

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 895 167**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2009.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61K 38/30 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2015** **E 19199390 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.07.2021** **EP 3613760**

54 Título: **Péptido que presenta unos efectos antidiabéticos y antiobesidad, y utilización del mismo**

30 Prioridad:

28.04.2015 KR 20150059648

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
17.02.2022

73 Titular/es:

CAREGEN CO., LTD. (100.0%)
46-38 LS-ro 91beon-gil, Dongan-gu
Anyang-si, Gyeonggi-do 431-848, KR

72 Inventor/es:

CHUNG, YONG JI y
KIM, EUN MI

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 895 167 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptido que presenta unos efectos antidiabéticos y antiobesidad, y utilización del mismo

5 **Campo técnico**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente coreana nº 10-2015-0059648, presentada el 28 de abril de 2015, en la KIPO.

10 La presente invención se refiere a un péptido con actividad antiobesidad y antidiabetes, y a su utilización como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la técnica

15 En Corea, la ingesta de grasas en la dieta ha aumentado recientemente con el crecimiento de la economía y la occidentalización de la dieta, y la aparición de enfermedades metabólicas tales como obesidad, diabetes, hiperlipidemia, hipertensión, arteriosclerosis, y el hígado graso han aumentado debido a la falta de ejercicio. Además, la obesidad es un problema estético para las personas que generalmente tienden a preferir los tipos de cuerpo delgado, además de estar asociada con diversos trastornos.

20 Hasta la fecha, los agentes terapéuticos para la obesidad se pueden dividir en gran medida en fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central para afectar el apetito, y fármacos que actúan sobre el tracto gastrointestinal para inhibir la captación. Los fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central se comercializaron como fármacos contra la obesidad, que actúan sobre la serotonina (5-HT) en el sistema nervioso, tales como fenfluramina, dexfenfluramina, y similares, sobre el sistema nervioso de noradrenalina, tal como efedrina y cafeína, y tanto en el sistema nervioso de la serotonina como en el de la noradrenalina, tal como la sibutramina recientemente desarrollada, como se clasifican por mecanismos de acción. Un representante de los fármacos contra la obesidad que actúan sobre el tracto gastrointestinal es el orlistat, aprobado como agente terapéutico para la obesidad, que inhibe la lipasa intestinal para reducir la captación de grasas. Existen problemas con algunos de los medicamentos preexistentes. Por ejemplo, se ha prohibido la comercialización de fenfluramina y similares debido al efecto secundario de sufrir hipertensión pulmonar primaria o enfermedad cardíaca valvular, y no se pueden aplicar otros medicamentos a pacientes con insuficiencia cardíaca o insuficiencia renal debido a la aparición de una reducción de la tensión arterial o acidosis láctica.

35 La diabetes es un grupo de trastornos metabólicos que se producen cuando la insulina se segrega de forma insuficiente o en heces que no permiten el funcionamiento normal (DeFronzo, 1988), y se caracteriza por hiperglucemia, es decir, niveles elevados de azúcar en sangre durante un período prolongado, que provoca diversos síntomas y síndromes, con glucosa en orina. En los últimos años, la prevalencia de la obesidad, en particular la obesidad abdominal, ha aumentado, lo que ha provocado la explosión de la prevalencia de la diabetes.

40 En el año 2000, se estimaba que los pacientes con diabetes eran 170 millones en todo el mundo, y se esperaba que aumentaran a 370 millones de personas en 2030. Sin embargo, un informe de análisis de 2008 mostró que el número de pacientes con diabetes puede haber alcanzado ya los 350 millones en todo el mundo (Danaei et al., 2011), con una agregación mucho más significativa de lo esperado. Se informa que más de alrededor de 80% de los pacientes con diabetes tipo 1 son obesos, mientras que sólo menos de 10% de los pacientes (no) obesos presentan diabetes (Harris et al. 1987). La correlación entre diabetes y obesidad se atribuye al hecho de que las adipocinas y los ácidos grasos libres son segregados de manera irregular para inducir la acumulación de ácidos grasos en los tejidos sensibles a la insulina, tales como células beta, riñones, hígado, corazón, etc., lo que produce lipotoxicidad. Si se deja sin un tratamiento adecuado, la hiperglucemia crónica puede ser propensa a incurrir en diversos síntomas patológicos que incluyen retinopatía, disfunción renal, neuropatía y trastorno vascular. Para prevenir tales complicaciones es indispensable un control eficaz del azúcar en sangre.

Actualmente, el control de los niveles de azúcar en sangre se logra mediante la mejora del estilo de vida (terapia de dieta, terapia de ejercicio), y medicamentos. Sin embargo, la terapia de dieta o la terapia de ejercicio es difícil de manejar y practicar estrictamente, con limitaciones de los efectos de las mismas. Por lo tanto, la mayoría de los pacientes con diabetes dependen del control de los niveles de azúcar en sangre mediante medicamentos tales como insulina, secretagogos de insulina, sensibilizadores a la insulina, y agentes hipoglucémicos, así como en la mejora del estilo de vida.

60 La insulina producida usando un método recombinante se usa como un fármaco indispensable para los pacientes con diabetes tipo 1 y los pacientes con diabetes tipo 2 que no logran controlar los niveles de azúcar en sangre, y es ventajosa para el control del azúcar en sangre. Sin embargo, adolece de la desventaja de la repulsión a las agujas de las jeringas, la dificultad de administración, el riesgo de hipoglucemia, y el aumento de peso.

65 Las meglitinidas, un tipo de secretagogos de la insulina, son agentes de acción corta y se toman antes de las comidas. Entre ellos se encuentran NovoNorm (repaglinida), Fastic (nateglinida) y Glufast (mitiglinida). Los

sensibilizadores a la insulina se caracterizan por casi ninguna aparición de hiperglucemia cuando se toman solos, y pueden ejemplificarse mediante fármacos de biguanida, tal como metformina, y fármacos de tiazolidindiona tal como Avandia (rosiglitazona) y Actos (pioglitazona).

Recientemente, se han desarrollado agonistas de GLP-1 utilizando la acción del péptido 1 similar al glucagón, que es una hormona estimulante de la secreción de insulina, e incluyen exenatida y Victoza (liraglutida). Además, los inhibidores de DDP-4, que inhiben la acción de DPP (dipeptidil peptidasa-4), una enzima responsable de la inactivación rápida de GLP-1, son fármacos recientemente desarrollados, y están ejemplificados de forma representativa por Januvia (nombre del ingrediente: sitagliptina). Sin embargo, se informa de que esos medicamentos presentan efectos secundarios de hepatotoxicidad, trastornos gastrointestinales, trastornos cardiovasculares, y carcinogenicidad. Otro problema con los fármacos es el alto coste anual del tratamiento, que es una barrera para el tratamiento de la diabetes. De hecho, los costes de atención médica de la prediabetes y la diabetes se acercaron a unos 200 billones de wones en los Estados Unidos de América desde 2007 (Dall et al., 2010), y los costes de atención médica de la obesidad asimismo están cerca de los 150 billones de wones solo en los Estados Unidos de América desde 2008 (Finkelstein et al., 2009). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar un fármaco que pueda reducir eficazmente los niveles de glucosa en sangre y pueda aplicarse tanto a la diabetes como a la diabetes inducida por obesidad, con menos efectos secundarios.

Para ello, los presentes inventores han prestado atención recientemente a los mecanismos reguladores del metabolismo energético con el fin de encontrar un método mejorado para el tratamiento de la obesidad, y han investigado las señales responsables de la acumulación de lípidos y las proteínas que afectan la acumulación de lípidos tras la ingesta de dietas ricas en grasa en seres humanos, con la premisa de que el compuesto a desarrollar debe ser de mayor seguridad (menor toxicidad). Como resultado de la investigación sobre señales para suprimir la expresión de proteínas responsables de la acumulación de grasa y de degradar la grasa acumulada, y sobre proteínas implicadas en la señalización, los presentes inventores lograron desarrollar péptidos que promueven la lipólisis. Además, los péptidos de la presente invención y descripción exhiben una eficacia terapéutica sobresaliente sobre la diabetes y la diabetes inducida por obesidad. La acumulación de grasa inducida por dietas ricas en grasas, la supresión de la señalización de insulina atribuida a la acumulación de grasa en el hígado o el músculo, y la tolerancia resultante a la insulina son causas de diabetes. Cada péptido y complejo peptídico según la presente invención y descripción son terapéuticamente eficaces para dicha diabetes y diabetes inducida por obesidad.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, se hace referencia a muchos artículos y documentos de patentes, indicándose sus citas.

