT.GGT.ACT.AAG.TGG.TCT.CCG.TTT.GTT-3'	VSPFGTKWSPFV
n° 10	5'-GTGAGT.CCG.TTT.GGT.ACT.AAG.TGG.TCT.CCG.TTT.GTT-3'	VSPFGTKWSPFV
n° 11	5'-GTGAGT.CCG.TTT.GGT.ACT.AAG.TGG.TCT.CCG.TTT.GTT-3'	VSPFGTKWSPFV

(continuación)

Clon	Secuencia de ADN	Secuencia de aminoácidos
nº 12	Sin inserto	N/A
nº 13	5'-GTGAGTCCGTTTGGTACTAAGTGGTCTCCGTTTGTT-3'	VSPFGTKWSPFV
nº 14	5'-GTGAGTCCGTTTGGTACTAAGTGGTCTCCGTTTGTT-3'	VSPFGTKWSPFV
nº 15	5'-GTGAGTCCGTTTGGTACTAAGTGGTCTCCGTTTGTT-3'	VSPFGTKWSPFV
nº 16	5'-GTGAGTCCGTTTGGTACTAAGTGGTCTCCGTTTGTT-3'	VSPFGTKWSPFV

Por secuenciación de ADN se reveló que el clon n.º 12 no tenía inserto. Sin embargo, otros quince clones indican secuencias idénticas: VSPFGTKWSPFV.

Después de completar ciclos repetidos de la presentación en fagos convencional mencionada anteriormente, los fagos resultantes se amplificaron nuevamente y se añadieron a pocillos vacíos de una placa de poliestireno, y después se recuperaron los fagos no unidos a la superficie del pocillo. Después, los fagos recuperados no unidos a la placa de poliestireno se unieron una vez más a la superficie del disco de circonia, y luego se lavaron enérgicamente con tampón de lavado y, finalmente, solo se recuperaron los fagos unidos restantes.

El kit de presentación en fagos utilizado fue el kit Ph.D.-12 Phage Display adquirido de New England Biolabs (EE.UU.). El kit contiene fagos marcados con una biblioteca de péptidos aleatoria que consisten en 12 aminoácidos, 16 clones finales explorados utilizando el kit se enviaron a Cosmogenetech Co., Ltd. (Corea), como un cultivo de *E. coli*, para analizar las secuencias de los mismos.

Como resultado, como se puede observar en la Tabla 1 anterior, 15 clones tenían la misma secuencia de ADN y se pudo obtener la secuencia peptídica final Zr-BP (VSPFGTKWSPFV; SEQ ID NO: 1), que consiste en 12 restos de aminoácido, por traducción de la secuencia de ADN. Debido a que es muy probable que la secuencia de péptidos sea una secuencia específica que se une a la superficie del disco de circonia, la secuencia peptídica se seleccionó como la secuencia peptídica candidata específica que se une a la superficie del disco de circonia.

## 20 **Ejemplo 2: Síntesis del péptido de unión a circonia**

Los péptidos representados por las SEQ ID NO: 1 a 4 se sintetizaron desde el extremo C al extremo N mediante un método de síntesis en fase sólida de F-moc usando un sintetizador. Específicamente, los péptidos se sintetizaron usando resina Rink (0,075 mmol/g, malla de 100 ~ 200, reticulación 1% de DVB), con Fmoc-(9-fluorenilmetoxycarbonilo) como un grupo bloqueante unido a la misma. Se colocaron 50 mg de resina Rink en un sintetizador y después se hinchó con DMF, después de lo cual se eliminó el grupo Fmoc utilizando una solución de piperidina/DMF al 20%. Se añadieron a la resina una solución de aminoácidos 0,5 M (disolvente: dimetilformamida, DMF), de acuerdo con la secuencia del extremo C al extremo N, DIPEA 1,0 M (dimetilformamida y N-metilpirrolidona, DMF y NMP) y HBTU 0,5 M (disolvente: dimetilformamida, DMF) en cantidades 5, 10 y 5 equivalentes, respectivamente, y se dejó reaccionar durante 1-2 horas en una atmósfera de nitrógeno. Después de finalizar cada una de las etapas de desprotección y acoplamiento, la resina se lavó dos veces con DMF y NMP. Incluso después del acoplamiento del aminoácido final, la resina se desprotegió para eliminar el grupo Fmoc.

