

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 772 179**

(51) Int. Cl.:

**A61K 38/22** (2006.01)  
**A61P 17/00** (2006.01)  
**C07K 5/08** (2006.01)  
**C07K 5/10** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2014 PCT/KR2014/008497**  
(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015 WO15041430**  
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2014 E 14846349 (0)**  
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3048110**

---

(54) Título: **Composición que comprende un péptido derivado de adinopectina**

(30) Prioridad:

**17.09.2013 KR 20130111502**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.07.2020**

(73) Titular/es:

**KNU-INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION (50.0%)**  
**1 Gangwondae-hak-gil Chuncheon-si, Gangwon-do 200-701, KR y SUPADELIXIR INC. (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**HAHN, JANG-HEE y LIM, DONG-YOUNG**

(74) Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 772 179 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**

Composición que comprende un péptido derivado de adinopectina

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica o cosmética que comprende fragmentos peptídicos o péptidos pequeños derivados de adinopectina. Los péptidos facilitan la regeneración de la piel e hidratación, impiden que la piel se arruge y tienen actividades inhibitorias contra la alergia y la inflamación, así como contra la 10 metástasis de células cancerosas.

**Antecedentes de la técnica**

Las heridas, también referidas como lesiones cutáneas, muestran diferentes síntomas, por ejemplo, dolor, sangrado, 15 formación de cicatrices, disfunción y demás. La cicatrización de heridas implica procesos tales como una respuesta inflamatoria, formación de tejido de granulación, reepitelización y angiogénesis, etc. El proceso incluye las acciones de diferentes factores de crecimiento, citocinas, hormonas neuronales, etc., secretadas desde fibroblastos, adipocitos, células derivadas de la sangre y neuronas sensoriales, que conducen a la proliferación de células epidérmicas y la formación de matriz extracelular.

20 Para regenerar tejidos conectivos o mantener la elasticidad y la fuerza de tejidos conectivos intactos sin destrucción de los mismos, es importante formar y mantener las proteínas de matriz extracelular (MEC) (en inglés, ECM), tales como colágenos tipo I y tipo III, elastina, fibronectina, etc., presentes en la piel. El envejecimiento natural o la exposición crónica a radiación ultravioleta tiene como resultado la pérdida de proteínas de MEC y la reducción de elasticidad y fuerza de los tejidos cutáneos, que están estrechamente asociadas con las características de 25 envejecimiento de la piel, tales como la formación de arrugas. Las metaloproteinasas de matriz (MMP) actúan como enzima clave en la degradación de la MEC dérmica. La sobreexpresión de las MMP en queratinocitos y fibroblastos dérmicos en condiciones de estrés, tales como la irradiación ultravioleta, contribuye a la degradación de las proteínas de MEC, formándose así arrugas en la piel.

30 Una respuesta inflamatoria se conoce como una respuesta protectora de un organismo vivo para rehabilitar las estructuras y funciones de los tejidos dañados por infección, traumatismo, etc. La movilización de leucocitos a un foco de inflamación es crítica para la resolución rápida de infecciones y la restauración de daños tisulares resultantes de una variedad de daños. Sin embargo, una respuesta inflamatoria mal dirigida o prolongada provoca daños en los 35 tejidos del cuerpo o enfermedades. Por ejemplo, las enfermedades inflamatorias las causan infecciones bacterianas o víricas, por ejemplo, meningitis cerebroespinal, enteritis, dermatitis, uveítis, encefalitis o síndrome de dificultad respiratoria del adulto, o factores no infecciosos, por ejemplo, traumatismo, enfermedades autoinmunes o rechazo de trasplante de órganos. Las enfermedades inflamatorias se clasifican en enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, según los síntomas o las características patológicas. La inflamación aguda, tal como una alergia o una 40 infección bacteriana/vírica, se manifiesta con signos locales tales como un cambio en el flujo sanguíneo, tamaño de los vasos sanguíneos y permeabilidad vascular y el reclutamiento de leucocitos. En cambio, una característica patológica principal de la inflamación crónica tal como una artritis reumatoide, arteroesclerosis, infección de riñón crónico o hepatocirrosis, es una emigración continua de macrófagos, linfocitos o células plasmáticas a los focos de inflamación debido a la recurrencia de factores inflamatorios, provocando así una respuesta inflamatoria de larga 45 duración.

Para inducir una respuesta inflamatoria, la emigración de leucocitos a los focos de inflamación es un hecho esencial. En la emigración de leucocitos están implicadas muchas moléculas de adhesión celular. Es decir, la emigración de leucocitos incluye una etapa de rodadura, en la que los leucocitos se movilizan a los vasos sanguíneos de los 50 lugares inflamados mediante quimiocinas secretadas desde los sitios inflamados y después ruedan sobre las superficies de las células endoteliales vasculares, mientras se reduce la velocidad de movimiento celular; una etapa de adhesión, en la que los leucocitos detienen su rodadura y se adhieren firmemente a las células endoteliales vasculares; y una etapa de transmigración, donde los leucocitos migran a través de los vasos capilares y las membranas basales. La etapa final, es decir, la etapa de transmigración también se denomina "diapédesis".

55 Las células cancerosas inducidas mediante carcinógenos proliferan rápidamente con respecto a las células normales, formando así masas tumorales, que invaden tejidos circundantes e interfieren con las funciones normales del cuerpo. Las células cancerosas aportan nutrientes y oxígeno mediante la inducción de angiogénesis y la metástasis de las mismas también la provoca la angiogénesis. Aunque las células cancerosas crecen de forma infinita en lugares específicos, pueden también abandonar los sitios en que se originaron, migrar y crecer en nuevos lugares, cuyo proceso se denomina "metástasis". La metástasis implica varias etapas clave: conversión de células cancerosas en células mesenquimáticas migratorias, disociación de células mesenquimáticas desde los lugares tumorales originales, invasión y diseminación a través de los tejidos conectivos circundantes y vasos capilares, migración a través de vasos sanguíneos, escape de los vasos sanguíneos, migración a través de los tejidos 60 conectivos y proliferación en lugares secundarios.

Por su parte, la adiponectina es una de las adipocinas, hormonas proteicas secretadas específicamente en adipocitos. La adiponectina promociona la función de la insulina e induce resistencia a insulina, desempeñando así un papel importante en el control de enfermedades cardiovasculares, tales como hiperglucemia, hiperinsulinemia, obesidad y arteriosclerosis. Y también, la adiponectina tiene las funciones de suprimir la metástasis de células cancerosas y la respuesta inflamatoria. La adiponectina también realiza las funciones de cicatrización de heridas, inhibición de fibrosis, atenuación de las arrugas de la piel e hidratación, al facilitar las expresiones de filagrina, ácido hialurónico y matriz extracelular, así como la proliferación de queratinocitos en la piel.

