

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 230**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)  
**A61P 3/00** (2006.01)  
**A61P 3/04** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2020 PCT/CN2020/112007**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.03.2021 WO21037187**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2020 E 20855987 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2025 EP 4023663**

54 Título: **Polipéptido y su aplicación**

30 Prioridad:  
**29.08.2019 CN 201910807205**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.04.2025**

73 Titular/es:  
**HDL SOLUTIONS OTTAWA (100.00%)  
Unit 4, 300A Eagleson Road  
Ottawa, Ontario K2M 1C9, CA**

72 Inventor/es:  
**DONG, FUMIN**

74 Agente/Representante:  
**MILTENYI, Peter**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 015 230 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

Polipéptido y su aplicación

**Campo de la invención**

La invención pertenece al campo de la biomedicina, y está específicamente relacionada con un polipéptido y su aplicación.

5

**Antecedentes de la invención**

La esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) se caracteriza por la acumulación excesiva de lípidos, tales como triglicéridos y colesterol libre, en los hepatocitos. Se calcula que la EHNA afecta a un 25 % de la población general en todo el mundo. La prevalencia de la EHNA se registró en ~50 % de los pacientes con obesidad, ~23 % de los pacientes con diabetes de tipo 2, ~70 % de los pacientes con hiperlipidemia, ~40 % de los pacientes con hipertensión y ~41 % de los pacientes con hipertrigliceridemia. Los pacientes con EHNA pueden padecer hepatopatía progresiva, en concreto, esteatohepatitis no alcohólica (ENA), carcinoma hepatocelular (CHC) y cirrosis.

10

15

20

Debido a la desconocida e impredecible historia natural de la EHNA, las agencias reguladoras no han aprobado ningún tratamiento farmacológico específico para la EHNA. Una de las intervenciones para controlar la EHNA consiste en modificar el estilo de vida, p. ej., la alimentación, hacer ejercicio y perder peso. La Guía Práctica recomienda una pérdida de peso de al menos 3 %-5 % para mejorar la esteatosis, más pérdida de peso (7 %-10 %) para beneficiar las características histopatológicas de la ENA, incluida la fibrosis. Aunque las infecciones por virus, los fármacos, las afecciones metabólicas y las toxinas pueden causar EHNA, los principales factores de riesgo son la obesidad, intolerancia a la glucosa, hipertensión, hipertrigliceridemia, colesterol HDL bajo. En comparación con las poblaciones de control, los pacientes con EHNA presentan mayor mortalidad, siendo la enfermedad cardiovascular (ECV) la principal causa de muerte (38 %) frente a las complicaciones directas de hepatopatía (8 %).

25

30

35

Dado que los niveles elevados de LDL se asocian a un mayor riesgo de aterosclerosis, y que la concentración de HDL se correlaciona inversamente con el desarrollo de aterosclerosis, reducir las LDL o aumentar las HDL se han convertido en las dos intervenciones principales. Al inhibir la HMG-CoA reductasa para reducir la síntesis de colesterol, las estatinas pueden reducir las LDL hasta un 50-60 %. Por ello, las estatinas se convierten actualmente en el tratamiento principal de la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, los informes demuestran que las mujeres posmenopáusicas tienen un riesgo dos veces mayor de desarrollar cáncer de mama en comparación con las que nunca han utilizado estatinas. El tratamiento con estatinas desencadena incluso una nueva aparición de diabetes. Otros efectos adversos de las estatinas son pérdida cognitiva, neuropatía, disfunción pancreática y hepática, y disfunción sexual. Además, las estatinas protegen a los pacientes frente a la morbilidad cardiovascular con una eficacia inferior al 30 %. La justificación del uso de estatinas en pacientes con EHNA es que el aumento del riesgo de ECV y de muerte relacionada con problemas cardiovasculares, supera los efectos adversos de las estatinas, especialmente en una situación de ausencia de opciones terapéuticas eficaces. Por tanto, es necesario buscar enfoques terapéuticos alternativos para tratar la esteatosis hepática y las enfermedades cardiovasculares.

40

45

El miembro 1 de la subfamilia A del casete de unión a ATP (ABCA1, *ATP Binding Cassette 1*) es una proteína transportadora asociada a la membrana que efluye colesterol y fosfolípidos a la apoA1 (apolipoproteína A1) extracelular pobre en lípidos para formar HDL naciente. La actividad enzimática en las partículas de HDL nacientes da lugar a partículas de HDL maduras que participan en la eliminación del colesterol y fosfolípidos de los tejidos periféricos. El exceso de colesterol puede llegar al hígado y después secretarse en la bilis para su eliminación a través de las heces. Las mutaciones en el ABCA1 humano pueden provocar deficiencia hereditaria de HDL y la enfermedad de Tangier debido a la baja capacidad de efluencia de colesterol. En los tejidos de los pacientes aparecen más macrófagos espumosos cargados con lípidos. Se ha demostrado que la expresión de la HMG-CoA (hidroximetilglutaril CoA) reductasa está aumentada y que la capacidad de efluencia de colesterol está alterada en la EHNA y la ENA, con la consiguiente acumulación de colesterol celular.

50

En el documento WO 01/32184 A2 se describen métodos y compuestos para reducir los niveles de LDL o de colesterol en suero, o para reducir el transporte de colesterol del intestino a la sangre o a la linfa, basándose en la observación de que para que el colesterol se transporte desde la luz intestinal al torrente sanguíneo, se requiere un gen conocido como ABC1.

55

En el documento WO 00/78970 A1 se describen ácidos nucleicos correspondientes a diferentes exones e intrones del gen ABC1, que se muestra como un gen causante de patologías relacionadas con la disfunción del metabolismo del colesterol causante de enfermedades, tales como la aterosclerosis.

60

**Sumario de la invención**

La invención se define en las reivindicaciones.

Dado el papel del ABCA1 en la efluencia de colesterol, el inventor de la presente solicitud supone que es posible reducir la acumulación de lípidos en los hepatocitos, reducir la inflamación, estabilizar o tratar la aterosclerosis mediante el control del ABCA1, completando así la presente invención.

- 5 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un polipéptido innovador que pueda prevenir y tratar la esteatosis hepática no alcohólica, la aterosclerosis o el síndrome metabólico, o lograr la pérdida de peso.

Otro objetivo de la presente invención es definir la aplicación del polipéptido.

- 10 En una realización, la presente invención se dirige a un polipéptido, en donde el polipéptido consiste en 16-23, preferentemente 16-21, o más preferentemente 21 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

- 15 Preferentemente, el polipéptido consiste en la secuencia consecutiva de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

Preferentemente, uno o más de los aminoácidos del polipéptido de la presente invención está en forma enantiomérica D. Más preferentemente, todos los aminoácidos del polipéptido están en forma enantiomérica D.

- 20 Preferentemente, el polipéptido de la presente invención se conjuga con ácido esteárico. Más preferentemente, el polipéptido se conjuga con ácido esteárico en su extremo (p. ej., extremo N).