Descripción detallada

Problema técnico

Culminando en la presente invención, la investigación intensiva y exhaustiva sobre el desarrollo de una pluralidad de péptidos sobresalientes que presentan actividad biológicamente eficaz, realizada por los presentes inventores, condujo al hallazgo de que los péptidos que presentan las secuencias de aminoácidos de SEC ID n°: 1 a 7 exhiben no solo efectos contra la obesidad al suprimir la acumulación de grasa inducida por la dieta rica en grasas y degradar la grasa ya acumulada, sino asimismo efectos terapéuticos elevados sobre la diabetes y la diabetes inducida por obesidad, y las complicaciones de la diabetes.

Por lo tanto, un objetivo de la presente divulgación es proporcionar péptidos que presenten las secuencias de aminoácidos de SEC ID n°: 1 a 7.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 2 o 3.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un péptido que presente actividad antiobesidad o antidiabetes. Más específicamente, un objetivo de la presente invención es proporcionar un péptido para la utilización en la prevención o el tratamiento de la obesidad o la diabetes, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 o 3.

Un objetivo adicional de la presente divulgación es proporcionar un complejo peptídico que presente actividad antiobesidad o antidiabetes.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para la utilización en la prevención o el tratamiento de la obesidad.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para la utilización en la prevención o el tratamiento de la diabetes.

Los objetivos de la presente invención son en particular como se definen en las reivindicaciones.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención y divulgación se pondrán más claramente de manifiesto mediante la siguiente descripción detallada, las reivindicaciones y los dibujos.

Solución técnica

Se describe en la presente memoria un péptido que presenta una seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEC ID nº: 1 a 7.

La presente descripción proporciona un péptido de actividad antiobesidad y antidiabetes que presenta una seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEC ID nº: 1 a 7.

Se describe en la presente memoria un complejo peptídico de actividad antiobesidad y antidiabetes, compuesto por la siguiente combinación de péptidos:

- (a) un péptido que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 1;
- (b) un péptido que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o 3; y
- (c) un péptido que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 6 o 7.

Los objetivos de la presente invención son en particular como se definen en las reivindicaciones.

Como resultado del esfuerzo de los presentes inventores para desarrollar una pluralidad de péptidos sobresalientes que presenten una actividad biológicamente eficaz, se descubrió que los péptidos que presentan las secuencias de aminoácidos de SEC ID nº: 1 a 7 suprimen la acumulación de grasa inducida por una dieta rica en grasas y degradan la grasa ya acumulada, exhibiendo así un efecto antiobesidad y un efecto terapéutico sobre la diabetes y la diabetes inducida por obesidad, o complicaciones de la diabetes.

Como se usa en la presente memoria, el término "péptido" se refiere a una molécula lineal de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Los péptidos de la presente invención y descripción pueden prepararse usando métodos de síntesis química conocidos en la técnica, especialmente técnicas de síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)), o un método de síntesis en fase líquida (Pat. US nº 5.516.891).

Para seleccionar regiones de sus secuencias de aminoácidos y aumentar su actividad, los péptidos pueden modificarse en los extremos N o C de los mismos. Mediante tal modificación, los péptidos pueden recibir una semivida prolongada después de la administración *in vivo*.

Además, los extremos C de los péptidos pueden modificarse con un grupo hidroxilo (-OH), un grupo amino (-NH₂), un grupo azida (-NHNH₂), etc., mientras que los extremos N pueden acoplarse con un radical protector que consiste en el grupo que consiste en acetilo, fluorenil metoxycarbonilo, formilo, palmitilo, miristilo, estearilo, y polietilenglicol (PEG).

A través de la modificación de aminoácidos indicada anteriormente, los péptidos pueden aumentar considerablemente su estabilidad. Como se usa en la presente memoria, el término "estabilidad" pretende referirse tanto a la estabilidad *in vivo* como a la estabilidad durante el almacenamiento (por ejemplo, la estabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente). El grupo protector actúa para proteger los péptidos contra el ataque de proteinasas *in vivo*.

Por ejemplo, los péptidos exhiben el efecto de suprimir la acumulación de grasa inducida por la dieta rica en grasas y degradar la grasa ya acumulada, disminuir la expresión de los marcadores adipógenos PPAR γ , ACC y aP2, aumentar la expresión de los factores lipolíticos pHSL, AMPK- α 1, CGI-58 y ATGL, reducir el tamaño de las células adiposas, y disminuir los niveles de colesterol en sangre. Estos resultados indican que los péptidos de la presente invención y descripción presentan unos excelentes efectos terapéuticos sobre la obesidad, la diabetes y la diabetes inducida por obesidad.

No solo los péptidos individuales de SEC ID nº: 1 a 7, sino asimismo un complejo de los mismos, exhiben una excelente actividad antiobesidad y antidiabetes.

Los péptidos de SEC ID nº: 3, 5 y 7 corresponden respectivamente a los de SEC ID nº: 2, 4 y 6, con la excepción de que el resto Cys está sustituido por el resto Ser. Los péptidos emparejados correspondientes son casi idénticos en términos de actividad antiobesidad y antidiabetes.

Por ejemplo, el complejo peptídico que exhibe actividad antiobesidad o antidiabetes está compuesto por un péptido que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 1; un péptido que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o 3; y un péptido que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 6 o 7.

Por ejemplo, el complejo peptídico de la presente divulgación está compuesto por péptidos que presentan las secuencias de aminoácidos de SEC ID n°: 1, 3 y 7, respectivamente.

- 5 Se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende el péptido o el complejo peptídico como ingrediente eficaz para preparar o tratar la obesidad.

Superior en términos de funciones antiadipogénicas y lipolíticas, el péptido o complejo peptídico puede ser útil para la profilaxis o terapia de la obesidad.

- 10 Se proporciona en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende el péptido o el complejo peptídico como un ingrediente eficaz para prevenir o tratar la diabetes.

- 15 Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para la utilización en la prevención o el tratamiento de la obesidad o la diabetes, que comprende el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 o 3.

- 20 Al funcionar para reducir eficazmente un nivel aumentado de azúcar en sangre en modelos animales con diabetes, el péptido o complejo peptídico puede encontrar aplicaciones en la profilaxis o terapia de la diabetes.

- 25 Por ejemplo, la composición es una composición farmacéutica que comprende: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido o complejo peptídico; y un portador farmacéuticamente aceptable.

- La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz", como se usa en la presente memoria, significa una cantidad suficiente para lograr la eficacia o actividad del péptido mencionada anteriormente.

- 30 El portador farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica puede ser el que se usa comúnmente en las formulaciones de fármacos, e incluye, pero no se limita a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, carbonato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, y aceite mineral. Además de esos ingredientes, la composición farmacéutica puede comprender además un lubricante, un humectante, un edulcorante, un aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión, y un conservante. Con respecto a los portadores y agentes farmacéuticamente aceptables adecuados para su utilización, se puede hacer referencia a Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).

- 35 La composición farmacéutica se puede administrar por vía oral o parenteral. Para la administración parenteral, se pueden utilizar las vías intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, tópica, o transcutánea.

- 40 La dosificación de la composición farmacéutica puede variar dependiendo de diversos factores, incluyendo la forma de dosificación, la modalidad de administración, la edad del paciente, el peso, el sexo, el estado de salud, la dieta, el momento de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, la sensibilidad, etc. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede administrar a una dosis diaria en el intervalo de 0,0001 a 1,000 µg.

- 45 La composición farmacéutica se puede preparar en formas de monodosis o en paquetes de dosis múltiples usando un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable según un método que los expertos en la materia pueden llevar a cabo fácilmente. En la presente memoria, la formulación de la composición farmacéutica puede ser una disolución, suspensión o emulsión de la composición farmacéutica en aceite o medio acuoso, o un extracto, polvo, gránulo, comprimido o cápsula que contiene la composición farmacéutica, y puede comprender además un agente dispersante o un estabilizador.

50 **Efectos ventajosos**

Las características y ventajas de la presente invención y descripción se resumen a continuación:

- 55 (i) los péptidos de la presente invención y divulgación y el complejo peptídico de la presente divulgación exhiben no solo un efecto antiobesidad al suprimir la acumulación de grasa y degradar las grasas ya acumuladas, sino asimismo un efecto terapéutico sobresaliente sobre la diabetes al reducir eficazmente los niveles de azúcar en sangre.
- 60 (ii) los péptidos de la presente invención y divulgación y el complejo peptídico de la presente divulgación disminuyen la expresión de los marcadores adipógenos PPARγ, ACC y aP2, aumentan la expresión de los factores lipolíticos pHS�, AMPK-α1, CGI-58 y ATGL, reduciendo así el tamaño de los adipocitos y los niveles de colesterol en sangre.