## Divulgación

10

### Problema técnico

Los presentes inventores han encontrado que los fragmentos peptídicos específicos o péptidos pequeños derivados de adiponectina facilitan la proliferación de fibroblastos e inducen la formación de matriz extracelular, tal como el colágeno, mostrando así actividades excelentes para la cicatrización de heridas y la regeneración tisular. Y también, los presentes inventores han encontrado que los fragmentos peptídicos específicos inducen la formación de la barrera cutánea al facilitar la expresión de filagrina, mostrando así actividad hidratante de la piel. Además, los presentes inventores han encontrado que los fragmentos peptídicos específicos inhiben reacciones alérgicas y respuestas inflamatorias (especialmente, respuestas inflamatorias en la piel) a través de la inhibición de la transmigración de leucocitos; e inhiben la metástasis de células cancerosas a través de la inhibición de la invasión de células cancerosas.

Por tanto, proporcionar una composición farmacéutica y cosmética que comprenda los fragmentos peptídicos específicos derivados de adiponectina como un ingrediente activo, es un objetivo de la presente invención.

25

### Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de la piel, que comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 6 como un ingrediente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la composición farmacéutica de la presente invención, la enfermedad de la piel puede ser dermatitis, arrugas de la piel, heridas o piel seca; preferentemente una o más dermatitis seleccionadas del grupo que consiste en dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, acné común, dermatitis inducida por radiación ultravioleta, ecema y psoriasis.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición cosmética para inhibir o mejorar una alteración de la piel, que comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 6 como un ingrediente activo.

40

En la composición cosmética de la presente invención, la alteración de la piel puede ser dermatitis, arrugas de la piel o piel seca, preferentemente arrugas de la piel o piel seca.

45

**Efectos ventajosos**  
Los péptidos de la presente invención, es decir, los péptidos seleccionados del grupo que consiste en los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 6, facilitan la proliferación de fibroblastos e inducen la formación de matriz extracelular, tal como el colágeno, mostrando así actividades excelentes para la cicatrización de heridas y la regeneración tisular. Y también, los péptidos de la presente invención inducen la formación de la barrera cutánea al facilitar la expresión de filagrina, mostrando así actividad hidratante de la piel. Por tanto, dichos péptidos pueden aplicarse provechosamente a una composición farmacéutica para cicatrizar heridas o que facilita la cicatrización de heridas y a una composición cosmética para inhibir la formación de arrugas en la piel y para hidratar la piel.

Y también, los péptidos de la presente invención inhiben reacciones alérgicas y respuestas inflamatorias (especialmente, respuestas inflamatorias en la piel) a través de la inhibición de la transmigración de leucocitos; e inhiben la metástasis de células cancerosas a través de la inhibición de la invasión de células cancerosas. Por tanto, dichos péptidos pueden aplicarse provechosamente a una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergias o enfermedades inflamatorias, a una composición cosmética para inhibir o mejorar la alergia o dermatitis de la piel y a una composición farmacéutica para inhibir la metástasis de células cancerosas.

60

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los resultados obtenidos al evaluar los efectos de los péptidos de la presente invención sobre la proliferación de fibroblastos.

65

La Fig. 2 muestra los resultados obtenidos al evaluar los efectos de los péptidos de la presente invención sobre la síntesis de colágeno en fibroblastos.

La Fig. 3 muestra los resultados obtenidos al evaluar los efectos de los péptidos de la presente invención sobre la síntesis de profilagrina.

Las Figs. 4a a 4d muestran los resultados obtenidos al evaluar los efectos de los péptidos de la presente invención sobre la actividad de NF-κB.

5 La Fig. 5 muestra los resultados obtenidos al medir la transmigración de la línea celular de monocitos humanos (U937), después del tratamiento con los péptidos de la presente invención.

La Fig. 6 muestra los resultados obtenidos al medir la invasión de la línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) en matriz, después del tratamiento con los péptidos de la presente invención.

## 10 Mejor modo

A lo largo de la memoria descriptiva, la expresión "enfermedad de la piel" incluye todas las enfermedades de la piel, especialmente las enfermedades provocadas por anomalías en las funciones de la piel mediadas por adiponectina.

15 Entre los ejemplos de enfermedad de la piel se incluyen dermatitis, arrugas de la piel, heridas y piel seca. Dicha dermatitis incluye dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, acné común (o erupción acneiforme), dermatitis inducida por radiación ultravioleta, eccema, psoriasis y demás. Dichas arrugas de la piel incluyen las arrugas según la estimulación con UV y/o de la edad. Dichas heridas incluyen una quemadura o un daño de la piel provocado por estimulación con UV. Dicha piel seca incluye xerodermia, síndrome de Sjogren y demás.

20 20 La expresión "alteración de la piel" incluye todas las enfermedades de la piel, especialmente las alteraciones provocadas por anomalías en las funciones de la piel mediadas por adiponectina. Entre los ejemplos de alteración de la piel se incluyen dermatitis, arrugas de la piel o piel seca. Dicha dermatitis incluye dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, acné común, dermatitis inducida por radiación ultravioleta, eccema, psoriasis y demás. Dichas arrugas de la piel incluyen las arrugas según la estimulación con UV y/o de la edad. Dicha piel seca incluye xerodermia, síndrome de Sjogren y demás.