En segundo lugar, la presente invención define el polipéptido de la invención para su uso en la prevención o el tratamiento de la esteatosis hepática no alcohólica, la aterosclerosis, el síndrome metabólico o la obesidad.

- 25 En la presente invención, el síndrome metabólico se refiere a un proceso patológico en el que el trastorno metabólico se produce en las proteínas, grasa, hidratos de carbono, etc. del cuerpo humano. Se trata de un conjunto de factores de riesgo que están relacionados entre sí y conducen a una mayor probabilidad de desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares.

- 30 El modelo de ratón de aterosclerosis (ratones con inactivación de apoE (apolipoproteína E)), se utilizó durante la presente invención. El experimento se llevó a cabo *in vivo* con la inyección intravenosa de polipéptidos a dosis bajas de 50 microgramos por ratón una vez cada cuatro días durante cuatro semanas. En comparación con los ratones no tratados, el polipéptido pudo impedir la acumulación de lípidos neutros en el tejido hepático causada por una dieta rica en grasa y colesterol en un 53 %; compensar el aumento de peso por la alimentación; impedir la placa aterosclerótica en la raíz aórtica en un 35 %; e impedir la lesión aterosclerótica de la aorta completa en un 48 %. Se ha confirmado que existe una relación bilateral entre los factores de riesgo, como la obesidad, diabetes, síndrome metabólico, para desarrollar esteatosis hepática y aterosclerosis. Por lo tanto, el polipéptido de la presente invención puede tener el potencial de mejorar el síndrome metabólico, controlar el peso corporal y tratar la esteatosis hepática no alcohólica y las enfermedades cardiovasculares.

### Breve descripción de los dibujos

- 45 La Figura 1A muestra tinción con Oil Red O de una sección criostática de hígado de ratones con inactivación (*knockout*) de apoE alimentados con una dieta baja en grasa (Pienso) en el Ejemplo Experimental 2.

La Figura 1B muestra tinción con Oil Red O de una sección criostática de hígado de ratones con inactivación de apoE alimentados con una dieta alta en grasa (HFD, *high fat diet*) en el Ejemplo Experimental 2.

- 50 La Figura 1C muestra tinción con Oil Red O de una sección criostática de hígado de ratones con inactivación de apoE alimentados con una dieta alta en grasa y que recibieron una inyección a través de la vena de la cola del polipéptido 21H21 (HFD+21H21) en el Ejemplo Experimental 2.

- 55 La Figura 2 muestra el porcentaje de área (%) de lípidos neutros en una sección criostática de hígado de ratones con inactivación de apoE identificados mediante tinción con Oil Red O en el Ejemplo Experimental 2. Grupo HFD frente a grupo (HFD+21H21); valor de  $p = 0,0004$ .

La Figura 3A muestra tinción con Oil Red O de la raíz aórtica de ratones con inactivación de apoE alimentados con una dieta baja en grasa (Pienso) en el Ejemplo Experimental 2.

- 60 La Figura 3B muestra tinción con Oil Red O de la raíz aórtica de ratones con inactivación de apoE alimentados con una dieta alta en grasa (HFD) en el Ejemplo Experimental 2.

- 65 La Figura 3C muestra tinción con Oil Red O de la raíz aórtica de ratones con inactivación de apoE alimentados con una dieta alta en grasa y que recibieron una inyección a través de la vena de la cola del polipéptido 21H21 (HFD+21H21) en el Ejemplo Experimental 2.

La Figura 4 muestra el porcentaje de área (%) de lípidos neutros en la raíz aórtica de ratones con inactivación de apoE identificados mediante tinción con Oil Red O en el Ejemplo Experimental 2.

5 La Figura 5 muestra tinción con Oil Red O de la aorta completa de ratones con inactivación de apoE del Ejemplo Experimental 3.

La Figura 6 muestra el porcentaje de área (%) de lípidos neutros sobre la aorta completa de ratones con inactivación de apoE identificados mediante tinción con Oil Red O en el Ejemplo Experimental 3. Grupo HFD frente a grupo (HFD+21H21): valor de  $p = 4,40108E-05$

La Figura 7 muestra tinción con Oil Red O de la aorta completa de ratones deficitarios en LDLR (siglas del inglés *low-density lipoprotein receptor*, receptor de lipoproteína de baja densidad), alimentados con una dieta baja en grasa (Pienso) en el Ejemplo Experimental 5.

15 La Figura 8 muestra tinción con Oil Red O de la aorta completa de ratones deficitarios en LDLR alimentados con una dieta alta en grasa (HFD) en el Ejemplo Experimental 5.

La Figura 9 muestra tinción con Oil Red O de la aorta completa de ratones deficitarios en LDLR alimentados con una dieta alta en grasa y que recibieron una inyección a través de la vena de la cola del polipéptido 21H21 (HFD+21H21) en el Ejemplo Experimental 5.

La Figura 10 muestra el porcentaje de área (%) de lípidos neutros sobre la aorta completa de ratones deficitarios en LDLR identificados mediante tinción con Oil Red O en el Ejemplo Experimental 5. Pienso: dieta baja en grasa; HFD: dieta alta en grasa; HFD+21H21: dieta alta en grasa e inyección del polipéptido 21H21 a través de la vena de la cola.

### Modo de la invención

30 Para comprender mejor las características y la eficacia de la presente invención, los términos y descripciones relacionados con la solicitud de patente se definen como se indica a continuación. Salvo que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente invención son comprensibles para las personas que trabajan en este campo. En caso de conflicto, prevalecerán las siguientes definiciones.

35 Los términos "comprende", "incluye", "tiene", "contiene" o cualquier otro término similar, son expresiones transitorias abiertas, que pretenden cubrir pero no excluir. Por ejemplo, una composición o artículo que contenga elementos plurales no se limita a los elementos enumerados en el presente documento, pero también puede incluir otros elementos que no se enumeran explícitamente pero que, en general, son inherentes a la composición o al artículo. Además, a menos que se indique expresamente lo contrario, el término "o" se refiere a un "o" inclusivo y no a un "o" exclusivo. Por ejemplo, cualquiera de las siguientes condiciones satisface la condición "A o B": A es verdadero (o existe) y B es falso (o no existe), A es falso (o no existe) y B es verdadero (o existe), Tanto A como B son verdaderas (o existen). La interpretación de los términos "comprende", "incluye", "tiene", "contiene" se considerarán específicamente divulgados y al mismo tiempo incluirán "consiste en" y "consiste sustancialmente en" y otros cierres o conectivos semicerrados.

45 Todas las características o condiciones definidas en forma de intervalos numéricos o intervalos porcentuales son sólo a efectos de brevedad y comodidad. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción del intervalo numérico o del intervalo porcentual incluye y desvela específicamente todos los posibles subintervalos y valores individuales dentro del intervalo, especialmente los valores enteros. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción del intervalo de "1 a 8" divulga todos los subintervalos tales como de 1 a 7, de 2 a 8, de 2 a 6, de 3 a 6, de 4 a 8, de 3 a 8, etc., y especialmente el intervalo secundario definido por todos los valores enteros tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

Salvo que se indique lo contrario, la interpretación anterior es aplicable a todo el contenido del texto completo de la presente invención, independientemente de su amplio alcance o no.