- (iii) los péptidos de la presente invención y divulgación y el complejo peptídico de la presente divulgación presentan una actividad y seguridad excelentes, y de este modo pueden aplicarse ventajosamente a fármacos y cuasifármacos.

5 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa los lípidos acumulados después del tratamiento con péptidos de la presente invención y descripción, según se analiza mediante tinción con Oil red O: (a) péptido de SEC ID nº: 1, (b) péptido de SEC ID nº: 3, y (c) péptido de SEC ID nº: 5.

La figura 2 representa los resultados de la acumulación de lípidos después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación, según se analiza mediante tinción Oil red O.

La figura 3 representa los resultados de la medida de los niveles de expresión del gen aP2, que está implicado en la adipogénesis, después del tratamiento con los péptidos de la presente invención y divulgación: (a) péptido de SEC ID nº: 1, (b) péptido de SEC ID nº: 3, y (c) péptido de SEC ID nº: 5.

La figura 4 representa los resultados de la medida de los niveles de expresión de los genes PPAR γ , ACC y aP2, que desempeñan un papel importante en la adipogénesis, después del tratamiento con diversas concentraciones del complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 5 representa los resultados de la medida de los niveles de expresión de PPAR γ y fosfo-HSL, que desempeñan un papel importante en la adipogénesis, después de diversas concentraciones del complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 6 representa los resultados de la medida de los niveles de expresión de los genes AMPK- α 1 y CGI58, que están implicados en la degradación de las grasas acumuladas, después del tratamiento con los péptidos de la presente invención y divulgación y el complejo peptídico de la presente divulgación: (a) péptido de SEC ID nº: 1, (b) péptido de SEC ID nº: 3, (c) péptido de SEC ID nº: 5, y (d) un complejo de péptidos de SEC ID nº: 1, 3 y 7.

La figura 7 representa los resultados de la medida de ATGL, una proteína implicada en la degradación de las grasas acumuladas, después del tratamiento con diversas concentraciones del complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 8 representa los resultados de los niveles de expresión de la proteína fosfo-HSL implicada en la degradación de las grasas acumuladas, tras el tratamiento con los péptidos de la presente invención y divulgación: (a) péptido de SEC ID nº: 1, (b) péptido de SEC ID nº: 3, (c) péptido de SEC ID nº: 5, y (d) un complejo de péptidos de SEC ID nº: 1, 3 y 7, según se mide mediante inmunotinción.

La figura 9 representa los resultados de la medida del glicerol producido después del tratamiento con diversas concentraciones del complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 10a representa tejidos adiposos degradados en modelos experimentales de ratones obesos después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación. La figura 10b representa tamaños y números de tejidos adiposos degradados en modelos experimentales de ratones obesos después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 11 representa los resultados de los niveles de expresión de la proteína fosfo-HSL, que está implicada en la degradación de las grasas acumuladas, después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación, según se mide mediante inmunotinción.

La figura 12 representa cambios en el peso corporal (g) y la ingesta dietética de ratones obesos después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 13 representa imágenes de ratones obesos después del tratamiento del complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 14 representa los resultados de la distribución de grasas en modelos de ratones obesos inducidos por la alimentación con una dieta rica en grasas al modelo animal experimental C57BL/6, según se analiza mediante micro-CT.

La figura 15 representa imágenes de los tejidos de adipocitos extraídos de modelos de ratones obesos inducidos mediante la alimentación con una dieta rica en grasas al modelo animal experimental C57BL/6, después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 16a representa imágenes morfológicas de los adipocitos en tejidos adiposos tomadas de modelos de ratones obesos inducidos mediante la alimentación con una dieta rica en grasas al modelo animal experimental C57BL/6, después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación. La figura 16b

representa los resultados del tamaño de los adipocitos en los tejidos adiposos tomados de modelos de ratones obesos inducidos mediante la alimentación con una dieta rica en grasas al modelo animal experimental C57BL/6, después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 17 representa los resultados de la medida de los niveles de expresión de la proteína fosfo-HSL, que está implicada en la lipólisis, en adipocitos de tejidos adiposos tomados de modelos de ratones obesos inducidos mediante la alimentación con una dieta rica en grasas al modelo animal experimental C57BL/6, después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 18 representa los resultados de la medida de los niveles de colesterol en muestras de sangre tomadas de modelos de ratones obesos inducidos mediante la alimentación con una dieta rica en grasas al modelo animal experimental C57BL/6, después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 19 representa los resultados de la medida de los niveles de glucosa en muestras de sangre tomadas de modelos de ratones obesos inducidos mediante la alimentación con una dieta rica en grasas al modelo animal experimental C57BL/6, después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 20 representa cambios en el nivel de azúcar en sangre en modelos de ratón DB/DB con obesidad inducida después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 21 representa cambios en el nivel de colesterol en sangre en modelos de ratón DB/DB con obesidad inducida después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación.

La figura 22 representa cambios en el nivel de azúcar en sangre en modelos de ratón DB/DB con obesidad inducida después del tratamiento con los péptidos de la presente invención y divulgación: (a) péptido de SEC ID nº: 1, (b) péptido de SEC ID nº: 3, y (c) péptido de SEC ID nº: 5.

La figura 23 representa los resultados de la medida de los niveles de expresión de IGF-1 e insulina después del tratamiento con el péptido de SEC ID nº: 7.

La figura 24 representa cambios en el nivel de azúcar en sangre en el modelo de ratón DB/DB con obesidad inducida después del tratamiento con el péptido de SEC ID nº: 7.

Las figuras 25a-25d representan cambios en los niveles de azúcar en sangre en pacientes con diabetes que presentan niveles altos de glucosa en sangre después del tratamiento con el complejo peptídico de la presente divulgación.

Modo de poner en práctica

En adelante, la presente invención y descripción se describirán con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos. Resulta evidente para un experto ordinario en la materia que estos ejemplos son únicamente a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la presente invención. De este modo, el alcance de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1 de síntesis: Síntesis de péptidos

En un reactor, se añadieron 700 mg de resinas de cloruro de clorotritilo (resinas CTL, Nova biochem nº de Cat. 01-64-0021) con 10 ml de cloruro de metileno (MC), y se agitó durante 3 min. Después de eliminar el disolvente, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF). La disolución se agitó nuevamente durante 3 min, y entonces se eliminó el disolvente. Al reactor se le añadieron 10 ml de una disolución de diclorometano, seguido de 200 mmoles de Fmoc-Asn(Trt)-OH (Bachem, Suiza) y 400 mmoles de diisopropiletilamina (DIEA). Los agentes reaccionantes se disolvieron bien y se hicieron reaccionar mientras se agitaba durante 1 hora. Después de eso, la disolución se lavó, y se hizo reaccionar con una disolución de metanol y DIEA (2:1) en DCM (diclorometano) durante 10 min. Posteriormente al lavado con un exceso de DCM/DMF (1:1), se eliminó el disolvente. Después, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF), seguido de agitación durante 3 min. Después de eliminar el disolvente, se añadieron al reactor 10 ml de una disolución desprotectora (piperidina al 20%/DMF). La agitación a temperatura ambiente durante 10 min fue anterior a la eliminación del disolvente. La disolución desprotectora se añadió en la misma cantidad, y entonces se eliminó después de 10 min de reacción. El lavado se realizó dos veces con DMF, una vez con MC, y una vez con DMG durante 3 minutos cada lavado para producir resinas Asn-CTL. En otro reactor, se añadieron 200 mmoles de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (Bachem, Suiza), 200 mmoles de HoBt y 200 mmoles de Bop a 10 ml de una disolución de DMF, y se disolvieron bien con agitación. Al reactor, se añadieron 400 mmoles de DIEA en dos alícuotas, seguido de agitación

