

CATEPSINA K: UN NUEVO BLANCO MOLECULAR EN EL TRATAMIENTO DE LA RESORCIÓN ÓSEA AUMENTADA

A.L. NEGRI

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES METABÓLICAS,
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DEL SALVADOR. BUENOS
AIRES. ARGENTINA.

La degradación de la matriz ósea depende de la actividad de dos clases principales de proteasas, las cisteíno-proteasas y las metaloproteasas de matriz. La cisteíno-proteasa, que está presente predominantemente en el osteoclasto, es la catepsina K. Esta enzima es muy activa contra proteínas de matriz como los colágenos tipo I y II y es la primera catepsina descrita capaz de clivar la triple hélice de colágeno dentro de la parte helicoidal intacta de la molécula. La catepsina K está presente en el borde rugoso de los osteoclastos y en las lagunas de resorción de la superficie ósea. La inhibición de esta enzima inhibe la formación de lagunas de resorción osteoclástica de una manera de concentración dependiente. La picnodisostosis es una displasia esclerosante ósea producida por una deficiencia en la actividad de la catepsina K. El fenotipo osteopetrótico de los pacientes con picnodisostosis fue confirmado en ratones transgénicos, a los cuales se les había producido disrupción del gen de la catepsina K. Existen inhibidores naturales de las cisteíno-proteasas de la familia de la papaína, entre las cuales se encuentra la catepsina K, llamadas cistatinas. Recientemente se han desarrollado varios inhibidores sintéticos no peptídicos de la catepsina K con un buen perfil de selectividad con respecto a otras catepsinas. Estos fármacos han demostrado ser potentes inhibidores de la resorción ósea en animales y en humanos, sugiriendo que la inhibición de la catepsina K es una forma terapéutica viable de tratamiento de la osteoporosis.

PALABRAS CLAVE: catepsina K, resorción ósea, inhibidores sintéticos picnodisostosis, osteoporosis.

Bone matrix degradation depends on the activity of two classes of proteinases, cisteino proteinases and metalloproteinases. The cisteino proteinase predominantly present in the osteoclast is cathepsin K. This enzyme is highly active against matrix proteins as collagen type I and II and is the first cathepsin that is capable of cleavage of the collagen triple helix within the intact helicoidal part of the molecule. Cathepsin K is present in the ruffled border of the osteoclasts and in the resorption lacunae of bone surface. The inhibition of this enzyme inhibits the formation of osteoclastic resorption lacunae in a concentration dependent way.

Picnodysostosis is a bone sclerosing dysplasia produced by a deficiency in cathepsin K activity. The osteopetrotic phenotype in picnodysostosis patients was confirmed in transgenic mice with disruption in the cathepsin K gene. There are natural inhibitors of the papain family of cystein proteinase among which cathepsin K is found, called cistatins. Recently a number of non-peptidic synthetic inhibitors of cathepsin K have been developed with a good selectivity profile with respect to other cathepsins. These drugs have shown to be potent inhibitors of bone resorption in animals and humans, suggesting that inhibition of cathepsin K is a viable therapeutic form of treatment of osteoporosis.

KEY WORDS: cathepsin K, bone resorption, synthetic inhibitors, picnodysostosis, osteoporosis.

INTRODUCCIÓN

Varias enfermedades óseas se caracterizan por una excesiva resorción ósea. Esta resorción puede ser generalizada a nivel del esqueleto (como en la osteoporosis o en la enfermedad de Paget multiostótica) o localizada (como en las metástasis óseas). La resorción ósea puede ser dividida en dos procesos básicos: 1) la solubilización del mineral óseo, y 2) la degradación de la matriz ósea. Mientras que la solubilización del mineral óseo depende de la producción de ácido por el osteoclasto, la degradación de la matriz ósea depende de la actividad de proteasas. En la resorción ósea han sido implicadas dos clases principales de proteasas.

1) Las cisteíno-proteasas.