55 Si una cantidad u otro valor o parámetro se expresa en términos de un intervalo, un intervalo preferido, o una serie de límites superior e inferior, debe considerarse que esta expresión divulga específicamente cualquier límite superior o valor preferido del intervalo y el límite inferior del intervalo, o todos los intervalos constituidos por valores preferidos, independientemente de si estos intervalos se divulgan por separado. Además, cuando se menciona un intervalo numérico, salvo que se indique lo contrario, el intervalo rango debe incluir sus extremos y todos los números enteros y fracciones dentro del intervalo.

60 Con la condición de que la invención sea realizable, debe considerarse que un valor numérico tiene la precisión con dígitos significativos del valor numérico. Por ejemplo, debe considerarse que el número 40,0 cubre la intervalo de 39,50 a 40,49.

65 Las siguientes modalidades específicas de implementación son meramente ilustrativas por naturaleza, y no pretenden

limitar la presente invención ni su aplicación. Además, el presente documento no está limitado por ninguna teoría descrita en el anterior estado de la técnica o contenido de la invención ni por las siguientes modalidades específicas de aplicación.

## 5 Ejemplos de preparación

### Ejemplo de preparación 1

Se ha utilizado síntesis en fase sólida para sintetizar polipéptidos mediante CASLOApS, c/o Scion Denmark Technical University, Diplomvej 381, DK-2800, Lyngby, Dinamarca.

10 SEQ ID NO: 1 (FAYLQDVVEQAIIRVLTGTGTEKKT);  
 SEQ ID NO: 2 (FAYLQDVVEQAIIRVLTGTGTEKK);  
 SEQ ID NO: 3 (FAYLQDVVEQAIIRVLTGTGTEK);  
 SEQ ID NO: 4 (FAYLQDVVEQAIIRVLTGTGTE);  
 15 SEQ ID NO: 5 (FAYLQDVVEQAIIRVLTGT);  
 SEQ ID NO: 6 (FAYLQDVVEQAIIRVLTG);  
 SEQ ID NO: 7 (FAYLQDVVEQAIIRVLT);  
 SEQ ID NO: 8 (FAYLQDVVEQAIIRVL).

### 20 Ejemplo de preparación 2

El ácido esteárico se conjugó con el extremo N del polipéptido SEQ ID NO: 3 (FAYLQDVVEQAIIRVLTGTEK) para convertirse en el polipéptido 21H21. Los procedimientos fueron los siguientes: El polipéptido se sintetizó primero mediante síntesis en fase sólida, seguido de la conjugación del ácido esteárico con el extremo N del polipéptido mediante una reacción química. El ácido esteárico-polipéptido se liberó de la fase sólida mediante una reacción química. El polipéptido sintetizado se purificó hasta la homogeneidad (>98 %) mediante cromatografía en fase inversa. La pureza del polipéptido se determinó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, *high-performance liquid chromatography*), y el peso molecular del polipéptido se confirmó mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

30 Preparación de péptidos para inyección en la vena de la cola: en primer lugar se añaden 25 microlitros de DMSO (D2650, Sigma-Aldrich) para disolver 1 mg de péptidos sintéticos y, a continuación, se añaden 475 microlitros de tampón PBS 1 vez. La concentración final de la muestra es de 2 µg/µl (DMSO al 5 %). Tampón PBS 1 vez (fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5): se disuelven 1,42 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8,75 g de NaCl en 950 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7,5 con ácido fosfórico, se añade agua destilada hasta un volumen total de 1 litro, se esteriliza la solución a alta temperatura.

## Ejemplos experimentales

### 40 Ejemplo experimental 1: Procedimientos con animales

Se adquirieron ratones (C57BL/6J) macho con inactivación de apoE de 10 semanas de vida en GemPharmatech, Nanjing, Jiangsu, China. Los ratones se alimentaron con una dieta baja en grasa [alimento SPF (*Specific Patogen Free*, libre de patógenos específicos) de crecimiento y reproducción para ratas y ratones: 12,95 % de grasa (p/p), 24,02 % de proteína (p/p)] de Beijing KeaoXieli Feed Co. Ltd., Beijing, China en una instalación libre de patógenos durante dos semanas y después se dividieron en los tres grupos siguientes (8 ratones cada grupo): (a) el grupo de control, que se alimentó con una dieta baja en grasa, denominada Pienso; (b) el grupo de dieta alta en grasa, que se alimentó con una dieta alta en grasa (HFD) [21 % de grasa (p/p), 0,15 % (p/p) de colesterol, 20 % de proteínas (p/p), Research Diets, New Brunswick, NJ, D12079Bj, denominada HFD]; (c) el grupo de tratamiento, que se alimentó con una dieta alta en grasa y recibió una inyección a través de la vena de la cola del polipéptido 21H21 (50 µg/200 µl de PBS 1 vez) una vez cada cuatro días, denominada HFD+21H21. La inyección total fue de 10 veces. Un día después de la última inyección, los ratones se anestesiaron y se sometieron a eutanasia con dióxido de carbono, y después, se extrajo su sangre y se extirparon el hígado y la aorta. Durante el periodo del experimento, se pesó cada grupo de ratones. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de gestión de animales de la República Popular China.

El polipéptido 21H21 de la presente invención pudo compensar el aumento de peso de una dieta alta en grasa en ratones con inactivación de apoE (tabla 1).

Tabla 1

Tiempo	Peso corporal promedio por ratón (g)			Cambio de peso corporal	
	Pienso	HFD	HDF+21H21	Aumento porcentual de peso corporal (HFD frente a Pienso)	Disminución porcentual de peso corporal (HFD+21H21 frente a HFD)
Día 83	Fecha de inicio del experimento				
Día 88	27,13	27,96	24,38	3,08	12,82
Día 97	28,1	29,02	24,83	3,27	14,46
Día 105	27,48	29,94	25,21	8,97	15,79
Día 110	28,08	29,72	25,61	5,86	13,82
Día 119	27,94	30,34	26,63	8,6	12,24
Día 123	28,06	31,5	26,76	12,25	15,04

Nota: Después de comenzar el experimento, cada grupo de 8 ratones se pesó conjuntamente una vez a la semana durante un total de 6 veces.

**Ejemplo experimental 2: Preparación de la sección criostática de tejido y tinción con Oil Red O**

5 El tejido hepático extirpado en el Ejemplo Experimental 1, se embebió en compuesto OCT (Sakura Tissue-Tek) y se conservó a -80 °C. Se cortaron secciones de tejido de 7 µm de grosor y se montaron en portaobjetos histológicos recubiertos con poli-L-lisina. Las secciones de tejido hepático se conservaron a -80 °C.