durante al menos 5 min hasta la completa disolución del sólido. La disolución de la mezcla de aminoácidos disuelta se introdujo en el reactor en el que se colocaron las resinas desprotegidas, seguido de agitación durante 1 hora a temperatura ambiente para la reacción. Después de que se eliminó el líquido de reacción, se agitó tres veces durante 3 min cada vez, junto con una disolución de DMF que entonces se eliminó. Se tomó una pequeña cantidad de las resinas de reacción y se utilizó en un ensayo de Kaiser (ensayo de ninhidrina) para examinar el alcance de la reacción. La misma reacción de desprotección se realizó dos veces con la disolución de desprotección para proporcionar resinas Arg-Asn-CTL. Las resinas se lavaron suficientemente con DMF y MC antes de un ensayo de Kaiser adicional. Los siguientes experimentos de unión de aminoácidos se llevaron a cabo de la misma manera como se describió anteriormente. Según las secuencias de aminoácidos seleccionadas, las reacciones se indujeron secuencialmente con Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH y Fmoc-Leu-OH, en ese orden. El grupo protector Fmoc se eliminó haciendo reaccionar dos veces con una disolución desprotectora durante 10 min para cada reacción, y después lavando bien. Se añadieron anhídrido acético, DIEA y HOBt, y se sometieron a acetilación durante 1 hora. Las resinas de peptidilo así obtenidas se lavaron con DMF, MC y metanol tres veces cada una. Las resinas se secaron con nitrógeno gaseoso que fluyó lentamente, y entonces se secaron completamente a vacío bajo una atmósfera de P2O5. Las resinas se hicieron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente con 30 ml de una disolución saliente (ácido trifluoroacético 81.5%, agua destilada 5%, tioanisol 5%, fenol 5%, EDT 2.5% y TIS 1%) mientras se agitaba intermitentemente. Las resinas se filtraron y lavaron con un pequeño volumen de disolución de TFA, después de lo cual el filtrado se combinó con el líquido madre. Después de la destilación a presión reducida para reducir el volumen total a la mitad, se usaron 50 ml de éter frío para inducir la precipitación, y los precipitados así formados se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con éter frío. Después de la eliminación del líquido madre, el resto se secó suficientemente bajo una atmósfera de nitrógeno para proporcionar 0.85 g del péptido no purificado de SEC ID n°: 1 NH₂-Leu-Lys-Thr-Arg-Asn-COOH (rendimiento: 92%). Se realizó la síntesis de NH₂-Lys-Gly-Ala-Cys(Ser)-Thr-Gly-Trp-Met-Ala-COOH en una cantidad de 0.78 g como péptidos de SEC ID n°: 2 y 3 (rendimiento: 82%), NH₂-Ala-Cys(Ser)-Thr-Leu-Pro-His-Pro-Trp-Phe-Cys(Ser)-COOH en una cantidad de 0.92 g como péptidos de SEC ID n°: 4 y 5 (rendimiento: 85%), y NH₂-Cys(Ser)-Asp-Leu-Arg-Arg-Leu-Glu-Met-Tyr-Cys(Ser)-COOH en una cantidad de 0.76 g como péptidos de SEC ID n°: 6 y 7 (rendimiento: 88%). Se encontró que los péptidos de SEC ID n°: 1, 2, 4 y 6 presentaban unos pesos moleculares de 630.7 (calc.: 630.7), 924.5 (calc.: 924.1), 1236 (calc.: 1236.5) y 1301.5 (calc.: 1301.5), respectivamente, según se mide mediante espectrometría de masas.

Tabla 1

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Análisis (Espectrometría de masas)	
		Medido	Calculado
SEC ID n°: 1		630.7	630.7
SEC ID n°: 2	KGACTGWMA	924.5	924.1(908.0)
SEC ID n°: 3	KGASTGWMA		
SEC ID n°: 4	ACYLPHPWFC	1236	1236.5 (1269.4)
SEC ID n°: 5	ASYLPHPWFS		
SEC ID n°: 6	CDLRRLEMYC	1301.5	1301.5
SEC ID n°: 7	SDLRRLEMYS		

Mientras tanto, los péptidos de SEC ID n°: 1, 3 y 7 se mezclaron en cantidades iguales para proporcionar un complejo peptídico cuya eficacia se evaluó.

Ejemplo 1: Ensayo de actividad inhibidora contra la adipogénesis

1-1. Ensayo para la supresión de la acumulación de lípidos mediante el uso de preadipocitos (tinción con Oil red O)

Las células preadipocitos 3T3-L1 se cultivaron hasta la confluencia, y después se incubaron durante dos días con diversas concentraciones de los péptidos en un medio de diferenciación que contenía 10 µg/ml de insulina, dexametasona 0.1 µM, e IBMX 0.5 µM. El medio se cambió cada dos días por un medio que contenía 10 µg/ml de insulina. Después de inducir la diferenciación durante 10 días, se examinó la generación de gotitas en las células mediante tinción con Oil Red O. Los adipocitos preparados 3T3-L1 se lavaron con PBS, se fijaron con formalina al 3.7% durante una hora, y se lavaron con isopropanol al 60%. Las células resultantes se tiñeron con reactivo Oil Red O a temperatura ambiente durante 20 min. Después de eliminar el reactivo Oil Red O, las células se lavaron tres veces con agua destilada, y se observaron con un microscopio de contraste de fases. Para el análisis cuantitativo, se extrajeron las grasas de las células usando isopropanol al 100%, y las células se transfirieron en una cantidad de 200 µl/pocillo a placas de 96 pocillos y se midieron para determinar la densidad óptica a 500 nm usando un lector de ELISA.

Los datos experimentales mostraron que el tratamiento con péptidos de SEC ID n°: 1, 3 y 5 disminuyó el alcance de la acumulación de grasa en las células, según se midió mediante tinción con Oil red O (figuras 1a-c).

El grado de acumulación de lípidos en las células asimismo se redujo cuando se aplicó un complejo de péptidos de SEC ID n°: 1, 3 y 7 por concentraciones (figura 2).

1-2. Supresión de la expresión de genes implicados en la adipogénesis

Se sembraron células 3T3-L1 (preadipocitos) a una densidad de 3 x 10⁵ células/pocillo en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas de cultivo, las células se incubaron con concentraciones predeterminadas (0.1, 1 y 10 µg/ml) de los péptidos durante 14 días en una incubadora a 37°C. Posteriormente, las células se recolectaron y trataron con una disolución de extracción de ARN (Easy Blue, Intron) para preparar ARN a partir del cual se sintetizó entonces el ADNc usando una premezcla de RT (Intron). La PCR se realizó utilizando cebadores para marcadores antigénicos (PPAR γ , ACC y aP2) y una premezcla de PCR (Intron).

Las secuencias de cebadores específicos de la diana para la PCR de marcadores adipógenos fueron las siguientes: secuencia de cebador directo de PPAR γ , 5'-TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC-3', y cebador inverso de PPAR γ , 5'-AATCCTTGCCCTCTGAGAT-3' (temperatura de hibridación, 60°C); secuencia del cebador directo de ACC, 5'-ACCTTACTGCCATCCCATGTGCTA-3', y cebador inverso de ACC, 5'-GTGCCTGATGATCGCACGAACAAA-3' (temperatura de hibridación, 60°C); secuencia del cebador directo de aP2, 5'-CATCAGCGTAAATGGGGATT-3', y cebador inverso de aP2, 5'-ACACATTCCACCACCAGCTT-3' (temperatura de hibridación, 60°C).

Los productos de PCR se cargaron cada uno en un volumen de 5 µl en un gel de agarosa al 1% y se sometieron a electroforesis, seguido de la identificación de las bandas en un Gel-Doc.

En la estirpe celular de osteoblastos de ratón 3T3-L1 que se incubó con el péptido de SEC ID nº: 1, 3 o 5 durante tres días, se observaron niveles de expresión disminuidos del marcador adipógeno aP2 (figuras 3a-c).

Asimismo, cuando se incubó durante tres días con concentraciones de 0.1 µg/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml de un complejo de péptidos de las SEC ID nº: 1, 3 y 7, se observó que en la estirpe celular de osteoblastos de ratón disminuye la expresión de los marcadores adipógenos PPAR γ , ACC y aP2, como las células de control positivo tratadas con 100 ng/ml de TNF α (figura 4).

1-3. Observación de la expresión de proteínas inductoras de adipogénesis y lipólisis mediante el uso de preadipocitos

Se sembraron células 3T3-L1 (preadipocitos) a una densidad de 3 x 10⁵ células/pocillo en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas de cultivo, las células se incubaron durante 14 días con concentraciones predeterminadas (0.1, 1 y 10 µg/ml) del complejo peptídico en una incubadora a 37°C. Para la cuantificación de proteínas se utilizaron lisados celulares obtenidos mediante tratamiento con un amortiguador de lisis celular, seguido de transferencia Western con un anticuerpo anti-PPAR γ (Santa Cruz Biotechnology, USA), que es un anticuerpo contra un marcador adipógeno, y un anticuerpo anti-pHSL (Santa Cruz Biotechnology, USA), que es un anticuerpo contra un marcador lipolítico.