2) Las metaloproteasas de matriz (MMP). Las cisteíno-proteasas lisosomales pueden degradar eficientemente el colágeno tipo I, principal componente proteico de la matriz ósea, a pH ácido¹. Las catepsinas L y B pueden clivar en las extensiones no helicoidales del telopeptido de colágeno, que lleva a la desnaturalización de las fibras de colágeno a pH ácido, y después es rápidamente degradado a péptidos de bajo peso molecular². La laguna de resorción por debajo de osteoclasto que reabsorbe activamente presenta un pH entre 4 y 5³ que garantiza el medio catalítico óptimo para las proteasas ácidas lisosomales. Varios estudios bioquímicos y ultraestructurales han demostrado que las catepsinas son realmente secretadas a la laguna de resorción⁴ y que la degradación proteolítica de la matriz ósea tiene lugar a ese nivel. La participación de cisteíno-proteasas en la resorción ósea también ha sido demostrada en experimentos que utilizaron inhibidores específicos de cisteíno-proteasas^{5,6}.

CATEPSINA K

Hasta hace muy poco se pensaba que las catepsinas L y B eran las responsables de la principal actividad de cisteíno-proteasa de los osteoclastos, por lo que se desarrollaron esfuerzos para diseñar inhibidores de la catepsina L como agentes terapéuticos para la osteoporosis⁷. En 1994 se identificó en conejos una nueva cisteíno-proteasa expresada predominantemente en el osteoclasto denominada OC2⁸. El homólogo humano de la OC2 fue clonado en diversos laboratorios y se le dio diferentes nombres⁹⁻¹², y, finalmente, se designó a esta proteasa como catepsina K.

La catepsina K (EC 3.4.22.38) pertenece a la familia de la papaína de cisteíno proteasas y constituye la proteasa predominante del osteoclasto. Hasta el presente se conocen al menos 12 cisteíno-proteasas humanas pertenecientes a la familia de la papaína, cuyas secuencias se han obtenido (catepsinas B, L, H, S, O, K, C, W, F, V(L2), Z(X) y bleomicina hidrolasa). Va-

Correspondencia: Dr. A.L. Negri.
Instituto de Investigaciones Metabólicas.
Libertad, 836, 1.º piso. Buenos Aires 1012.
Argentina.
Correo electrónico: secger@idim.com.ar

rias de estas nuevas enzimas tienen una distribución tisular restringida, lo que implica funciones celulares específicas. Utilizando un análisis de *Northen Blot* en células de osteoclastoma se evidenció que los transcriptos de catepsina K estaban presentes al menos en 50 a 100 veces con relación a los transcriptos de las catepsinas L y S¹³.

La catepsina K es altamente activa contra proteínas de matriz, como los colágenos tipo I y II y es la primera catepsina descrita capaz de clivar la triple hélice de colágeno dentro de la parte helicoidal intacta de la molécula¹⁴. Recientes estudios microscópicos de inmunoluminiscencia e inmunofluorescencia han demostrado la presencia de catepsina K en el borde rugoso de los osteoclastos y en las lagunas de resorción de la superficie ósea¹⁵.

Para evaluar la contribución de la catepsina K en la resorción ósea mediada por osteoclastos, Inui et al¹⁶ utilizaron oligodesoxinucleótidos (S-ODN) antisentido de catepsina K. Así cultivaron osteoclastos de conejo sobre cortes de dentina durante 24 horas en presencia o ausencia de S-ODN, administrando como elementos portadores liposomas policationicos. El S-ODN antisentido inhibió la formación de lagunas de resorción osteoclástica de una manera concentración dependiente. Los S-ODN con sentido o *mismatch* no tuvieron efecto sobre el nivel de formación de lagunas. Estos autores también usaron un inhibidor no específico de cisteíno-proteasas, el E-64, que redujo la producción de lagunas de resorción de una manera similar dosis dependiente.