10 La mitad superior del corazón junto con el tejido de la raíz aórtica extirpado en el Ejemplo Experimental 1, se embebió en compuesto OCT (Sakura Tissue-Tek) y se conservó en -80 °C. Se cortaron secuencialmente secciones de tejido de 7 µm de grosor hasta que aparecieron las válvulas aórticas y se confirmaron al microscopio. Las secciones de la raíz aórtica se montaron en portaobjetos histológicos recubiertos con poli-L-lisina y se conservaron a -80 °C.

15 Las secciones criostáticas de tejido se descongelaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se tiñeron con Oil Red O (01391, Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de aclarar los portaobjetos con agua destilada durante 5 minutos, las secciones se examinaron al microscopio para garantizar una tinción óptima. Si el tiempo de tinción es insuficiente, se repite la etapa de tinción. Después de la tinción, las secciones de tejido se montan con cubreobjetos utilizando de 2 a 3 gotas de solución de montaje hidrosoluble. Después de 10 minutos, los bordes del cubreobjetos se sellan con esmalte de uñas. Con un microscopio invertido se toman fotografías de las secciones de tejido teñidas. Las figuras 1A-1C demuestran la tinción con Oil Red O de las secciones criostáticas de hígado de ratones con inactivación de apoE alimentados con dieta baja en grasa (Pienso), dieta alta en grasa (HFD), dieta alta en grasa y que recibieron una inyección a través de la vena de la cola del polipéptido 21H21 (HFD+21H21) respectivamente. Las figuras 3A-3C muestran la tinción con Oil Red O de secciones criostáticas de la raíz aórtica de ratones con inactivación de apoE alimentados con dieta baja en grasa (Pienso), dieta alta en grasa (HFD), dieta alta en grasa y que recibieron una inyección a través de la vena de la cola del polipéptido 21H21 (HFD+21H21) respectivamente.

25 La figura 2 representa el porcentaje de área (%) de lípidos neutros en secciones criostáticas de hígado identificadas mediante tinción con Oil Red O en ratones alimentados con una dieta baja en grasa (Pienso), dieta alta en grasa (HFD), dieta alta en grasa y que recibieron una inyección a través de la vena de la cola del polipéptido 21H21 (HFD+21H21) respectivamente. La figura 2 muestra que el polipéptido DL21 pudo impedir la acumulación de lípidos neutros en el tejido hepático causada por una dieta alta en grasa en un 53 % con un valor de  $p = 0,0004$  [HFD frente a (HFD+21H21)], lo que demuestra que el polipéptido 21H21 de la presente invención puede impedir la acumulación de lípidos neutros en el tejido hepático.

35 La figura 4 presenta el porcentaje de área (%) de lípidos neutros en secciones criostáticas de la raíz aórtica identificadas mediante tinción con Oil Red O en ratones alimentados con una dieta baja en grasa (Pienso), dieta alta en grasa (HFD), dieta alta en grasa y que recibieron una inyección a través de la vena de la cola del polipéptido 21H21 (HFD+21H21) respectivamente. La figura 4 demuestra que el polipéptido 21H21 pudo impedir la acumulación de lípidos neutros en la raíz aórtica causada por una dieta alta en grasa en un 35 %, lo que demuestra que el polipéptido 21H21 de la presente invención puede impedir la acumulación de lípidos neutros en la raíz aórtica.

**Ejemplo experimental 3: Separación de la aorta y su tinción con Oil Red O**

45 La separación de la aorta del Ejemplo Experimental 1, se llevó a cabo como en Tangirala RK, *et al.* (Circulation. 1999; 100: 1816-1822). Después, los ratones con inactivación de apoE se anestesiaron y se sometieron a eutanasia, durante 10 minutos el ventrículo izquierdo se perfundió con PBS helado 1 vez. La mitad superior del corazón, junto con el tejido

de la raíz aórtica, se embebió en compuesto OCT (Sakura Tissue-Tek) y se conservó a -80 °C. La aorta se extrajo tras cortar las arterias menores ramificadas y se fijó en solución de paraformaldehído y sacarosa (paraformaldehído al 4 %, sacarosa al 5 % y EDTA 20 µM, pH 7,4). Después de retirar el tejido adventicio y adiposo, la aorta se abrió longitudinalmente, se sujetó en la superficie de cera negra con una aguja de acero inoxidable (0,2 mm de diámetro), y se fijó en la solución paraformaldehído y sacarosa a temperatura ambiente durante 12 horas. A continuación, la aorta se aclaró con PBS 1 vez durante 10 minutos 3 veces cada vez, seguido de tinción con Oil Red O durante 1 hora. Las aortas teñidas se fotografiaron después de lavarlas con PBS 1 vez durante 5 minutos. La figura 5 representa la tinción con Oil Red O de la aorta completa de ratones con inactivación de apoE alimentados con dieta baja en grasa (Pienso), dieta alta en grasa (HFD), dieta alta en grasa y que recibieron una inyección a través de la vena de la cola del polipéptido 21H21 (HFD+21H21) respectivamente.

La figura 6 muestra el porcentaje de área (%) de lípidos neutros sobre la aorta completa identificado mediante tinción con Oil Red O. Los ratones con inactivación de apoE se alimentaron con una dieta baja en grasa (Pienso), dieta alta en grasa (HFD), dieta alta en grasa y que recibieron una inyección a través de la vena de la cola del polipéptido 21H21 (HFD+21H21) respectivamente. En comparación con los ratones no tratados (HFD), el polipéptido 21H21 pudo impedir que en los ratones (HFD+21H21) se produjera una lesión aterosclerótica de la aorta completa en un 48 %, lo que demuestra que el polipéptido 21H21 puede impedir la acumulación de lípidos neutros en la aorta.

#### 20 Ejemplo experimental 4: Procedimientos con animales

Se adquirieron ratones macho deficitarios en LDLR (C57BL/6-Ldlrem1 Cd82/Nju) de 11 semanas de vida en GemPharmatech, Nanjing, Jiangsu, China. Los ratones se alimentaron con una dieta baja en grasa [alimento SPF (*Specific Patogen Free*, libre de patógenos específicos) de crecimiento y reproducción para ratas y ratones: 12,95 % de grasa (p/p), 24,02 % de proteína (p/p)] de Beijing KeaoXieli Feed Co. Ltd., Beijing, China en una instalación libre de patógenos durante dos semanas y después se dividieron en los tres grupos siguientes (8 ratones cada grupo): (a) el grupo de control, que se alimentó con una dieta baja en grasa, denominada Pienso; (b) el grupo de dieta alta en grasa, que se alimentó con una dieta alta en grasa (HFD) [21 % de grasa (p/p), 0,15 % (p/p) de colesterol, 20 % de proteínas (p/p), Research Diets, New Brunswick, NJ, D12079B], denominada HFD; (c) el grupo de tratamiento, que se alimentó con una dieta alta en grasa y recibió una inyección a través de la vena de la cola del polipéptido 21H21 (50 µg/200 µl de PBS 1 vez) una vez cada tres días, denominada HFD+21H21. La inyección total fue de 10 veces. Un día después de la última inyección, los ratones se anestesiaron y se sometieron a eutanasia con dióxido de carbono, y después, se extrajo su sangre y se extirparon el hígado y la aorta. Durante el periodo del experimento, se pesó cada grupo de ratones. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de gestión de animales de la República Popular China.