Cuando se trataron con el complejo peptídico por concentración, se observó que en las células disminuía la expresión del marcador adipógeno PPAR γ de una manera dependiente de la dosis mientras que aumentaba la expresión del marcador de lipólisis pHSL (figura 5).

Ejemplo 2: Ensayo de actividad lipolítica

2-1. Mayor expresión de genes implicados en la lipólisis

Se sembraron células 3T3-L1 (preadipocitos) a una densidad de 3 x 10⁵ células/pocillo en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas de cultivo, las células se incubaron durante 14 días con concentraciones predeterminadas (0.1, 1 y 10 µg/ml) de los péptidos en una incubadora a 37°C (control positivo: 100 ng/ml de TNF α (SIGMA)). Las células se recolectaron y trataron con una disolución de extracción de ARN (Easy Blue, Intron) para preparar ARN a partir del cual se sintetizó entonces el ADNc usando una premezcla de RT (Intron). La PCR se realizó utilizando cebadores para marcadores (AMPK- α 1 y CGI58) y una premezcla de PCR (Intron).

Las secuencias de cebadores específicos de la diana para la PCR de marcadores lipolíticos fueron las siguientes: secuencia de cebador directo de AMPK- α 1, 5'-TGACCGGACATAAAGTGGCTGTGA-3', y cebador inverso de AMPK- α 1, 5'-TGATGATGTGAGGGTGCCTGAACA-3' (temperatura de hibridación, 60°C); secuencia del cebador directo de CGI58, 5'-TGTGCAGGACTCTTACTTGGCAGT-3', y cebador inverso de CGI58, 5'-GTTTCTTTGGGCAGACCGGTTTCT-3' (temperatura de hibridación, 60°C).

Los productos de PCR se cargaron cada uno en un volumen de 5 µl en un gel de agarosa al 1% y se sometieron a electroforesis, seguido de la identificación de bandas en un Gel-Doc.

En todos los preadipocitos (3T3-L1) que se incubaron con los péptidos, se detectaron niveles aumentados de expresión de los marcadores lipolíticos AMPK- α 1 y CGI-58 (figuras 6a-c). Además, se observó que el tratamiento con el complejo peptídico aumentaba la expresión de AMPK- α 1 y CGI-58 en formas dependientes de la dosis y a niveles más altos en comparación con el tratamiento de control positivo con TNF α 100 ng/ml (figura 6d).

2-2. Observación de la expresión de proteínas inductoras de lipólisis mediante el uso de preadipocitos

Se sembraron células 3T3-L1 (preadipocitos) a una densidad de 3 x 10⁵ células/pocillo en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas de cultivo, las células se incubaron durante 14 días con concentraciones predeterminadas (0.1, 1 y 10 µg/ml) del complejo peptídico en una incubadora a 37°C (control positivo: 100 ng/ml de TNFα (SIGMA)). Los lisados celulares obtenidos por tratamiento con un amortiguador de lisis celular se utilizaron para la cuantificación de proteínas, seguido de transferencia Western con un anticuerpo anti-ATGL (Santa Cruz Biotechnology, USA), que es un anticuerpo contra un marcador lipolítico.

La expresión del marcador lipolítico ATGL aumentó mediante el tratamiento con el complejo peptídico (figura 7).

2-3. Observación microscópica por fluorescencia de la expresión de la proteína inductora de lipólisis mediante el uso de preadipocitos

Se sembraron células 3T3-L1 (preadipocitos) a una densidad de 3 x 10⁵ células/pocillo en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas de cultivo, las células se incubaron durante 14 días con los péptidos individuales o el complejo peptídico (1 µg/ml) en una incubadora a 37°C (control positivo: 100 ng/ml de TNFα (SIGMA)). Posteriormente, las células se fijaron con etanol al 70%, y después se sometieron a inmunotinción con un anticuerpo anti-fosfo-HSL (Santa Cruz Biotechnology, USA) para observar la expresión celular de fosfo-HSL, un marcador lipolítico.

A partir de los datos experimentales, se observó que los péptidos solos (figuras 8a-c) y el complejo peptídico (figura 8d) aumentaban la expresión del marcador lipolítico fosfo-HSL.

2-4. Cuantificación del producto de lipólisis glicerol

Después de extraerlos del abdomen de ratones con obesidad inducida, los tejidos adiposos se sembraron a una densidad de 100 mg/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos y se cultivaron en un medio de cultivo (1 ml de amortiguador de Krebs-Ringer que contenía HEPES 25 mM, glucosa 5.5 mM, y albúmina de suero bovino al 2% (p/v)). A este respecto, los tejidos se incubaron durante 48 horas con 0.1 µg/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml del complejo peptídico, mientras que se utilizaron 100 ng/ml de TNFα como control positivo. Se analizó cuantitativamente el glicerol producido durante la lipólisis.

Como se desprende de los datos experimentales, la cantidad de glicerol resultante de la lipólisis por tratamiento con el complejo peptídico se incrementó de manera dependiente de la dosis y mayor que la producida con el tratamiento con el control positivo TNFα (figura 9).

2-5. Efecto de lisis en tejido adiposo aislado de ratón obeso

Los tejidos adiposos se dividen en grasa blanca y grasa parda por color, y en grasa subcutánea, grasa abdominal, grasa del mesenterio (grasa visceral), y grasa del epidídimo por tejido. Después de la anatomización corporal, se realizó una lipoectomía en los tejidos. Las grasas blancas se aislaron, se sembraron en placas en una cantidad de 100 mg/pocillo en placas de 24 pocillos, y entonces se incubaron durante 72 horas con concentraciones del complejo peptídico en un medio de cultivo (1 ml de amortiguador de Krebs-Ringer que contiene HEPES 25 mM, glucosa 5.5 mM, y seroalbúmina bovina al 2% (p/v)). Las grasas se dividieron en rodajas que entonces se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se compararon los tamaños de los adipocitos bajo un microscopio (TS100 Nikon) con un aumento de 100x.

En comparación con el control, las grasas tratadas con diversas concentraciones de los péptidos disminuyeron de tamaño (figura 10a). Además, cuando se trataron con el complejo peptídico, se observó el tamaño celular de los tejidos adiposos que tenían distintos compartimentos de la membrana celular, medido mediante un programa (figura 10b).

2-6. Observación de marcador lipolítico en tejido adiposo

Un tejido adiposo extraído del abdomen de un ratón con obesidad inducida se sembró en una cantidad de 100 mg por pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos y se incubó durante 48 horas con el complejo peptídico, mientras que se utilizó TNFα 100 ng/ml como control positivo. Se detectó el marcador lipolítico marcado fosfo-HSL (verde fluorescente).

Se observó que el tratamiento con el complejo peptídico aumentaba el nivel de expresión del marcador lipolítico fosfo-HSL en los tejidos adiposos (figura 11).

Ejemplo 3: Efecto supresor de la adipogénesis y promotor de la lipólisis en animal experimentalPérdida de peso y supresión de la adipogénesis en animales alimentados con una dieta rica en grasas

Los modelos DIO (obesidad inducida por dietas), que se habían vuelto obesos al alimentarlos con dietas ricas en grasas, se usaron para experimentos contra la obesidad en los que se usó TNF α 5 μ g/ml como control positivo. Para el control, se administró una dieta general, no una dieta rica en grasas. En el experimento, se administró una dieta rica en grasas durante 12 semanas mientras se aplicaba el complejo peptídico o el control positivo. Durante el experimento, se monitorizó el peso.

El TNF α y los compuestos antiobesidad se inyectaron por vía intraperitoneal entre las 3 y las 4 de la tarde cada semana durante 12 semanas. Se midieron los pesos y el tamaño de las comidas justo antes de la inyección inicial y después regularmente a intervalos de una semana. Se tomaron muestras de sangre de las venas de la cola después de los experimentos de inyección del fármaco, y se midieron para determinar los niveles de azúcar en sangre, utilizando Accu-Check Active (Roche), y se analizaron para determinar los niveles de colesterol, utilizando el kit de cálculo de colesterol (BioVision). Los tejidos adiposos se dividen en grasa blanca y grasa parda por color, y en grasa subcutánea, grasa abdominal, grasa del mesenterio (grasa visceral) y grasa del epidídimo por tejido. Después de la lipoectomía, se observaron las grasas así obtenidas de los tejidos. Para el examen histológico, las grasas se fijaron con formalina amortiguada neutra al 10%, se embebieron en bloques de parafina, se cortaron en secciones de 5 μ m de grosor, y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Para analizar la fosforilación del marcador lipolítico HSL, se realizó tinción fluorescente con un anticuerpo anti-pHSL. Se obtuvo una muestra de tejido, se montó en un medio de montaje de gelatina de glicerina, y se cubrió con un cubreobjetos. Los tejidos se observaron bajo un microscopio (Nikon, TS100), con una cámara digital incorporada tomando imágenes de los mismos.