25 Los presentes inventores prepararon varios fragmentos derivados de adiponectina e investigaron las actividades de los mismos. De manera sorprendente, los presentes inventores han encontrado que los fragmentos peptídicos pequeños específicos que tienen de 3 a 5 aminoácidos derivados de adiponectina facilitan la proliferación de fibroblastos e inducen la formación de matriz extracelular, tal como el colágeno, mostrando así actividades excelentes para la cicatrización de heridas y la regeneración tisular. Y también, los presentes inventores han encontrado que dichos fragmentos inducen la formación de barrera cutánea al facilitar la expresión de filagrina, mostrando así actividad hidratante de la piel. Además, los presentes inventores han encontrado que dichos fragmentos peptídicos inhiben reacciones alérgicas y respuestas inflamatorias (especialmente, respuestas inflamatorias en la piel) a través de la inhibición de la transmigración de leucocitos; e inhiben la metástasis de células cancerosas (especialmente, células cancerosas de la piel) a través de la inhibición de la invasión de células cancerosas. Los fragmentos peptídicos se muestran en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

Nombre del péptido	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
adipo-pep A4	SEQ ID NO: 1	Tyr-His-Ile-Thr
adipo-pep A3	SEQ ID NO: 2	His-Ile-Thr
adipo-pep B5	SEQ ID NO: 3	Leu-Phe-Thr-Tyr-Asp
adipo-pep B4	SEQ ID NO: 4	Leu-Phe-Thr-Tyr
adipo-pep B3	SEQ ID NO: 5	Phe-Thr-Tyr
adipo-pep C3	SEQ ID NO: 6	His-Leu-Thr

40 40 Por tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de la piel, que comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 6 como un ingrediente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En la composición farmacéutica de la presente invención, la enfermedad de la piel puede ser dermatitis, arrugas de la piel, heridas o piel seca; preferentemente una o más dermatitis seleccionadas del grupo que consiste en dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, acné común, dermatitis inducida por radiación ultravioleta, eccema y psoriasis.

45 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para inhibir la metástasis del cáncer, preferentemente para inhibir la metástasis del cáncer de piel, que comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 6 como un ingrediente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, aditivos tales como lactosa o almidón de maíz, lubricantes tales como estearato de magnesio, emulsionantes disponibles en la actualidad, agentes de suspensión, tampones, agentes isotónicos, etc. La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse en una forma farmacéutica por vía oral o parenteral, preferentemente en una forma farmacéutica por vía parenteral. Se prepara, generalmente, una solución esterilizada de un ingrediente activo para administrar por vía intramuscular, intraperitoneal, subcutánea o

intravenosa. En este caso, la solución esterilizada puede incluir un tampón para conseguir el valor de pH deseado. Con respecto a las formulaciones para administración intravenosa, se puede utilizar un agente isotónico para hacer las formulaciones isotónicas. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular en soluciones acuosas que incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un suero salino de pH 7,4. Las

5 soluciones acuosas se pueden introducir en el torrente sanguíneo intramuscular de un paciente mediante inyección en bolo local. La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar a pacientes que sufren diversas enfermedades de la piel y cánceres, tales como alergia de la piel, dermatitis, arrugas de la piel, heridas, piel seca, etc., con una posología diaria de aproximadamente 1 a 2.000 mg/kg. Una posología adecuada se cambia generalmente según la edad, peso corporal y procesos de un paciente.

10 15 Y también, la presente invención incluye dentro de su alcance una composición cosmética funcional que comprende dichos péptidos como un ingrediente activo. Es decir, la presente invención proporciona una composición cosmética para inhibir o mejorar una alteración de la piel, que comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 6 como un ingrediente activo. En la composición cosmética de la presente invención, la alteración de la piel puede ser dermatitis, arrugas de la piel o piel seca, preferentemente arrugas de la piel o piel seca.

20 La composición cosmética de la presente invención se puede preparar de diversas formas según los métodos convencionales al respecto. Por ejemplo, la composición cosmética se puede preparar en las formas de productos cosméticos, soluciones cosméticas, cremas, lociones, etc., en las que pueden estar diluidas con un agua de limpieza, una solución astringente o una solución hidratante, para el uso al respecto. Y también, la composición cosmética puede incluir excipientes convencionales, tales como un estabilizante, un agente solubilizante, vitaminas, un pigmento, un agente aromatizante, los cuales se utilizan convencionalmente en el campo de la composición cosmética. En la composición cosmética, dichos péptidos pueden estar presentes en una cantidad suficiente para proporcionar los efectos para mejorar la alergia o inflamación de la piel, por ejemplo, en una cantidad que va del 0,001 al 10 del % del peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,01 al 1 del % peso, basándose en el peso total de la composición.

25 30 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente mediante los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales. Sin embargo, los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales se proporcionan solo para ilustraciones y por tanto, la presente invención no se limita a ellos o por ellos.

#### **Ejemplo 1: Síntesis de péptidos**

35 Los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 6 (en la Tabla 1 anterior) se sintetizaron con un sintetizador peptídico automático (PeptrEx-R48, Peptron, Daejeon, Corea) utilizando un método en fase sólida de FMOC. Los péptidos sintetizados se purificaron y analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (HPLC de fase inversa) (Prominence LC-20AB, Shimadzu, Japón) utilizando una columna analítica de RP (de fase inversa, del inglés, Reverse Phase) C18 (Shiseido capcell pak) y aislado utilizando un espectrómetro de masas (HP 1100 Series LC/MSD, Hewlett-Packard, Roseville, EE.UU.).

#### **Ejemplo 2: Preparación de composiciones que contienen péptidos**

40 45 Los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 6 se disolvieron respectivamente en suero salino tamponado con fosfato (PBS) en una concentración 1 M. Las soluciones proteicas restantes se diluyeron con PBS y se utilizaron después en los siguientes ejemplos experimentales.

#### **Ejemplo experimental 1: Pruebas para facilitar la proliferación de la línea celular de fibroblastos de ratón NIH3T3**

50 55 60 Las células NIH3T3 (línea celular de fibroblastos de ratón, ATCC CRL-1658, EE.UU.), junto con 100 µl de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), se añadieron a cada pocillo de la microplaca de 96 pocillos en la concentración de 5 X 10<sup>3</sup> células por pocillo y se cultivaron después en una incubadora de CO<sub>2</sub> 5 % a 37 °C durante 24 horas. Las soluciones de péptidos (100 µl) que tienen el péptido respectivo de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 5 en la concentración de 10 µM se añadieron a cada pocillo. Durante la incubación de las células durante 24, 48 y 72 horas a partir de las cuales, se añadieron 10 µl de CCK-8 (Dojindo Laboratories, Japón) a cada pocillo y se midió la absorbancia respectiva a 475 nm con un lector de placas Spectramax plus 190 (Molecular Devices, EE.UU.). Los resultados al respecto se muestran en la Fig. 1. Tal como se muestra en la Fig. 1, las proliferaciones de las células NIH3T3 se incrementaron significativamente en los grupos tratados con los péptidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 5. Estos resultados muestran que los péptidos de la presente invención tienen actividades cicatrizantes de heridas y regeneradoras de la piel al facilitar la proliferación de fibroblastos.