La siguiente Tabla 1 muestra que el polipéptido 21H21 de la presente invención pudo compensar el 29 % del aumento de peso por dieta alta en grasa en ratones deficitarios en LDLR.

Tabla 1 (Cada grupo tenía 8 ratones.)

Dieta	Pienso (n=8)	HFD (n=8)	HFD+21H21 (n=8)
Peso corporal promedio antes del experimento (g)	26,29±0,03	26,3±0,02	26,54±0,02
Peso corporal promedio después del experimento (g)	28,43±0,02	30,02±0,01	29,2±0,02
Porcentaje de aumento de peso durante el experimento (%)	8,14	14,15	10,02
Porcentaje de aumento de peso compensado por 21H21 (%)			29,17

40

#### Ejemplo experimental 5: Separación de la aorta y su tinción con Oil Red O

La separación de la aorta del Ejemplo Experimental 4, se llevó a cabo como en Tangirala RK, *et al.* (Circulation. 1999; 100: 1816-1822). Después, los ratones deficitarios en LDLR se anestesiaron y se sometieron a eutanasia, durante 10 minutos el ventrículo izquierdo se perfundió con PBS helado 1 vez. La mitad superior del corazón, junto con el tejido de la raíz aórtica, se embebió en compuesto OCT (Sakura Tissue-Tek) y se conservó a -80 °C. La aorta se extrajo tras cortar las arterias menores ramificadas y se fijó en solución de paraformaldehído y sacarosa (paraformaldehído al 4 %, sacarosa al 5 % y EDTA 20 µM, pH 7,4). Después de retirar el tejido adventicio y adiposo, la aorta se abrió longitudinalmente, se sujetó en la superficie de cera negra con una aguja de acero inoxidable (0,2 mm de diámetro), y se fijó en la solución paraformaldehído y sacarosa a temperatura ambiente durante 12 horas. A continuación, la aorta se aclaró con PBS 1 vez durante 10 minutos 3 veces cada vez, seguido de tinción con Oil Red O durante 1 hora. Las aortas teñidas se fotografiaron después de lavarlas con PBS 1 vez durante 5 minutos. La figura 7 muestra tinción con Oil Red O de la aorta completa de ratones deficitarios en LDLR alimentados con una dieta baja en grasa (Pienso). La figura 8 muestra tinción con Oil Red O de la aorta completa de ratones deficitarios en LDLR alimentados con una dieta alta en grasa (HFD). La figura 9 muestra tinción con Oil Red O de la aorta completa de ratones deficitarios en LDLR alimentados con una dieta alta en grasa y que recibieron una inyección a través de la vena de la cola del polipéptido 21H21 (HFD+21H21).

55

- 5 La figura 10 muestra el porcentaje de área (%) de lípidos neutros sobre la aorta completa identificado mediante tinción con Oil Red O. Los ratones deficitarios en LDLR se alimentaron con una dieta baja en grasa (Pienso), dieta alta en grasa (HFD), dieta alta en grasa y que recibieron una inyección a través de la vena de la cola del polipéptido 21H21 (HFD+21H21) respectivamente. En comparación con los ratones no tratados (HFD), el polipéptido 21H21 pudo impedir que en los ratones (HFD+21H21) se produjera una lesión aterosclerótica de la aorta completa en un 94 %, lo que demuestra que el polipéptido 21H21 puede impedir la acumulación de lípidos neutros en la aorta.
- 10 En los Ejemplos Experimentales 4 y 5, se utilizó un modelo de ratón deficitario en LDLR para el estudio de la aterosclerosis. Los experimentos se llevaron a cabo *in vivo* con la inyección intravenosa de polipéptidos a dosis bajas de 50 microgramos por ratón una vez cada tres días durante cuatro semanas. En comparación con los ratones no tratados, el polipéptido pudo impedir un aumento de peso corporal del 29 % causado por una dieta rica en grasa y rica en colesterol; impedir que se produjera lesión aterosclerótica de la aorta completa en un 94 %.
- 15 Los experimentos anteriores son, por naturaleza, descripciones únicamente auxiliares y no pretenden limitar la solicitud ni el uso de la presente invención. La palabra "ilustrativo(a)" significa "que sirve de ejemplo, que es un ejemplo o una ilustración". Ninguna de las realizaciones ilustrativas del presente documento debe interpretarse necesariamente como que es preferible o ventajosa en comparación con otras realizaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido, en donde el polipéptido consiste en 16-23, preferentemente 16-21, o más preferentemente 21 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 5 2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido consiste en la secuencia consecutiva de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
- 10 3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más de los aminoácidos del polipéptido está en forma enantiomérica D, preferentemente, todos los aminoácidos del polipéptido están en forma enantiomérica D.
- 15 4. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el polipéptido se conjuga con ácido esteárico; preferentemente, el polipéptido se conjuga con ácido esteárico en su extremo; más preferentemente, el polipéptido se conjuga con ácido esteárico en el extremo N del polipéptido.
5. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 a la reivindicación 4, para su uso en la prevención o el tratamiento de la esteatosis hepática no alcohólica, la aterosclerosis, el síndrome metabólico o la obesidad.