Durante 12 semanas desde la etapa inicial hasta la etapa final del experimento, se midió que los ratones aumentaron de peso de 20.9 g a 28.74 g cuando se alimentaron con una dieta general, y de 20.99 g a 49.5 g cuando se alimentaron con una dieta rica en grasas. En los ratones alimentados con una dieta rica en grasas con el complejo peptídico inyectado, el aumento de peso se alcanzó solo hasta 36.76 g después de 12 semanas desde el peso inicial de 21.1 g, lo que indica una reducción significativa del aumento de peso (174.2%), en comparación con el control alimentado con una dieta rica en grasas (235.8%) (tabla 2 y figura 12).

Tabla 2

Peso del modelo de ratón obeso tras el tratamiento con complejo peptídico

	Dieta general (control)	dieta rica en grasas (control)	H.F+P/C	H.F+ complejo P	peso (g)
0 S	20.09	20.99	22.41	21.1	
1 S	20.75	22.32	23	21.26	
2 S	21.99	25.25	26.12	23.72	
3 S	18.23	27.35	27.45	24.36	
4 S	23.26	30.2	30.51	25.29	
5 S	23.16	32.76	32.76	28.65	
6 S	23.28	36.78	33.49	28.79	
7 S	24.71	38.31	35.14	30.37	
8 S	25.84	40.12	37.15	31.53	
9 S	25.59	42.14	38.97	32.59	
10 S	28.13	43.02	40.39	33.78	
11 S	27.9	45.7	41.35	35.33	
12 S	28.74	49.5	43.91	36.76	

	Dieta general (control)	dieta rica en grasas (control)	H.F+P/C	H.F+ complejo P	peso (%)
0 S	100	100	100	100	
1 S	103.3	106.3	102.6	100.8	
2 S	109.5	120.3	116.6	112.4	
3 S	90.7	130.3	122.5	115.5	
4 S	115.8	143.9	136.1	119.9	
5 S	115.3	156.1	146.2	135.8	
6 S	115.9	175.2	149.4	136.4	
7 S	123.0	182.5	156.8	143.9	
8 S	128.6	191.1	165.8	149.4	
9 S	127.4	200.8	173.9	154.5	
10 S	140.0	205.0	180.2	160.1	
11 S	138.9	217.7	184.5	167.4	
12 S	143.1	235.8	195.9	174.2	

Después de completar el experimento de 12 semanas, además, se observó que los ratones tratados con el complejo peptídico mantenían sus tamaños corporales en patrones similares a los de los ratones normales (dieta general), pero no a los de los ratones alimentados con dieta rica en grasas, según se analiza en las imágenes (figura 13).

Después de 12 semanas del experimento, los ratones se sometieron a micro-CT para examinar la distribución de grasa en todo el cuerpo. Como resultado de los datos de micro-CT de grasas (amarillo) en el cuerpo, la grasa

distribuida por todo el cuerpo aumentó notablemente en los ratones alimentados con una dieta rica en grasas, en comparación con el control alimentado con dieta general, mientras que se observó un nivel significativamente reducido de las grasas distribuidas por todo el cuerpo en el grupo que se trató con el complejo peptídico con la dieta rica en grasas alimentada al mismo (figura 14).

Los ratones que completaron la formación de imágenes por micro-CT se anatomizaron para extraer los tejidos adiposos distribuidos por todo el cuerpo. Se compararon los volúmenes de los tejidos adiposos. Como resultado, la grasa extraída de los ratones alimentados con una dieta rica en grasas fue mayor que la de los ratones alimentados con una dieta general, con una reducción significativa en el volumen de grasa en los ratones tratados con el complejo peptídico más la dieta rica en grasas (figura 15).

Las grasas se aislaron y se tiñeron con H&E para visualizar el tamaño de las grasas. Se observaron tamaños más pequeños de grasas en los ratones tratados tanto con la dieta rica en grasas como con el complejo peptídico que en el control alimentado con dieta rica en grasas (figura 16a). El análisis del tamaño de la grasa a través de un programa mostró que, cuando se asumió que el tamaño de la grasa del control alimentado con dieta general era del 100%, el tamaño de la grasa se incrementó hasta 127% en el grupo alimentado con una dieta rica en grasas, pero se redujo hasta 97% en el grupo tratado con la dieta rica en grasas y el complejo peptídico (figura 16b).

Las grasas se aislaron y examinaron para determinar el nivel de expresión del marcador lipolítico fosfo-HSL en los tejidos adiposos. Se observó que los ratones tratados tanto con la dieta rica en grasas como con el complejo peptídico tenían un nivel de expresión elevado de fosfo-HSL (figura 17).

Se midieron los niveles de colesterol en sangre en los ratones después del experimento. Como resultado, el nivel de colesterol en sangre fue 2.52 µg/ml en los ratones alimentados con dieta general, 3.5 µg/ml en los ratones alimentados con dieta rica en grasas, y 2.86 µg/ml en los ratones tratados tanto con la dieta rica en grasas como con el complejo peptídico, lo que indica que el complejo peptídico redujo el nivel de colesterol que se elevaba con la obesidad (figura 18).

Los niveles de azúcar en sangre después de completar el experimento fueron de 174 mg/dl en los ratones alimentados con dieta general, y aumentaron hasta 235 mg/dl en los ratones alimentados con dieta rica en grasas. Sin embargo, se midió un nivel de azúcar en sangre de 183 mg/dl en los ratones tratados tanto con la dieta rica en grasas como con el complejo peptídico, con una reducción significativa del mismo (figura 19).

Ejemplo 4: Control del azúcar en sangre

Efecto sobre el control del azúcar en sangre

En este experimento con animales, se utilizaron C57BL/6 (ratón normal) (adquirido de Samtako Inc.) y C57BLKS/JLepr hembra (ratón modelo de diabetes, ratón db/db) (adquirido de Central Lab. Animal Inc.), junto con el complejo peptídico como material eficaz contra la diabetes y/o la obesidad, y la sitagliptina como fármaco de control positivo. En este ejemplo, se evaluó el complejo eficaz antidiabético y/o antiobesidad para determinar la eficacia antidiabética aguda (administración única) en un modelo de ratón normal y un modelo genéticamente diabético potencial, utilizando GTT (ensayo de tolerancia a la glucosa), que es un método de diagnóstico representativo de la diabetes. Los ratones se criaron por jaula a una temperatura de 22-24°C y una humedad relativa del 50-30%, con cuatro por jaula. Los ratones estuvieron bajo luz de 150-300 Lux desde la mañana a las 8 en punto hasta la tarde a las 8 en punto, con ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad. Se les dio acceso gratuito a una dieta general (18% de proteína, fabricada en 2018, Harlan Laboratories Inc, USA). Para empezar, se hizo pasar hambre a los ratones durante 4 horas o más antes del experimento de ITT, y durante 12 horas antes del experimento de GTT. El complejo se administró por vía oral a la fuerza con la ayuda de una jeringa de administración oral desechable, una hora antes del experimento de GTT. Para el experimento de GTT, a los ratones se les permitió acceder libremente a una dieta rica en grasas a las 0 (cero) horas después del inicio del experimento. Después de 40 minutos de acceso libre a una dieta rica en grasas, se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola para examinar los niveles de glucosa en sangre a intervalos de 0, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos. Los niveles de glucosa en sangre se midieron utilizando Accu-Chek active (Roche). La sitagliptina, utilizada como agente terapéutico para la diabetes, se seleccionó como fármaco de control positivo, y se administró a una dosis de 100 mg/kg. El complejo seleccionado como candidato eficaz contra la diabetes y/o la obesidad se administró a una dosis de 100 mg/kg a grupos experimentales de cuatro ratones.

Como resultado, el complejo peptídico mostró un efecto reductor sobre los niveles de azúcar en sangre en el que el nivel de azúcar en sangre aumentado por la dieta rica en grasas se redujo mediante el tratamiento con el complejo peptídico. En los modelos de ratón con diabetes inducida, el complejo disminuyó el nivel alto de azúcar en sangre (figuras 20a y 20b). Además, se detectaron niveles más bajos de colesterol en sangre en el grupo tratado tanto con la dieta rica en grasas como con el complejo peptídico que en el control alimentado con dieta rica en grasas (figura 21).