La síntesis de los péptidos se confirmó utilizando el método de prueba de la ninhidrina. La resina sintetizada y analizada se secó con tetrahidrofurano (THF) o diclorometano (DCM), y luego se añadió a la resina un cóctel de escisión de ácido trifluoroacético (TFA) en una cantidad de 20 ml por g de resina, seguido de agitación durante 3 horas. A continuación, el cóctel que contenía la resina y el péptido disuelto en el mismo se separó por filtración. Se añadió éter frío después de eliminar la solución filtrada utilizando un evaporador rotatorio o se añadió una cantidad en exceso de éter frío directamente a la solución de cóctel de TFA que contenía el péptido disuelto en ella, para cristalizar el péptido en una fase sólida. El péptido cristalizado se aisló por centrifugación. En ese momento, el cóctel de TFA se eliminó completamente lavando varias veces con éter y con un procedimiento de centrifugación. Los péptidos así obtenidos se disolvieron en agua destilada y se liofilizaron.

Cada uno de los péptidos sintetizados se cortó de la resina, se lavó, se liofilizó, y después se purificó mediante cromatografía líquida. Los pesos moleculares de los péptidos purificados se midieron por espectrometría de masas.

Ejemplo comparativo 1: Síntesis del péptido Zr-BPC (VSAAGTKASPAV; SEQ ID NO: 2)

5 Zr-BPC (VSAAGTKASPAV; SEQ ID NO: 2), en donde la fenilalanina en la 2ª y 9ª posiciones, el triptófano en la 5ª posición y la prolina en la 10ª posición desde el extremo C en la secuencia de la SEQ ID NO: 1 se sustituyeron por alanina, se sintetizó mediante un método de síntesis en fase sólida de F-moc utilizando un sintetizador de péptidos.

Ejemplo comparativo 2: Síntesis de péptido que se une a la superficie del pocillo vacío que no contiene disco de circonia

10 A través de la presentación de fagos, se exploró una secuencia peptídica de 12 aminoácidos que se une a la superficie de un pocillo vacío que no contiene disco de circonia. Se enviaron cuatro clones a Cosmogenetech Co., Ltd. (Corea), como un cultivo de *E. coli*, para analizar las secuencias de los mismos.

15 Como resultado, como se muestra a continuación en la Tabla 2, dos de los cuatro clones tenían secuencias de ADN específicas. Las dos secuencias de ADN se tradujeron para obtener los péptidos PL1 (IGNSFSFPAVYR; SEQ ID NO: 3) y PL2 (LRLDVDRAISLL; SEQ ID NO: 4), consistiendo cada uno en 12 aminoácidos. Los péptidos se sintetizaron mediante un método de síntesis en fase sólida de F-moc utilizando un sintetizador de péptidos.

Tabla 2

Clon	Secuencia de ADN	Secuencia de aminoácidos
nº 1	Sin inserto	N/A
nº 2	5'-ATTGGAATAGTTTTCTTTCTCTGCGGTTTATAGG-3'	IGNSFSFPAVYR
nº 3	5'-TTGCGTTGGATGTTGATAGGGCTATTAGTTTGTG-3'	LRLDVDRAISLL
nº 4	Sin inserto	N/A

Por secuenciación de ADN se reveló que el clon n.º 1 y el n.º 4 no tenían inserto.

20

**Ejemplo 3: Afinidad de unión del péptido de unión a circonia**3-1: Síntesis de péptido de unión a circonia marcado con biotina

25 Para examinar las afinidades de unión de los péptidos sintetizados en el Ejemplo 1 y los Ejemplos comparativos 1 y 2, los péptidos se marcaron con biotina. Cada uno de los dominios peptídicos sintetizados se biotiniló utilizando biotina sulfo-NHS EZ-Link (Pierce Biotechnology, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y los productos secundarios no unidos se eliminaron por ultrafiltración, que es un método de separación por membrana basado en una diferencia de presión. Los pesos moleculares de los productos sintetizados se midieron por espectrometría de masas. Los productos sintetizados se analizaron y purificaron por cromatografía líquida de fase inversa. Para el análisis, se utilizó una columna C<sub>18</sub> con un diámetro de 4,6 mm y se introdujeron en la columna TFA al 0,1 %/H<sub>2</sub>O y TFA al 0,092 %/acetonitrilo a una velocidad de 1 ml/min con un gradiente del 0-60 % durante 30 minutos. La longitud de onda del detector de UV utilizado fue de 220 nm. Para la purificación, se utilizó una columna con un diámetro de 2,2 cm y un caudal de 20 ml/min, y el disolvente y la longitud de onda de detección como se describe anteriormente.

30 Solo se recogió la fracción peptídica marcada con biotina y se concentró utilizando un evaporador rotatorio para eliminar el disolvente, seguido de liofilización.