#### **Ejemplo experimental 2: Evaluación sobre activación de expresión del procolágeno tipo-1 en fibroblastos**

65 Dado que la promoción de la síntesis de fibras de colágeno es uno de los medios para inhibir el envejecimiento de la piel, se evalúa si la síntesis de colágeno en fibroblastos se ve facilitada por el tratamiento de los péptidos de la

presente invención, utilizando las células NIH3T3 (línea celular de fibroblastos de ratón, ATCC CRL-1658, EE.UU.). Se trataron los fibroblastos con los péptidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 5, en las concentraciones de 0,1, 1 y 10 µM, respectivamente. Después de 48 horas, los extractos celulares se sometieron a un ensayo de transferencia Western para medir las expresiones de procolágeno tipo-1. Los resultados al respecto se muestran en la Fig. 2. Tal como se muestra en la Fig. 2, las expresiones de procolágeno tipo-1 se incrementaron por el tratamiento de los péptidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 5 de manera dependiente de la concentración. Por tanto, se puede apreciar que los péptidos de la presente invención pueden inhibir el envejecimiento de la piel derivado de la pérdida de colágeno, especialmente las arrugas de la piel.

**10 Ejemplo experimental 3: Evaluación sobre el control de la expresión de profilagrina en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT**

Dado que la profilagrina es uno de los principales elementos para la constitución de la barrera cutánea, se evalúa si la síntesis de profilagrina en queratinocitos se ve facilitada por el tratamiento de los péptidos de la presente invención, utilizando células HaCaT (línea celular de queratinocitos humanos, DKFZ, Heidelberg, Alemania). Se trataron las células HaCaT con los péptidos de las SEQ ID NO: 3 y 5, en las concentraciones de 0,1, 1,0 y 10 µM. Después de 48 horas, los extractos celulares se sometieron a un ensayo de transferencia Western para medir las expresiones de profilagrina. Los resultados al respecto se muestran en la Fig. 3. Tal como se muestra en la Fig. 3, las expresiones de profilagrina se incrementaron por el tratamiento de los péptidos de las SEQ ID NO: 3 y 5 de manera dependiente de la concentración. Por tanto, se puede apreciar que los péptidos de la presente invención tienen una actividad hidratante de la piel al facilitar la expresión de profilagrina.

**Ejemplo experimental 4: Pruebas para la inhibición de la actividad de NF- $\kappa$ B**

25 Se analizaron los efectos de los péptidos de la presente invención sobre la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B según el método de ensayo de unión de proximidad *in situ*. El análisis se realizó utilizando el reactivo Duolink® In Situ (Olink Bioscience, Suecia).

30 Las células NIH3T3 ( $2,5 \times 10^4$  células) se sembraron en una placa de 24 pocillos, cada uno conteniendo un vidrio de 12 mm en el fondo. Las células se estabilizaron durante 24 horas y se trataron con los péptidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 5, en las concentraciones de 0,1, 1,0 y 10 µM. Después de 1 hora de los tratamientos, las células de cada pocillo se trataron con TNF- $\alpha$  (25 µg/ml) durante 2 horas. Después de que las células fijadas con paraformaldehído 4 % se trataran con Triton-X 0,1 %, se añadió una gota de la solución de bloqueo a las células, las cuales se incubaron después a 37 °C durante 30 minutos. Para medir los niveles de la traslocación del NF- $\kappa$ B al núcleo, se trataron las células con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-p50 (NF $\kappa$ B p50 (4D1): sc-53744, Santa Cruz Biotechnology, INC., EE.UU.) y el anticuerpo monoclonal de conejo anti-p65 (NF- $\kappa$ B p65 (D14E12) XP® rabbit mAb, Cell signaling Technology, EE.UU.) a 37 °C. Despues de 30 minutos, a partir de los cuales, se trataron las células con la solución de sonda de PLA a 37 °C durante 1 hora, con la solución de unión durante 30 minutos y después con la solución de amplificación durante 100 minutos. Despues de lavar las células, se midió el número de puntos trasladados al núcleo entre los NF- $\kappa$ B mostrados en puntos rojos con un microscopio confocal. Los resultados al respecto se muestran en las Figs. 4a a 4d. Como se muestra en las Fig. 4a a 4d, las traslocaciones en los grupos tratados con los péptidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 5 se redujeron significativamente (aproximadamente reducción del 25-60 %) en comparación con la del grupo de control. Estos resultados muestran que los péptidos de la presente invención inhiben la activación del NF- $\kappa$ B que juega un papel crucial en la síntesis de citocinas inflamatorias.

**45 Ejemplo experimental 5: Pruebas para la actividad inhibidora contra la migración transendotelial *in vitro* de monocitos**

50 Se cultivaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en los compartimentos superiores de cámaras Boyden. Se eliminaron los sobrenadantes y los monocitos humanos (U937), que han sido o no tratados con las soluciones de proteínas que incluyen el péptido de las SEQ ID NO: 3 a 5 (30 µg/ml) preparado en el Ejemplo 2 durante 1 hora, se sembraron a  $2 \times 10^5$  células/cámara. En este momento, un cultivo que incluye un sobrenadante obtenido por centrifugación del cultivo obtenido despues de cultivar los fibroblastos de ratón NIH/3T3 en DMEM libre de suero que contiene vitamina C 0,005 % y albúmina de suero bovino 0,1 % (BSA) durante 16 horas, se sembró en el compartimento inferior de las cámaras para inducir la invasión de los monocitos. Las cámaras se incubaron durante 6 horas y se midió el número de células que migraron a los compartimentos inferiores. La prueba se repitió tres veces y los resultados se muestran en la Fig. 5. El grupo de control se trató solo con PBS sin contener ningún péptido. Tal como se muestra en la Fig. 5, los números de monocitos migrados en los grupos tratados con los péptidos de la presente invención se redujeron significativamente (aproximadamente reducción del 50-70 %) en comparación con el grupo de control. Teniendo en cuenta que la transmigración es esencial para la migración de los leucocitos a los lugares de inflamación a través de vasos sanguíneos, se espera que los péptidos de la presente invención puedan inhibir eficazmente la reacción inflamatoria.