PICNODISOSTOSIS Y CATEPSINA K

La picnodisostosis (MIM 265800) es una displasia esclerosante ósea que se cree que afectó al pintor impresionista francés Henri de Toulouse-Lautrec (1864-1901)¹⁷. Esta enfermedad se transmite en forma autosómica recesiva y existe consanguinidad de los padres en el 30% de los casos descritos. Desde su primera descripción en 1962 se han detectado más de 100 casos en 50 familias¹⁸ y parece ser especialmente común en Japón¹⁹. La picnodisostosis se diagnostica por regla general en la primera infancia por una desproporcionada

baja estatura y rasgos dismórficos que incluyen una prominencia frontooccipital, fontanela anterior y otras suturas craneales abiertas, cráneo relativamente grande, ángulo mandibular obtuso, paladar arqueado alto, maloclusión dental, proptosis y nariz puntiaguda²⁰. Los dedos son cortos y con el extremo ensanchado por acroosteólisis o aplasia de las falanges terminales, con hipoplasia de las uñas y manos cortas y cuadradas. Finalmente, el tórax es estrecho y puede existir *pectus excavatum*, acompañado de cifoescoliosis e incremento de la lordosis lumbar. Las fracturas óseas son frecuentes especialmente en las extremidades. Desde el punto de vista radiológico, tiene características parecidas a la de las osteopetrosis como es la osteosclerosis generalizada. La radiografía lateral de cráneo muestra característicamente la base de cráneo esclerótica con los bordes de la órbita radiodensos y suturas craneales marcadamente abiertas. El estudio histopatológico muestra que la estructura del hueso cortical aparece como normal, a pesar de una disminución de la actividad osteoclástica y osteoblástica²¹.

El hecho más convincente del papel crítico de la catepsina K en el remodelado óseo dada por la demostración de que la picnodisostosis se produce por una deficiencia en la actividad de la catepsina K. Los osteoclastos de los pacientes con picnodisostosis exhiben acumulación de fibras de colágeno no digerido en sus lisosomas²². Estudios de análisis de asociación localizaron el gen de la picnodisostosis al cromosoma humano 1q21 y, subsecuentemente, el intervalo genético se estrechó entre los marcadores D1S2612 y D1S2345. La secuencia expresada de este gen correspondía a la catepsina K, que también había sido mapeada en esa región cromosómica²³. Se ha demostrado también que la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la catepsina K del ratón está altamente conservada con los homólogos de humanos, conejos y pollos a lo largo de la prorrégion y de la enzima madura. Rood et al²⁴ estudiaron la organización genómica de la catepsina K humana. Ésta es similar a las de las catepsinas S y L; se extiende a lo largo de 12,1 kb de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico y está compuesto de 8 exones y 7 intrones. El análisis de la región de flanco 5' indica

que este gen carece de las cajas canónicas TATA, AAT, y contiene múltiples potenciales sitios de regulación transcripcional. El fenotipo osteopetrótico de los pacientes con picnodisostosis fue confirmado en ratones transgénicos, a los cuales se les había producido disrupción del gen de la catepsina K²⁵.

INHIBIDORES NATURALES DE CATEPSINA K

La cistatina es una proteína con potente actividad inhibidora de las peptidasas, que fue hallada por primera vez en la clara de huevo de pollo a fines de la década de los años sesenta²⁶. Desde entonces las cistatinas se han constituido en una superfamilia de proteínas similares presentes en mamíferos, aves, peces, insectos, plantas y algunos protozoos. En la actualidad se conocen 12 parientes funcionales de la cistatina de pollo en humanos. El tipo 1 de cistatinas (A y B) son principalmente intracelulares, las cistatinas tipo 2 (C, D, E/M, F, G, S, SN, y SA) son extracelulares y las tipo 3 (L-y H kininógenos), son proteínas intravasculares. Todas las verdaderas cistatinas inhiben las cisteíno-proteasas de la familia de la papaína, entre ellas a la catepsina K.