35

3-2: Medición de la afinidad de unión del péptido de unión a circonia

40 Para medir la afinidad de unión del péptido de unión a circonia, se realizó un ensayo de unión utilizando un complejo de avidina-biotina. Específicamente, se colocó un disco de circonia en cada pocillo de una placa de poliestireno de 12 pocillos y después se bloqueó con un tampón de bloqueo (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M (pH 8,6), BSA 5 mg/ml, Na<sub>3</sub> al 0,02 % (opcional), esterilizar por filtración) durante al menos una hora. A continuación, el tampón de bloqueo se descartó, y cada disco de circonia se lavó enérgicamente seis veces o más con un tampón de lavado (TBS + Tween-20 al 0,1 % [v/v]), después de lo cual 200 µl de cada uno de los péptidos de unión a circonia Zr-BP (SEQ ID NO: 1) del Ejemplo 1 y los péptidos Zr-BPC (SEQ ID NO: 2), PL1 (SEQ ID NO: 3) y PL2 (SEQ ID NO: 4) de los Ejemplos comparativos 1 y 2, que se marcaron con biotina, se sintetizaron, separaron y purificaron en el Ejemplo 3-1, se proporcionaron a la superficie de cada disco de circonia a una concentración que variaba de 100 nM a 1 µM. Cada disco de circonia se incubó a temperatura ambiente durante 15 horas y después se lavó enérgicamente con tampón de lavado, y se proporcionaron a la superficie de cada disco de circonia 200 µl de una dilución 1:500 de ExtrAvidin-peroxidasa (n.º de Cat. E2886, Sigma-Aldrich, EE. UU.) en tampón de bloqueo. Cada disco de circonia se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavó enérgicamente con tampón de lavado, después de lo cual se proporcionaron 200 µl de una solución de sustrato (2,2'-AZINO-BIS, n.º de Cat. A3219, Sigma-Aldrich, EE. UU.) en la superficie de cada disco de circonia y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos para desarrollar color. Cada disco de circonia se trató con 200 µl de solución de SDS al 1 % para detener la reacción, y se midió la absorbancia a 405 nm.

50

55

Como resultado, como se puede observar en la FIG. 1, cuando se trató cada disco de circonia con cada uno del péptido de unión a circonia Zr-BP (SEQ ID NO: 1) del Ejemplo 1 y el péptido Zr-BPC (SEQ ID NO: 2) del Ejemplo comparativo 1, el valor de absorbancia del péptido de unión a circonia Zr-BP del Ejemplo 1 fue mayor que el del péptido Zr-BPC del Ejemplo comparativo 1, y este aumento en el valor de absorbancia dependió de la concentración. Esto demuestra

- 5 que la secuencia peptídica de unión a circonia es una secuencia que se une a la superficie del disco de circonia de una manera dependiente de la concentración. Además, tales resultados sugieren que la secuencia peptídica tiene un motivo de unión, aunque la afinidad de unión del mismo se reduce debido a la sustitución de algunos aminoácidos por alanina.
- 10 Como se muestra en la FIG. 2, cuando se trató cada disco de circonia con cada uno del péptido de unión a circonia Zr-BP (SEQ ID NO: 1) del Ejemplo 1 y los péptidos PL1 (SEQ ID NO: 3) y PL2 (SEQ ID NO: 4) del Ejemplo comparativo 2, el valor de absorbancia del péptido de unión a circonia Zr-BP del Ejemplo 1 fue mayor que los de los péptidos (PL1 y PL2) del Ejemplo comparativo 2, y este aumento en el valor de absorbancia dependió de la concentración. Los péptidos (PL1 y PL2) del Ejemplo comparativo 2 mostraron valores de absorbancia independientes de la concentración
- 15 de los mismos, lo que indica que las secuencias peptídicas del Ejemplo comparativo 2 no se unen a la superficie del disco de circonia.