Además, después de inanición durante 16 horas, los ratones con diabetes inducida DB/DB se alimentaron durante 30 minutos, y después se les administraron los péptidos. Los niveles de azúcar en sangre se midieron a lo largo del tiempo.

- 5 Se observó que los niveles de azúcar en sangre en los grupos tratados respectivamente con los péptidos de SEC ID n°: 1, 3 y 5 disminuían de forma dependiente del tiempo (figuras 22a-22c).

Ejemplo 5: Promoción de la expresión de insulina y factor de crecimiento similar a la insulina

10 Promoción de la expresión de insulina y factor de crecimiento similar a la insulina

- 15 Se sembraron células 3T3-L1 (preadipocitos) a una densidad de 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante 24 horas. Posteriormente, las células se incubaron con diversas concentraciones (10 ng – 1 µg/ml) de los péptidos durante 14 días en una incubadora a 37°C. Las proteínas se extrajeron de los lisados celulares que se obtuvieron mediante tratamiento con amortiguador de lisis celular, se analizaron cuantitativamente, y se sometieron a transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-IGF-1, que es un anticuerpo contra el marcador lipolítico, y un anticuerpo de insulina (Santa Cruz Biotechnology, USA).

- 20 A partir de los datos, se observó que el péptido de SEC ID n°: 7 aumentó la expresión de IGF-1 e insulina de formas dependientes de la dosis (figura 23).

Ejemplo 6: Observación del efecto reductor del nivel de azúcar en sangre en un experimento clínico

25 Reducción del nivel de azúcar en sangre por la ingesta del complejo.

- 25 Se realizó un breve ensayo clínico en personas de 45-65 años que presentaban un nivel de glucosa en sangre en ayunas de 170 mg/dl o más. Ingirieron una formulación de complejo 30 min después de las comidas. Se tomaron muestras de sangre a intervalos de 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min de las personas, y se midió el nivel de glucosa, usando Accu-Chek active (Roche).

- 30 Se observó una reducción del nivel de azúcar en sangre por la formulación del complejo en todas las personas sometidas a ensayo (figuras 25a - 25d).

- 35 Aunque la presente invención se ha descrito en detalle haciendo referencia a las características específicas, resulta evidente para los expertos en la materia que la presente descripción es únicamente para una forma de realización preferida, y no limita el alcance de la presente invención. De este modo, el alcance de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> CAREGEN CO., LTD.
5	<120> Péptido que presenta unos efectos antidiabéticos y antiobesidad y utilización del mismo
	<130> B75507EPD37737
	<160> 17
10	<170> KopatentIn 2.0
	<210> 1
	<211> 5
15	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Péptido 1
20	<400> 1
	Leu Lys Thr Arg Asn 1 5
	<210> 2
25	<211> 9
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
30	<223> Péptido 2
	<400> 2
	Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala 1 5
	<210> 3
35	<211> 9
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
40	<223> Péptido 3
	<400> 3
	Lys Gly Ala Ser Thr Gly Trp Met Ala 1 5
	<210> 4
45	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
50	<223> Péptido 4
	<400> 4
	Ala Cys Tyr Leu Pro His Pro Trp Phe Cys 1 5 10
	<210> 5
55	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
60	<223> Péptido 5
	<400> 5

ES 2 895 167 T3

		Ala	Ser	Tyr	Leu	Pro	His	Pro	Trp	Phe	Ser
		1				5					10
	<210> 6										
	<211> 10										
	<212> PRT										
5	<213> Secuencia artificial										
	<220>										
	<223> Péptido 6										
10	<400> 6										
		Cys	Asp	Leu	Arg	Arg	Leu	Glu	Met	Tyr	Cys
		1				5					10
	<210> 7										
	<211> 10										
	<212> PRT										
15	<213> Secuencia artificial										
	<220>										
	<223> Péptido 7										
20	<400> 7										
		Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Leu	Glu	Met	Tyr	Ser
		1				5					10
	<210> 8										
	<211> 20										
	<212> ADN										
25	<213> Secuencia artificial										
	<220>										
	<223> PPARgamma F										
30	<400> 8										
	tttcaaggg tgccagtttc										20
	<210> 9										
	<211> 20										
35	<212> ADN										
	<213> Secuencia artificial										
	<220>										
	<223> PPARgamma R										
40	<400> 9										
	aatccttggc cctctgagat										20
	<210> 10										
	<211> 24										
	<212> ADN										
	<213> Secuencia artificial										
	<220>										
50	<223> ACC F										
	<400> 10										
	accttactgc catcccatgt gcta										24
55	<210> 11										
	<211> 24										
	<212> ADN										
	<213> Secuencia artificial										
60	<220>										
	<223> ACC R										
	<400> 11										

gtgcctgatg atcgcacgaa caaa 24

5 <210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> aP2 F

<400> 12
catcagcgta aatggggatt 20

15 <210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> aP2 R

<400> 13
acacattcca ccaccagctt 20

25 <210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> AMPK-a1 F

<400> 14
tgaccggaca taaagtggt gtga 24

35 <210> 15
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> AMPK-a1 R

45 <400> 15
tgatgatgtg aggggtcctg aaca 24

50 <210> 16
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CGI58 F

55 <400> 16
tgtgcaggac tcttacttg cagt 24

60 <210> 17
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 895 167 T3

<220>

<223> CGI58 R

<400> 17

5 gtttctttgg gcagaccggt ttct 24

REIVINDICACIONES

1. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o 3.
- 5 2. Péptido para la utilización en la prevención o el tratamiento de la obesidad o la diabetes, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o 3.
3. Péptido para la utilización según la reivindicación 2, en el que el péptido suprime la adipogénesis.
- 10 4. Péptido para la utilización según la reivindicación 2, en el que el péptido reduce la expresión de PPAR γ (receptor gamma activado por los proliferadores de peroxisomas), ACC (acetil-CoA carboxilasa), o aP2 (proteína 2 de unión a ácidos grasos específica de adiposo).
- 15 5. Péptido para la utilización según la reivindicación 2, en el que el péptido promueve la lipólisis.
6. Péptido para la utilización según la reivindicación 2, en el que el péptido aumenta la expresión de pHSL (fosfolipasa sensible a hormona), AMPK- α 1 (proteína cinasa α 1 activada por AMP), CGI-58 (identificación de gen comparativa 58), o ATGL (lipasa de triglicéridos de adiposo).
- 20 7. Péptido para la utilización según la reivindicación 2, en el que el péptido reduce un nivel de azúcar en sangre.
8. Composición farmacéutica para la utilización en la prevención o el tratamiento de la obesidad, que comprende el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 como un ingrediente eficaz.
- 25 9. Composición farmacéutica para la utilización en la prevención o el tratamiento de la diabetes, que comprende el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 como un ingrediente eficaz.