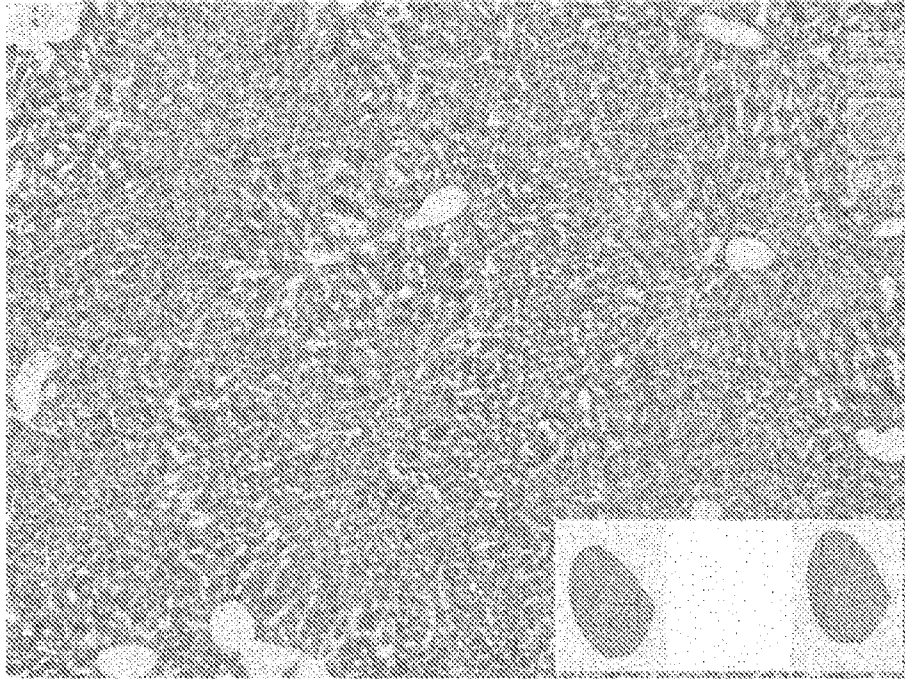


Figura 1A

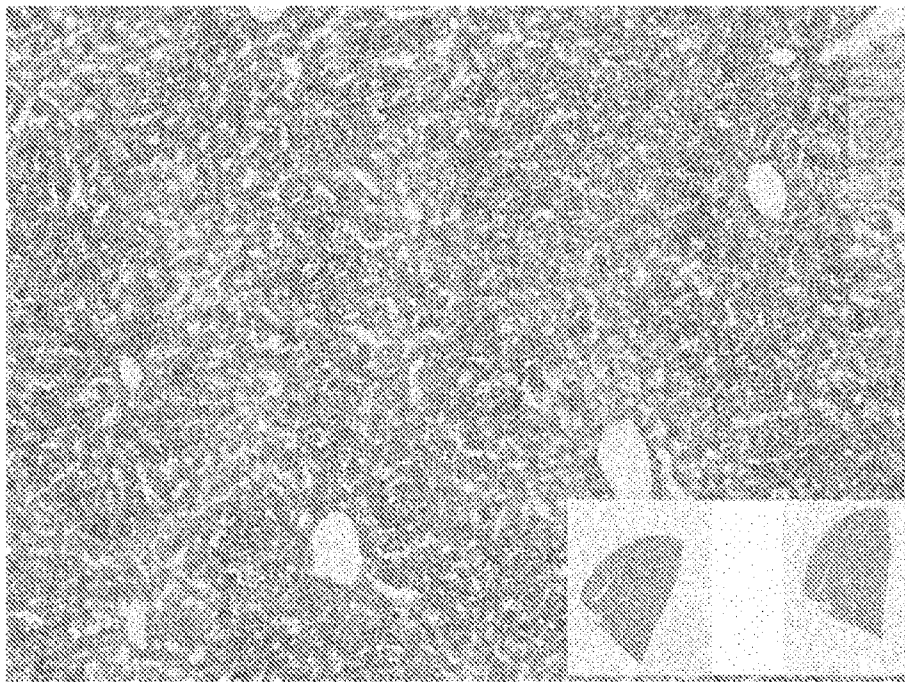


Figura 1B

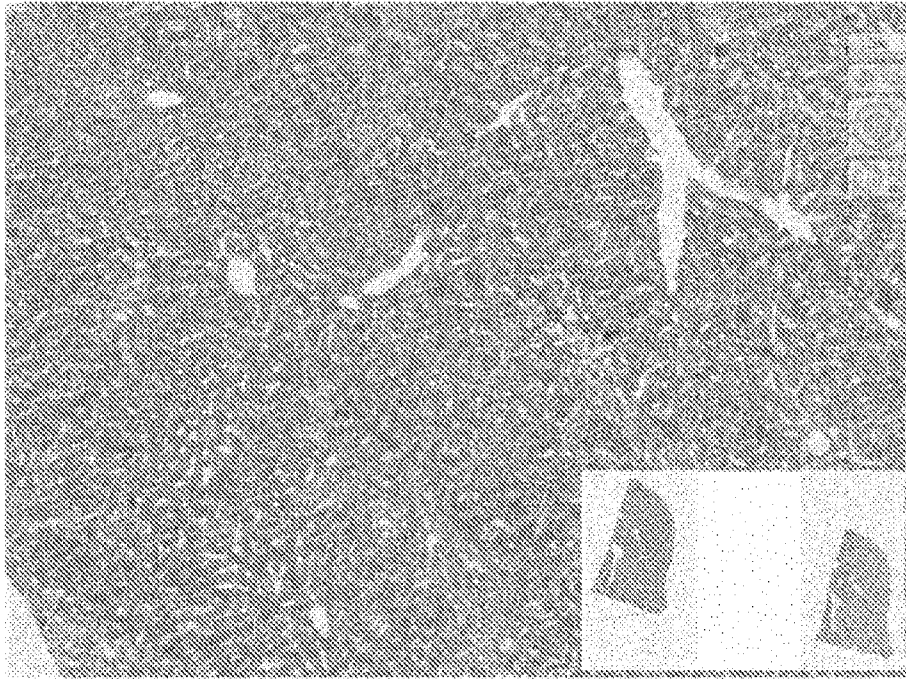


Figura 1C

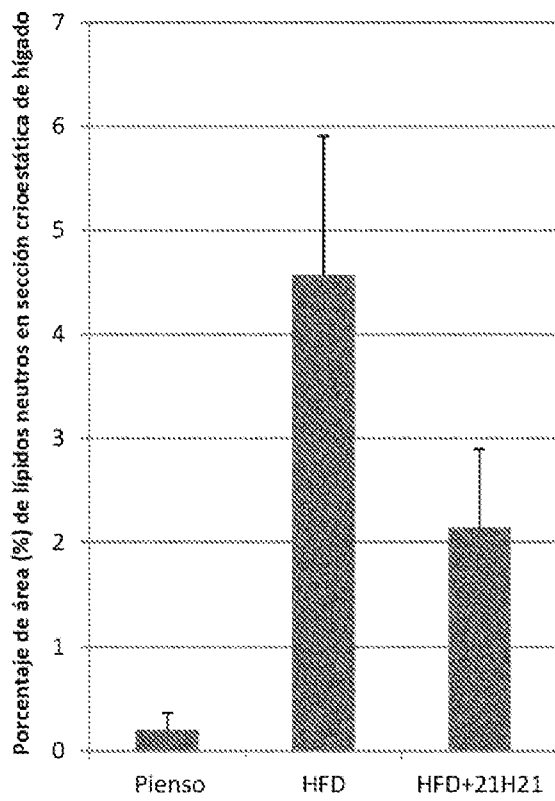


Figura 2

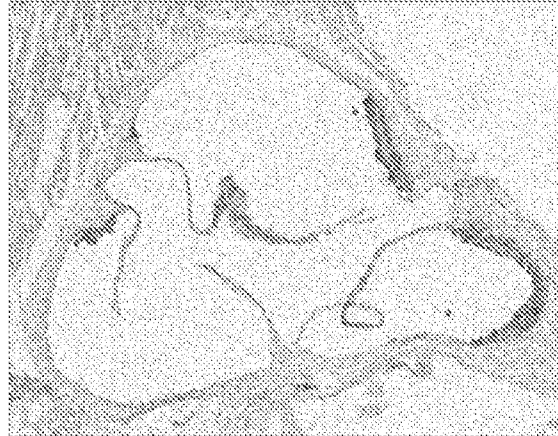