**Ejemplo experimental 6: Pruebas para la actividad inhibidora contra la invasión de células cancerosas**

65 Despues de que el matrizel, componentes de membrana basal, se someta a reacción de polimerización en un

Transwell, las células de cáncer de mama humano MCF-7 ( $1,5 \times 10^5$  células) se cargaron en el compartimento superior del Transwell y se trataron después con cada péptido de las SEQ ID NO: 3 a 5 en la concentración de 1  $\mu\text{M}$ . Las células se cultivaron en una incubadora de  $\text{CO}_2$  5 % a 37 °C. Se añadió BSA 0,1 % al compartimento superior del Transwell. Después de que se colocara un medio que induce la invasión (el sobrenadante aislado después de cultivar células NIH 3T3 en el DMEM libre de suero que contiene vitamina C 0,005 % y albúmina de suero bovino 0,1 % durante 24 horas) en cada compartimento inferior, se contaron las células que migraron a los compartimentos inferiores de los Transwell tres veces en intervalos de 24 horas y los resultados se analizaron después estadísticamente. El grupo de control se trató solo con PBS sin contener ningún péptido. Los resultados al respecto se muestran en la Fig. 6. Tal como se muestra en la Fig. 6, las tasas de invasión de membrana basal de las células de cáncer de mama humano en los grupos tratados con los péptidos de las SEQ ID NO: 3 a 5 de la presente invención se redujeron en aproximadamente un 80 % en comparación con el grupo de control. Teniendo en cuenta que las células cancerosas provienen de vasos sanguíneos e invaden membranas basales o tejidos conectivos circundantes y se extienden después a lugares secundarios, se puede observar que los péptidos de la presente invención pueden inhibir eficazmente la metástasis de células cancerosas.

15           <110> KNU-Industry Cooperation Foundation  
              SUPADELIXIR INC.

20           <120> Composiciones que comprenden un péptido derivado de adinopectina

              <130> PX0146PCT

25           < 150> 10-2013-0111502

              <151> 17/09/2013

25           <160> 6

30           <170> KopatentIn 2.0

30           <210> 1

              <211> 4

              <212> PRT

              <213> Secuencia artificial

35           <220>

              <223> Fragmento peptídico

              <400> 1

40           Tyr His Ile Thr  
              1

              <210> 2

              <211> 3

              <212> PRT

45           <213> Secuencia artificial

              <220>

              <223> Fragmento peptídico

50           <400> 2

              His Ile Thr  
              1

              <210> 3

              <211> 5

              <212> PRT

55           <213> Secuencia artificial

              <220>

              <223> Fragmento peptídico

              <400> 3

Leu Phe Thr Tyr Asp  
1 5

5 <210> 4  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
10 <220>  
<223> Fragmento peptídico  
<400> 4

Leu Phe Thr Tyr  
1

15 <210> 5  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
20 <220>  
<223> Fragmento peptídico  
<400> 5

Phe Thr Tyr  
1

25  
  
30 <210> 6  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
35 <220>  
<223> Fragmento peptídico  
<400> 6

His Leu Thr  
1

**REIVINDICACIONES**

- 5        1. Una composición farmacéutica adecuada para prevenir o tratar una enfermedad de la piel, que comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 6 como un ingrediente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10      2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, donde la enfermedad de la piel es dermatitis, arrugas de la piel, heridas o piel seca.
- 15      3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2, donde la enfermedad de la piel es una o más dermatitis seleccionadas del grupo que consiste en dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, acné común, dermatitis inducida por radiación ultravioleta, eccema y psoriasis.
- 20      4. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el vehículo se selecciona de: aditivos, opcionalmente lactosa y almidón de maíz, lubricantes, opcionalmente estearato de magnesio, emulsionantes, agentes de suspensión, tampones, agentes isotónicos y soluciones isotónicas, opcionalmente solución salina.
- 25      5. Una composición cosmética adecuada para inhibir o mejorar una alteración de la piel, que comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 6 como un ingrediente activo.
- 30      6. Una composición cosmética según la reivindicación 5, donde la alteración de la piel es dermatitis, arrugas de la piel o piel seca.
- 35      7. Una composición cosmética según la reivindicación 6, donde la alteración de la piel es arrugas de la piel o piel seca.
- 40      8. Una composición cosmética según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que comprende adicionalmente un excipiente, opcionalmente un estabilizante, un agente solubilizante, vitaminas, un pigmento o un agente aromatizante.
- 45      9. Una composición cosmética o farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el péptido es el péptido de la SEQ ID NO: 1.
- 50      10. Una composición cosmética o farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el péptido es el péptido de la SEQ ID NO: 2.
11. Una composición cosmética o farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el péptido es el péptido de la SEQ ID NO: 3.
12. Una composición cosmética o farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el péptido es el péptido de la SEQ ID NO: 4.
13. Una composición cosmética o farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el péptido es el péptido de la SEQ ID NO: 5.
14. Una composición cosmética o farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el péptido es el péptido de la SEQ ID NO: 6.