INHIBIDORES SINTÉTICOS DE LA CATEPSINA K HUMANA

Distintas empresas farmacéuticas han elaborado inhibidores específicos de la catepsina K humana. Novartis Pharma ha desarrollado arilaminoetil amidas como inhibidores de esta cisteíno-proteasa con excelente especificidad con respecto a las catepsinas L y S²⁷. El AAE581 es el primero de esta nueva clase de inhibidores de la catepsina K, cuya administración es de una vez por día. Este producto que está en fase II, ha sido asociado con un 70% de reducción de la resorción ósea. En el programa de ensayos clínicos de fase II, un estudio doble ciego en 140 mujeres posmenopáusicas demostró una significativa reducción en los marcadores de resorción comparado con placebo ($p < 0,001$). La fase IIB de ensayos clínicos está proyectada para empezar a comienzos del año 2004.

El *Merck Frosst Centre for Therapeutic Research* de Canadá ha elaborado una nueva clase de inhibidores potentes y reversibles nopeptídicos biarílicos de catepsina K humana²⁸. La unión amida P2-P3 de un conocido dipéptido 1 aminoacetoniitrilo fue remplazada por un anillo fenilo, que dio lugar a esta serie de compuestos biarílicos que retienen potencia contra la catepsina K, y muestran un mejor perfil de selectividad contra otras catepsinas. La modificación estructural dentro estas series resultó en la identificación del compuesto R-2, un potente inhibidor de la catepsina K (IC₅₀ = 3 nM) que es selectivo contra la catepsina B (IC₅₀ = 3950 nM), L (IC₅₀ = 3725 nM), y S (IC₅₀ = 2010 nM). En un ensayo *in vitro*, utilizando osteoclastos de conejo y hueso bovino, el compuesto R-2 inhibió la resorción ósea con una IC₅₀ de 95 nM. Esta clase de inhibidores nopeptídicos nitrilo es poco probable que sea hidrolizada por cisteíno-proteasas. Es más, la inhibición de la catepsina K por el compuesto R-2 se mostró que era completamente reversible y aparentemente no tiempo-dependiente. Para demostrar la eficacia del compuesto R-2 *in vivo*, se administró a monas *rhesus* ovariectomizadas a 20 mg/Kg por boca una vez al día durante 8 días, midiendo la resorción ósea a través de un marcador de *turnover* óseo urinario, el N-telopéptido de colágeno tipo I. Durante los 8 días de administración el compuesto R-2 redujo el marcador de resorción urinario en un 80%, sugiriendo que la inhibición de la catepsina K es una forma terapéutica viable de tratamiento de la osteoporosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Maciewicz RA, Wotton SF, Etherington DJ, Duance VC. Susceptibility of the cartilage collagens, types II, IX, XI to degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B and L. *FEBS Lett* 1990;269:189-93.
- Burleigh MC, Barrett AJ, Lazarus GS. Cathepsin B1. A lysosomal enzyme that degrades native collagen. *Biochem J* 1974;137:387-98.
- Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. Microelectrode studies on acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 1988;175:266-76.
- Goto T, Kiyoshima T, Moroi R, Tsukuba T, Nishimura Y, Himeno M, et al. Localization of cathepsins B, D, and L in the rat osteoclast by immuno-light and electron microscopy. *Histochemistry* 1994;101:33-40.
- Woo J-T, Yamaguchi K, Hayama T, Kobori T, Sigeizumi S, Sugimoto K, et al. Suppressive effect of N-(benzylocarbonyl)-L-phenylalanyl-L-tyrosine on bone resorption in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 1996;300:131-5.
- Everts V, Beertsen W, Schroder R. Effects of proteinase inhibitors leupeptin and E-64 on osteoclastic bone resorption. *Calcify Tissue Int* 1988;43:172-8.