#### **Ejemplo 4: Examen de la cantidad máxima de unión del péptido de unión a circonia**

- 20 Para examinar la cantidad máxima de unión del péptido de unión a circonia Zr-BP (SEQ ID NO: 1) por unidad de área de la superficie del disco de circonia, se realizó un ensayo de unión utilizando un complejo de avidina-biotina. Específicamente, se colocó un disco de circonia en cada pocillo de una placa de poliestireno de 12 pocillos y después se bloqueó con un tampón de bloqueo (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M (pH 8,6), BSA 5 mg/ml, NaN<sub>3</sub> al 0,02 % (opcional), esterilizar por filtración) durante al menos una hora. A continuación, el tampón de bloqueo se descartó, y cada disco de circonia
- 25 se lavó enérgicamente seis veces o más con un tampón de lavado (TBS + Tween-20 al 0,1 % [v/v]), después de lo cual 200 µl de cada uno de los péptidos de unión a circonia Zr-BP (SEQ ID NO: 1) del Ejemplo 1 y los péptidos Zr-BPC (SEQ ID NO: 2), PL1 (SEQ ID NO: 3) y PL2 (SEQ ID NO: 4) de los Ejemplos comparativos 1 y 2, que se marcaron con biotina, se sintetizaron, separaron y purificaron en el Ejemplo 3-1, se proporcionaron a la superficie de cada disco de circonia a una concentración que variaba de 100 nM a 40 mM. Cada disco de circonia se incubó a temperatura ambiente durante 15 horas y después se lavó enérgicamente con tampón de lavado, y se proporcionaron a la superficie
- 30 de cada disco de circonia 200 µl de una dilución 1:500 de ExtrAvidin-peroxidasa (n.º de Cat. E2886, Sigma-Aldrich, EE. UU.) en tampón de bloqueo. Cada disco de circonia se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavó enérgicamente con tampón de lavado, después de lo cual se proporcionaron 200 µl de una solución de sustrato (2,2'-AZINO-BIS, n.º de Cat: A3219, Sigma-Aldrich, EE. UU.) en la superficie de cada disco de circonia y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos para desarrollar color. Cada disco de circonia se trató con
- 35 200 µl de solución de SDS al 1 % para detener la reacción, y se midió la absorbancia a 405 nm.

- Como resultado, como se puede observar en la FIG. 3, el péptido de unión a circonia Zr-BP (SEQ ID NO: 1) mostró el máximo valor de absorbancia a una concentración de 2 mM. Se cree que los cambios en la absorbancia que aparecen
- 40 a una concentración de 10 mM o superior son resultados negativos falsos que pueden explicarse por el efecto "gancho" a dosis altas. Basándose en el cálculo inverso a partir del peso molecular y la cantidad a la que se proporciona el péptido de unión a circonia, se puede observar que la cantidad máxima de péptido de unión a circonia unida a la superficie de un disco de circonia es de 622,8 µg. Por lo tanto, puede observarse que, debido a que el diámetro del disco de circonia es de 15,5 mm, se pueden fijar aproximadamente 3,3 µg de péptido de unión a circonia por mm<sup>2</sup> de
- 45 superficie del disco de circonia.

#### **Aplicabilidad industrial**

- El péptido de unión a circonia de acuerdo con la presente invención se puede fijar de forma segura a la superficie de circonia, de forma que la actividad de una sustancia fisiológicamente activa introducida en el péptido se pueda mantener en la superficie de circonia durante un largo período. Por lo tanto, el péptido de unión a circonia es útil para el tratamiento quirúrgico regenerativo.

- Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a las características específicas, será evidente para los expertos en la materia que la presente descripción es solo para una realización preferente y no limita el ámbito de la presente invención. Por lo tanto, el ámbito sustancial de la presente invención se definirá por las reivindicaciones adjuntas.

60 <110> SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R & DB FOUNDATION NANO INTELLIGENT BIOMEDICAL ENGINEERING CORPORATION CO. LTD