Figura 3A

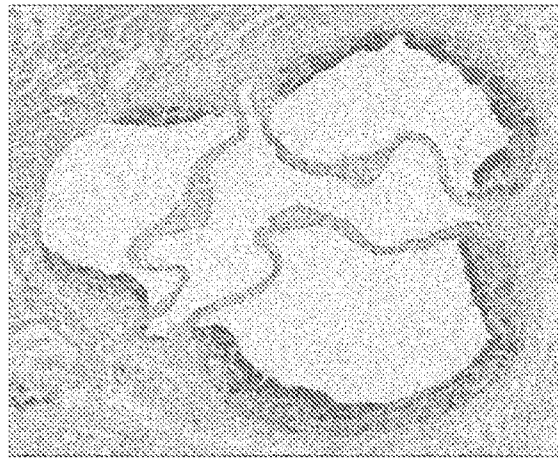


Figura 3B

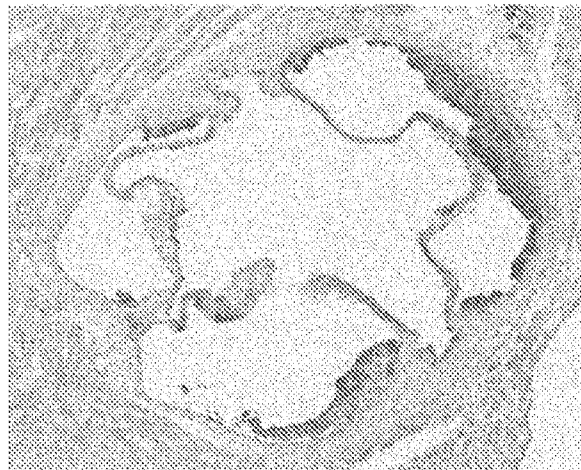


Figura 3C

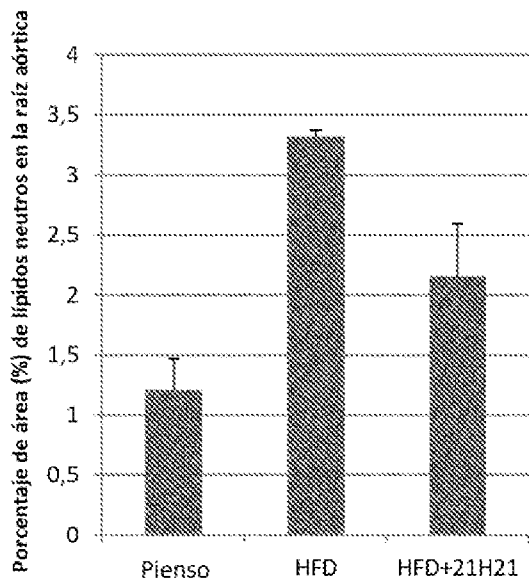


Figura 4

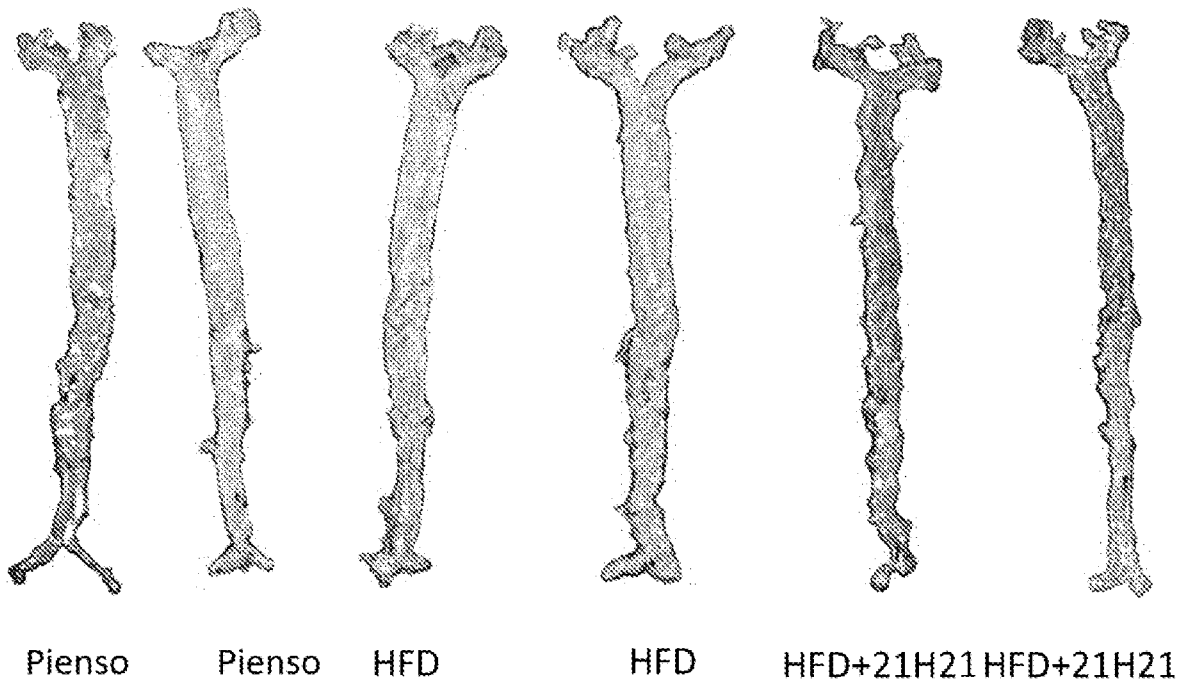


Figura 5