- Millest AJ, Breen SA, Loveday BE, Clarkson PN, Simpson CA, Waterton JC, et al. Effects of an inhibitor of cathepsin L on bone resorption in thyroparathyroidectomized and ovariectomized rats. *Bone* 1997;5:465-71.
- Tezuka K, Tezuka Y, Maejima A, Sato T, Nemoto K, Kamioka H, et al. Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol Chem* 1994;269:1106-9.
- Bromme D, Okamoto K, Wang BB, Biroc S. Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1996;271:2126-32.
- Li Y-P, Alexander M, Wucherpfennig AL, Yellick P, Chen W, Shashenko P. Cloning and complete coding sequence of a novel human cathepsin expressed in giant cells of osteoclastomas. *J Bone Miner Res* 1995;10:1197-202.
- Shi GP, Chapman HA, Bhairi SM, DeLeeuw C, Reddy VY, Weiss SJ. Molecular cloning of human cathepsin O, a novel endopeptidase and homologue of rabbit OC2. *FEBS Lett* 1995;357:129-34.
- Inaoka T, Bilbe G, Ishibashi O, Tezuka KI, Kumegawa M, Kokubo T. Molecular cloning of cDNA for cathepsin K: Novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;206:89-96.
- Bromme D and Okamoto K. Human cathepsin K O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary. Molecular cloning, sequencing and tissue distribution. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1995;376:379-84.
- Kafienah W, Bromine D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human Cathepsin k cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the Triple Helix. *Biochem J* 1998;331(Pt3):727-32.
- Littlewood-Evans A, Kokubo T, Ishibashi O, Inaoka T, Wlodarsky B, Gallager JA, et al. Localization of cathepsin K in human osteoclasts by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Bone* 1997;20:81-6.
- Inui T, Ishibashi O, Inaoka Y, Kumegawa M, Kokubo T, Yamamura T. Cathepsin k antisense oligodeoxynucleotide inhibits osteoclastic bone resorption. *J Biol Chem* 1997;272(130):8109-12.
- Maroteaux P, Lamy M. The malady of Toulouse-Lautrec. *JAMA* 1965;191:715-7.
- Maroteaux P, Lamy M. La pycnodysostose. *Presse Med* 1962;70:999.
- Sugiura Y, Yamada Y, Koh J. Pycnodysostosis in Japan: report of six cases and a review of Japanese literature. *Birth Defects Orig Art Ser* 1974;X(12):78-98.
- Elmore SM. Pycnodysostosis: a review. *J Bone Joint Surg* 1967;49A:153-62.
- Soto TJ, Mautalen CA, Hojman D, et al. Pycnodysostosis, metabolic and histologic studies. En: *Birth Defects: original Article Series*. 1969;V(4):109-15.
- Everts V, Aronson DC, Beertsen W. Phagocytosis of bone collagen by osteoclasts in two cases of pycnodysostosis. *Calcif Tissue Int* 1985;37:25-31.
- Johnson MR, Polymeropoulos MH, Vos HL, Ortiz de Luna RI, Francomano CA. A nonsense mutation in cathepsin K gene observed in a family with pycnodysostosis. *Genome Res* 1996;6(11):1050-5.
- Rood JA, Van Horn S, Drake FH, Gowen M, Deboucq C. Genomic organization and chromosome localization of the human cathepsin k gene (CTSK). *Genomics* 1997;41:169-76.
- Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13453-8.
- Abrahamson M, Álvarez-Fernández M, Nathanson CM. Cystatins. *Biochem Soc Symp* 2003;70:179-99.
- Altmann E, Green J, Tintelnot-Blomley M. Arylaminoethyl amides as inhibitors of the cysteine protease K-investigating P1' substituents. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13(12):1997-2001.
- Robichaud J, Oballa R, Prasit P, et al. A novel class of nonpeptidic biaryl inhibitors of human cathepsin K. *J Med Chem* 2003;46(17):3709-27.