FIG. 1

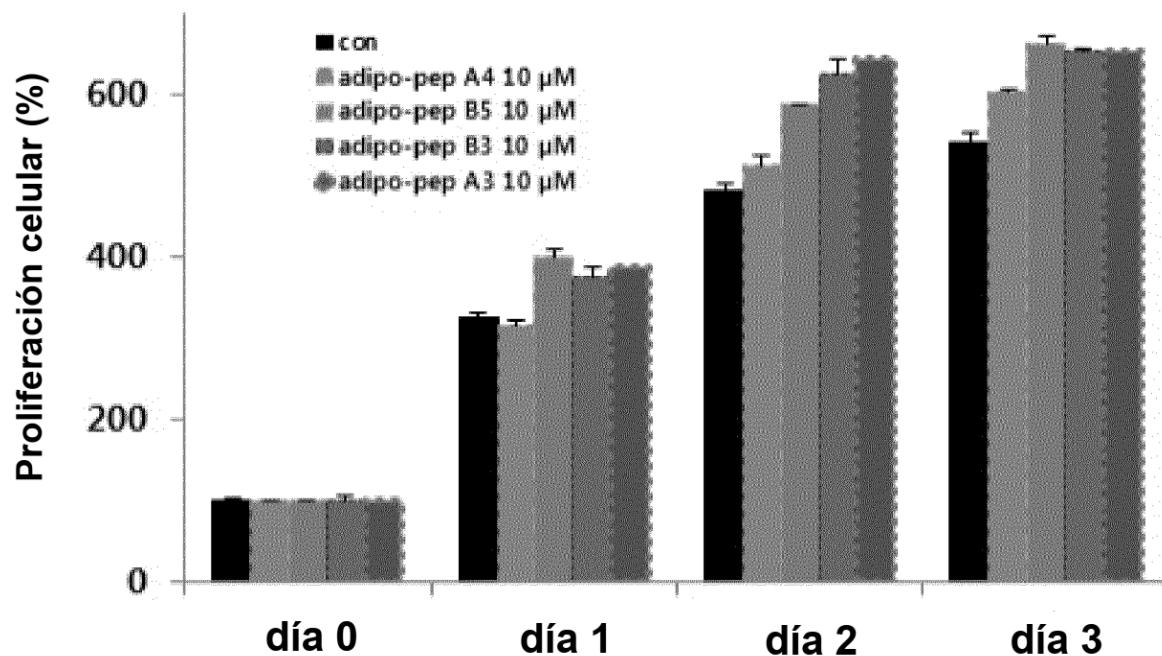


FIG. 2

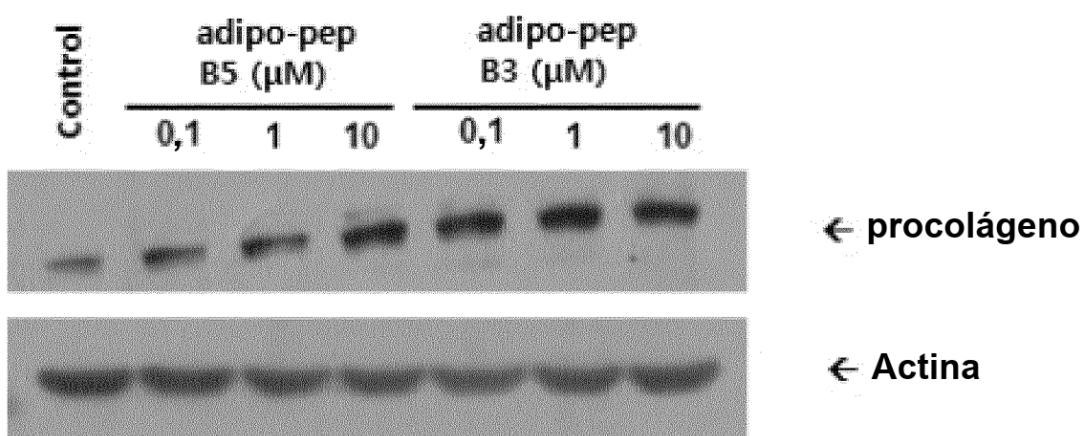
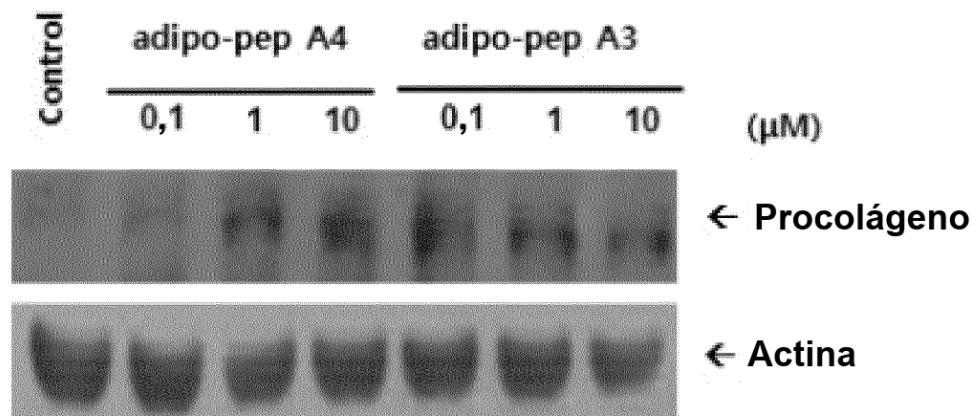