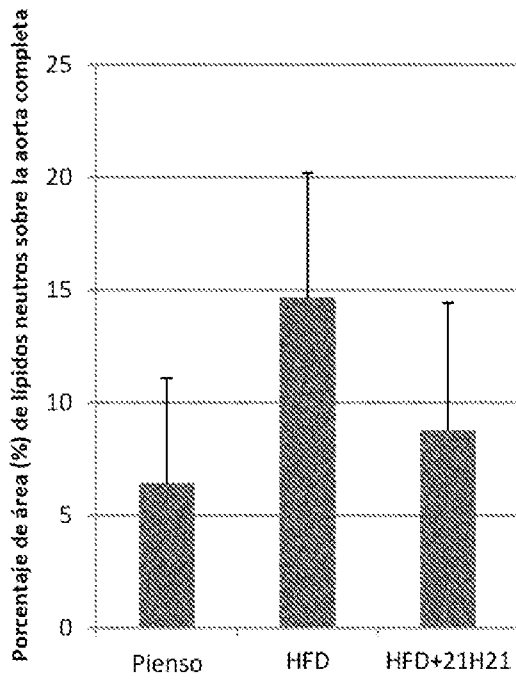


Figura 6

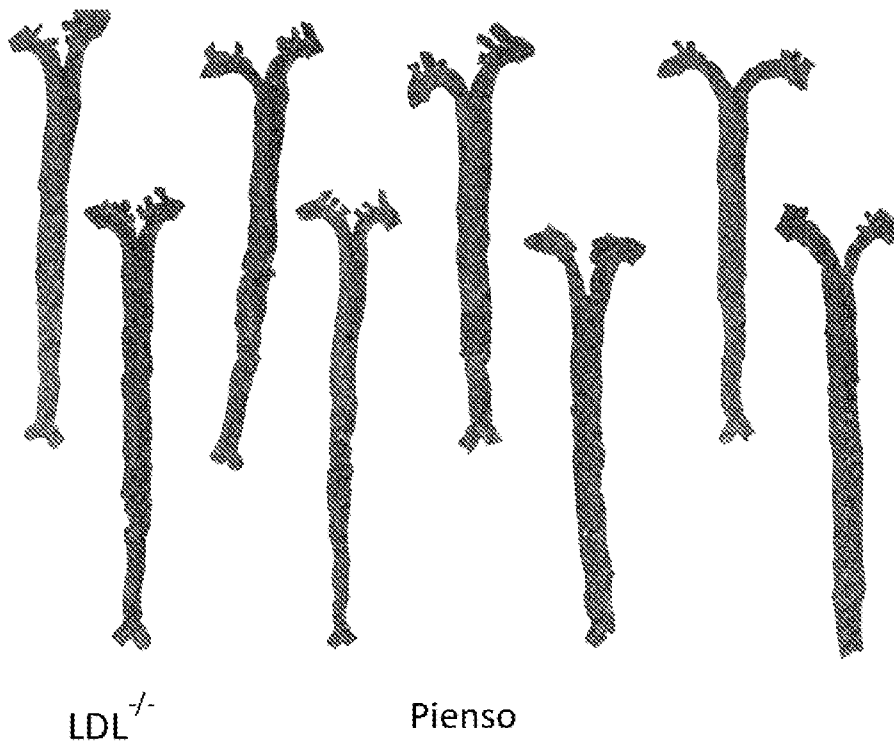


Figura 7

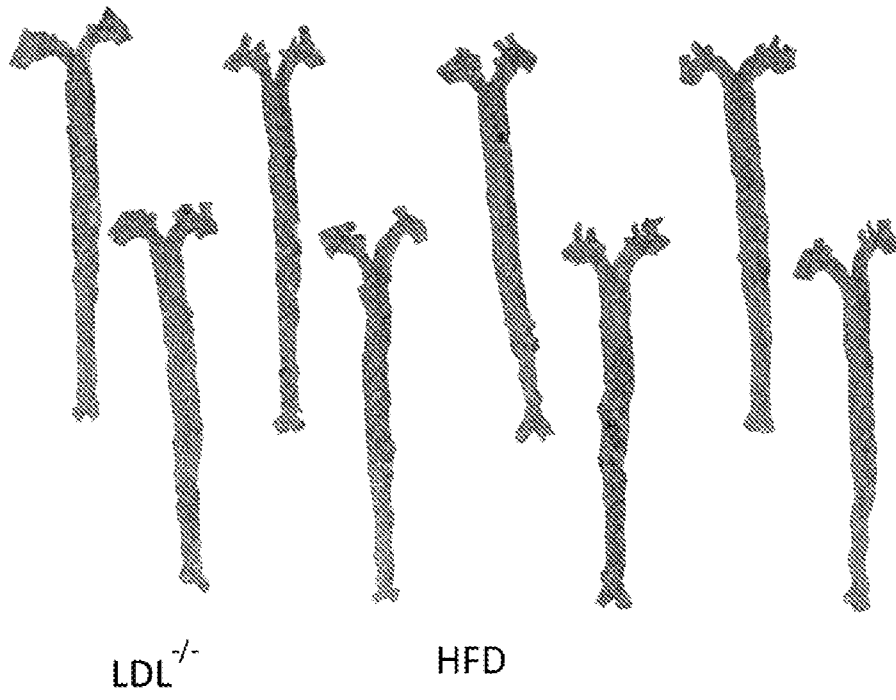


Figura 8

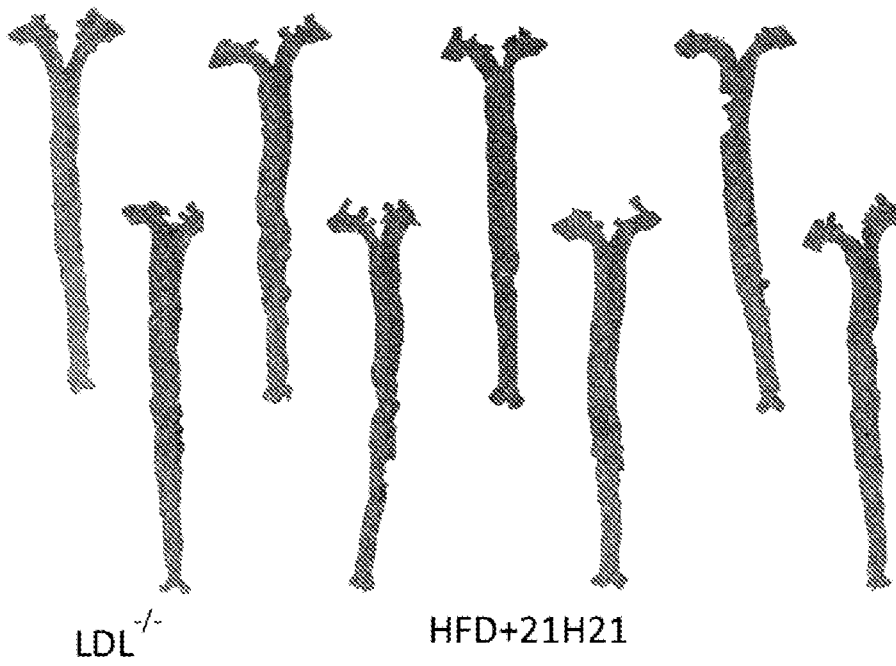


Figura 9

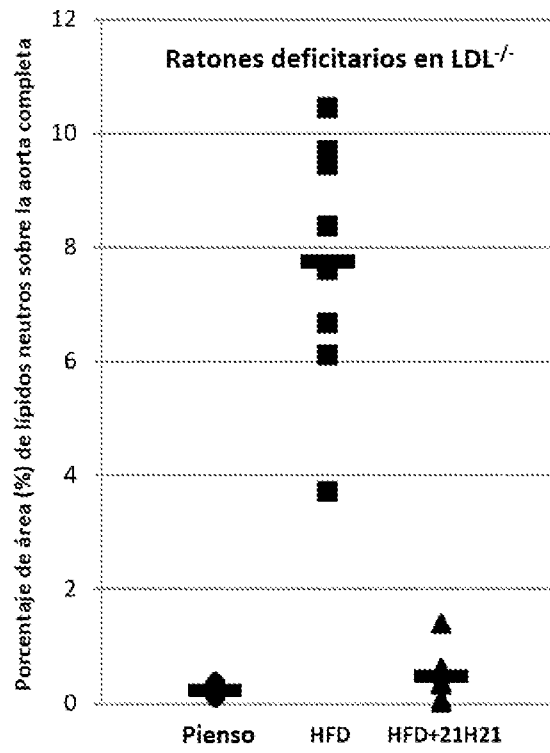


Figura 10