<120> Péptido que tiene afinidad de unión a circonia

<130> PP-B1723

65

<150> KR 10-2015-0048441

ES 2 762 949 T3

<151> 06/04/2015

<160>4

5 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Zr-BP

15 <400> 1

Val Ser Pro Phe Gly Thr Lys Trp Ser Pro Phe Val  
1 5 10

<210> 2

20 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Zr-BPC

<400>2

Val Ser Ala Ala Gly Thr Lys Ala Ser Pro Ala Val  
1 5 10

<210>3

30 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> PL1

<400> 3

40

Ile Gly Asn Ser Phe Ser Phe Pro Ala Val Tyr Arg  
1 5 10

<210> 4

45 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> PL2

<400> 4

Leu Arg Leu Asp Val Asp Arg Ala Ile Ser Leu Leu  
1 5 10

55

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido de unión a circonia representado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
- 5 2. El péptido de unión a circonia de la reivindicación 1, en donde el péptido de unión a circonia se une a la circonia sin modificación química.
3. Un conjugado peptídico que comprende un péptido fisiológicamente activo o una proteína fisiológicamente activa unida al péptido de unión a circonia de la reivindicación 1.
- 10 4. El conjugado peptídico de la reivindicación 3, en donde el péptido fisiológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en péptidos funcionales antiinflamatorios, antimicrobianos, de adhesión celular, de regeneración de tejido óseo y de migración celular.
- 15 5. El conjugado peptídico de la reivindicación 3, en donde la proteína fisiológicamente activa se selecciona del grupo que consiste en un factor de regeneración tisular, un factor de crecimiento tisular, un factor de transcripción intracelular, una proteína de matriz extracelular y una proteína antiinflamatoria.
- 20 6. Un biomaterial que comprende el péptido de unión a circonia de la reivindicación 1 o el conjugado peptídico de la reivindicación 3.
7. El biomaterial de la reivindicación 6, en donde el biomaterial es un implante para trasplante *in vivo*, que está fabricado de: un metal cuya superficie está recubierta de circonia, un polímero natural, un polímero sintético y circonia.
- 25 8. El biomaterial de la reivindicación 7, en donde la circonia es un material tetragonal obtenido mediante la adición del 3-5 % en peso de un estabilizante a óxido de circonio puro.
9. El biomaterial de la reivindicación 7, en donde el polímero natural es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en colágeno, ácido alginico, ácido propilenglicolalginico, sulfato de condroitina y quitosano.
- 30 10. El biomaterial de la reivindicación 7, en donde el polímero sintético es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en ácido poliláctico-glicólico, poloxámero y propilenglicol.

FIG. 1

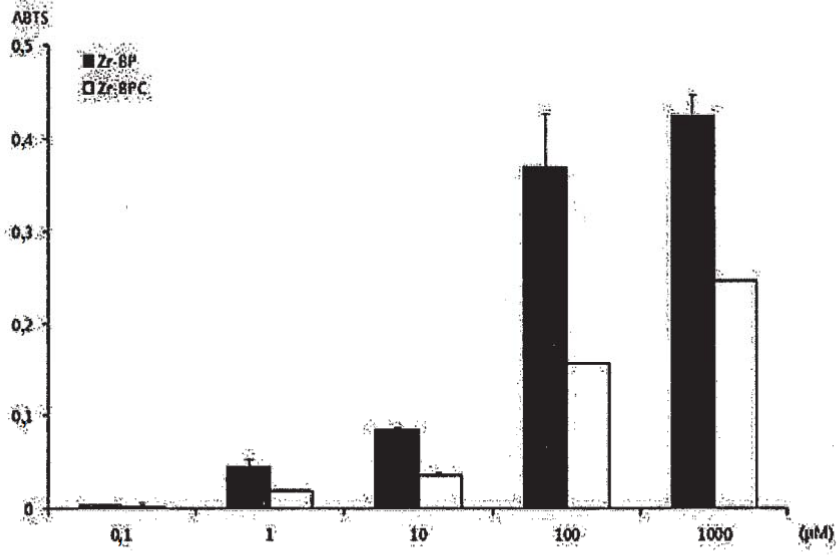


FIG. 2

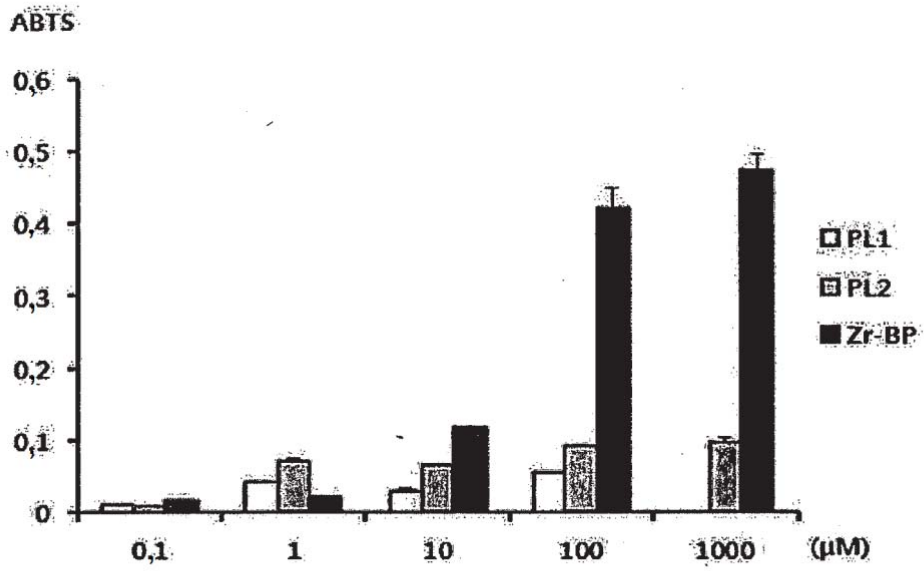


FIG. 3