FIG. 3

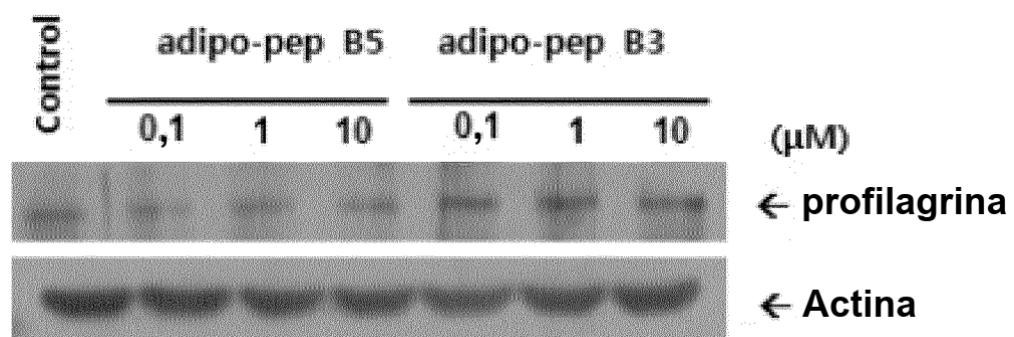


FIG. 4a

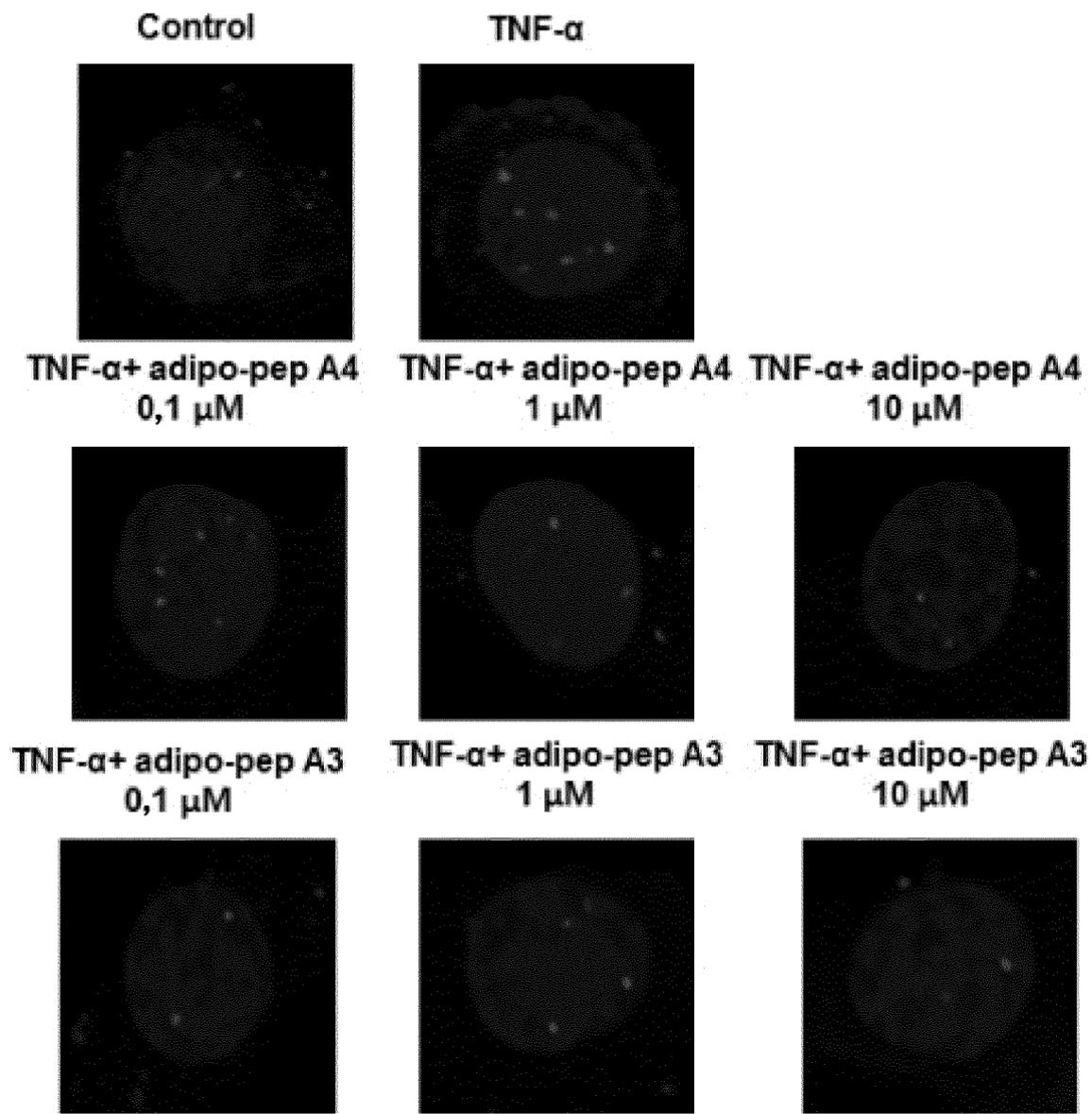


FIG. 4b

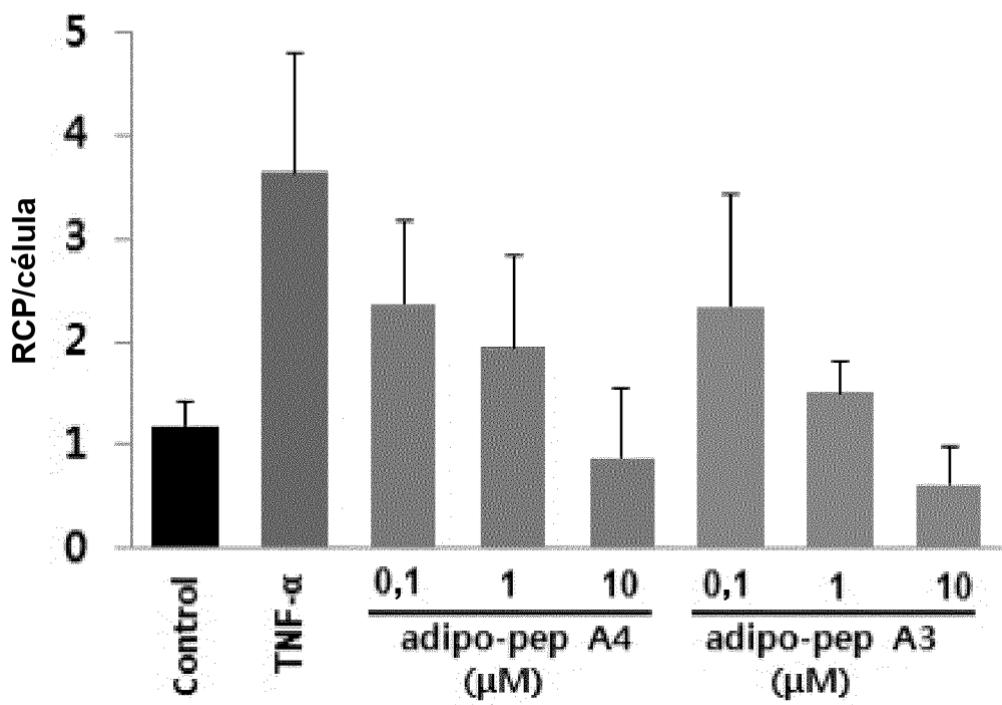


FIG. 4c

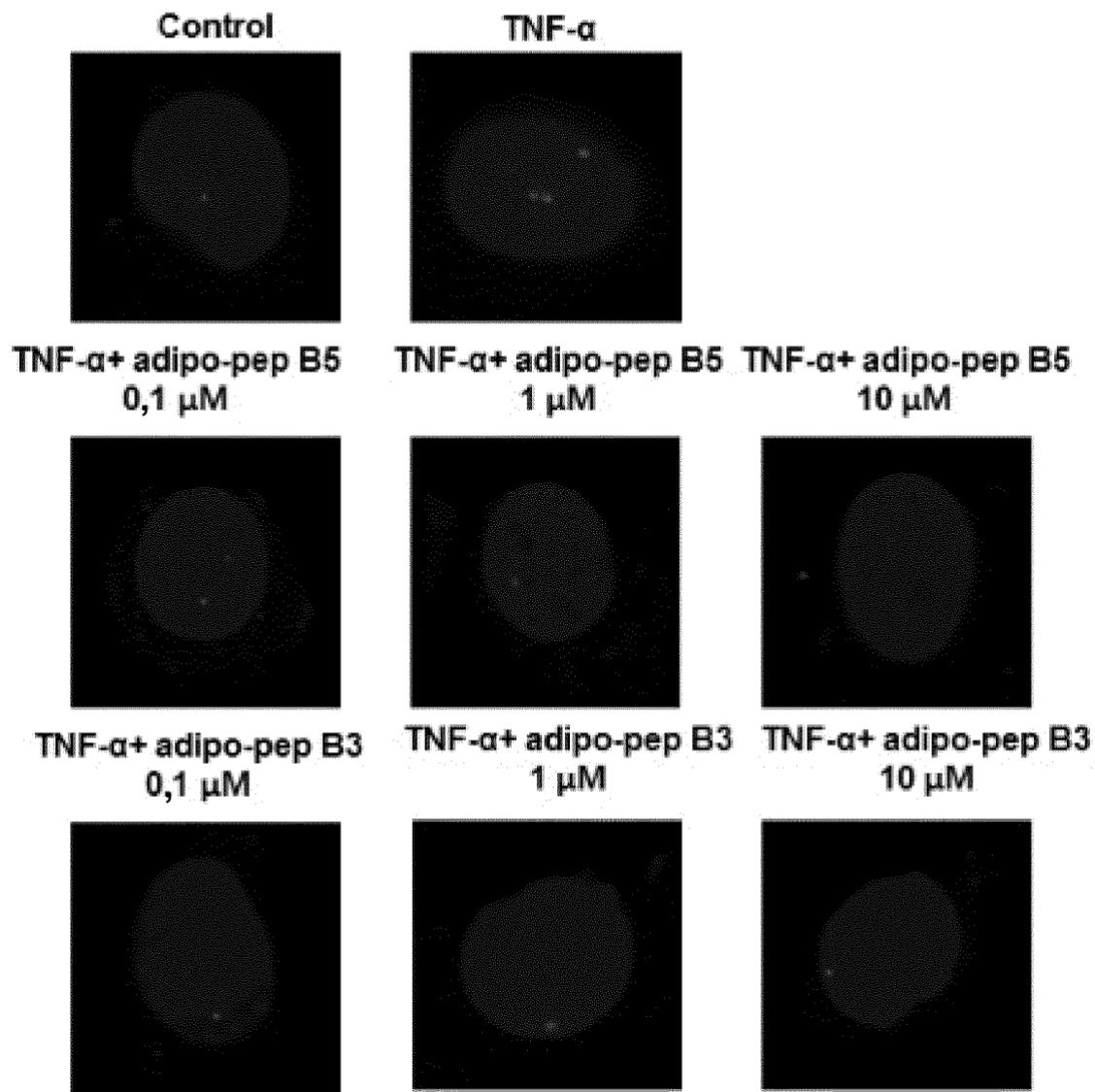


FIG. 4d

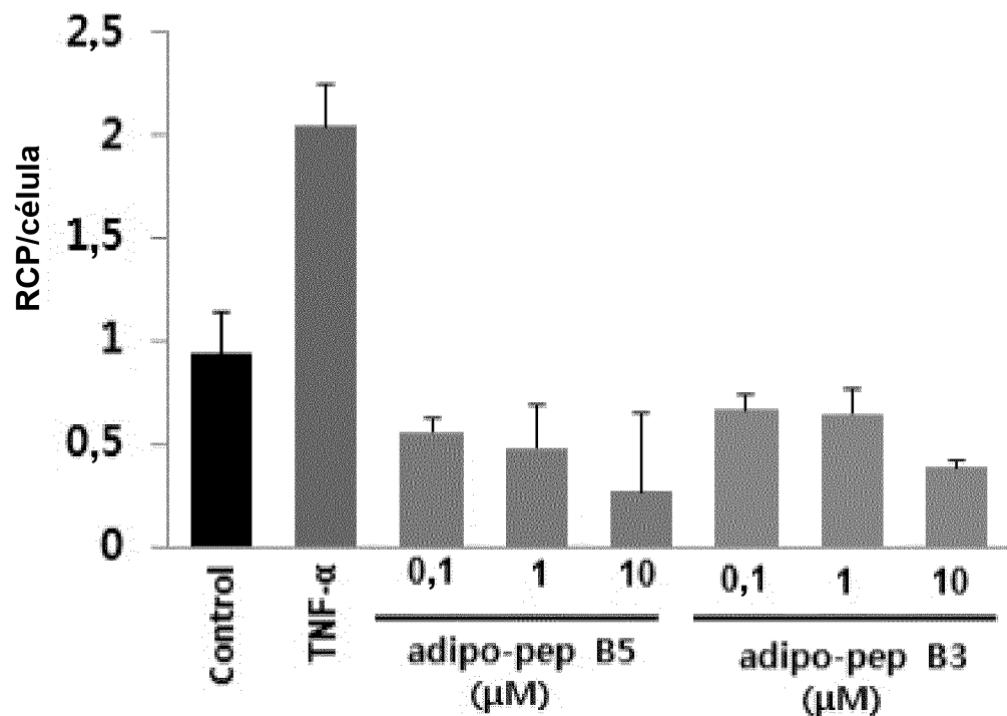
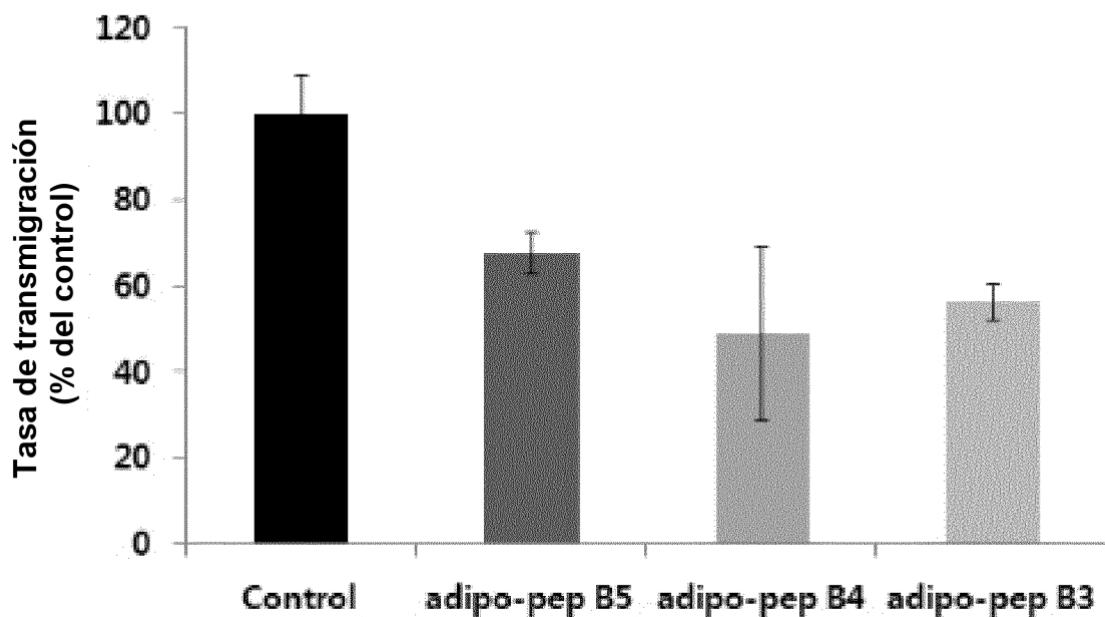


FIG. 5



**FIG. 6**