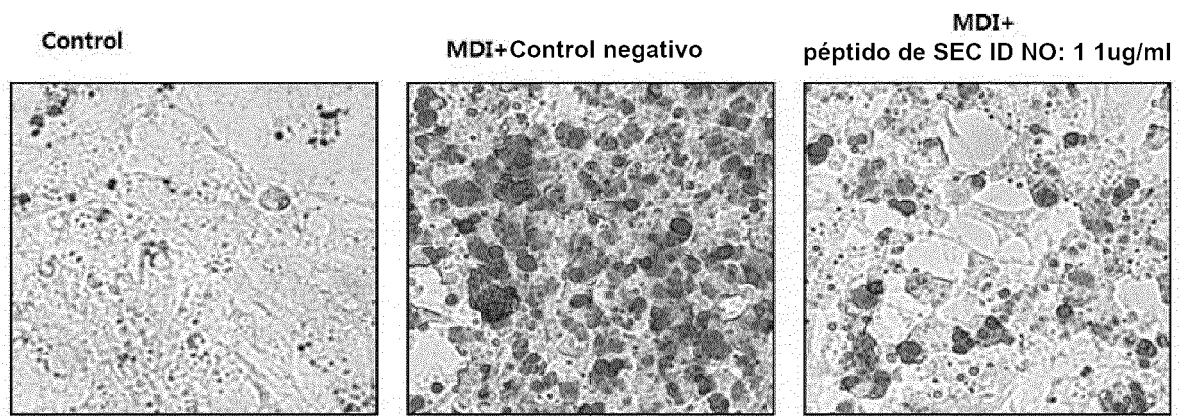


FIG. 1A

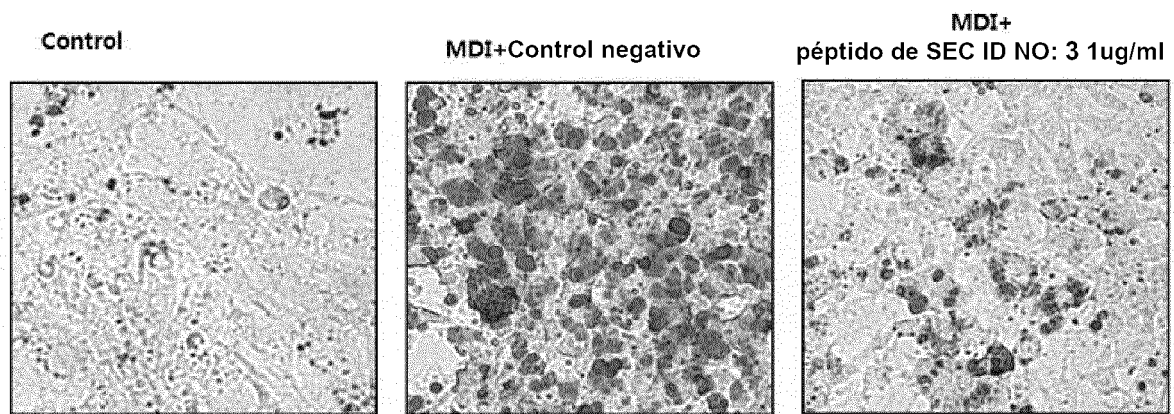


FIG. 1B

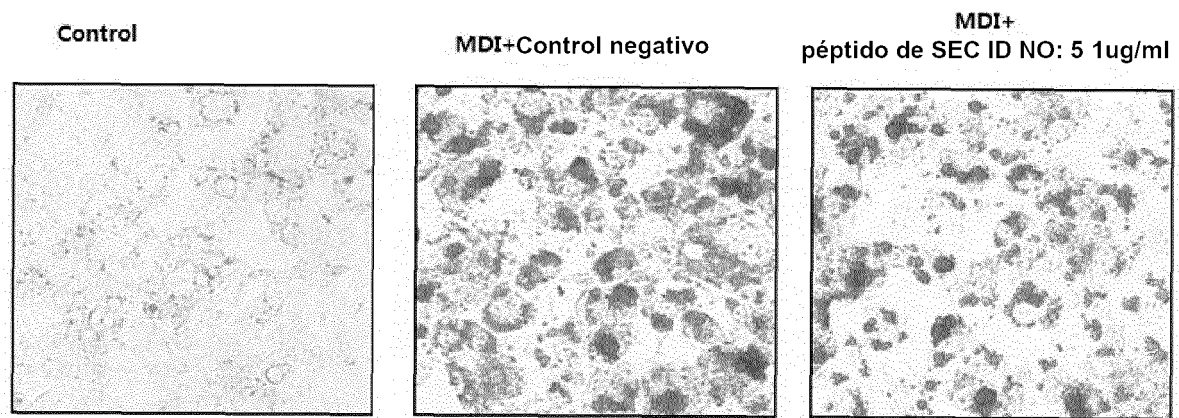


FIG. 1C

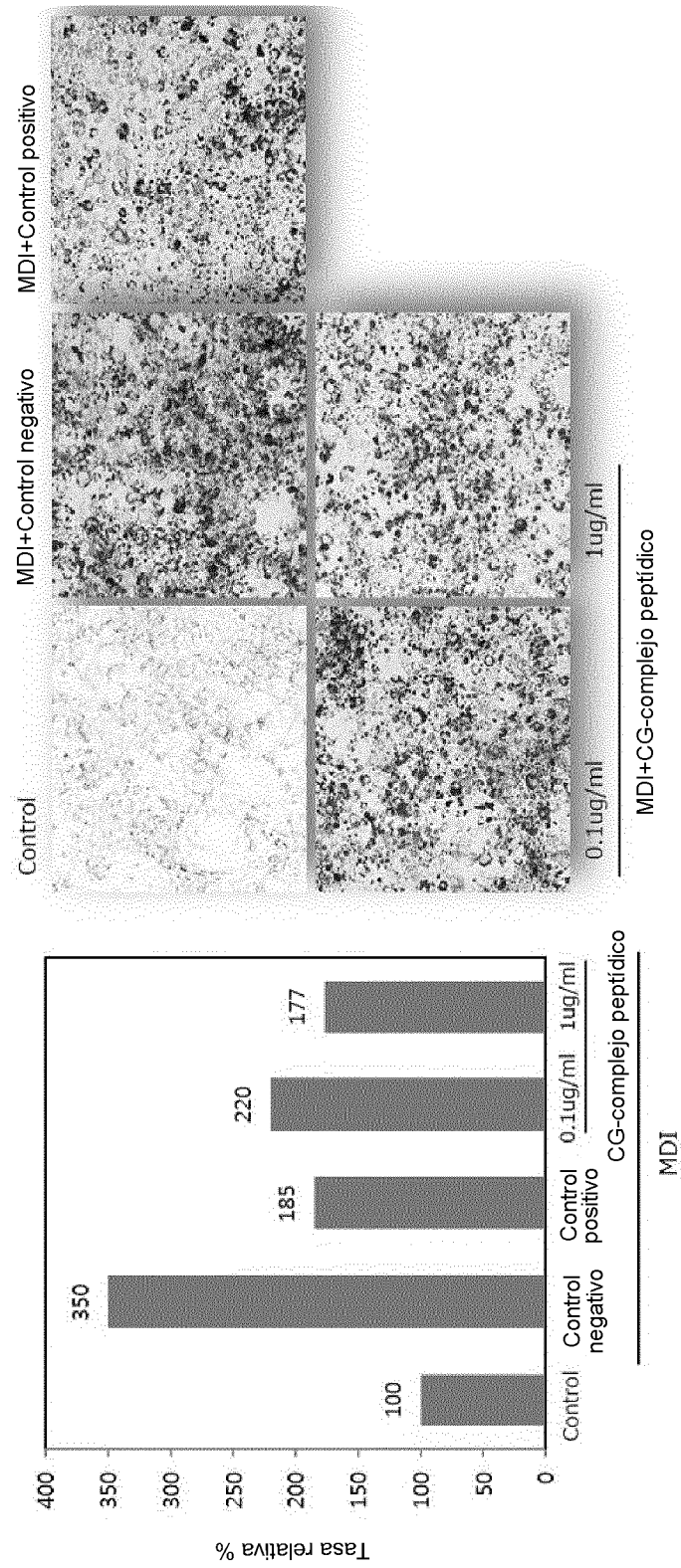


FIG. 2

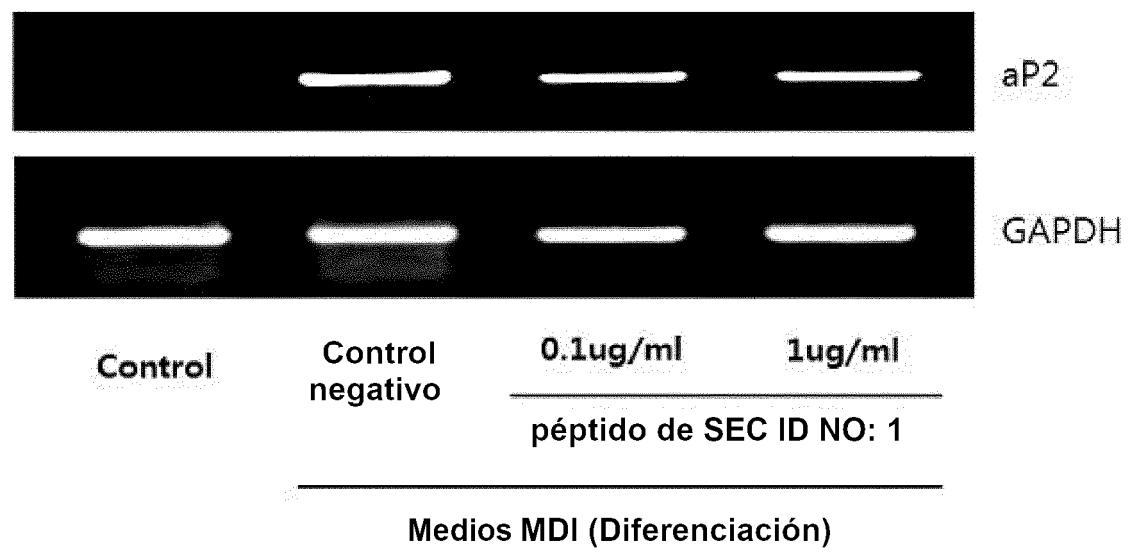


FIG. 3A

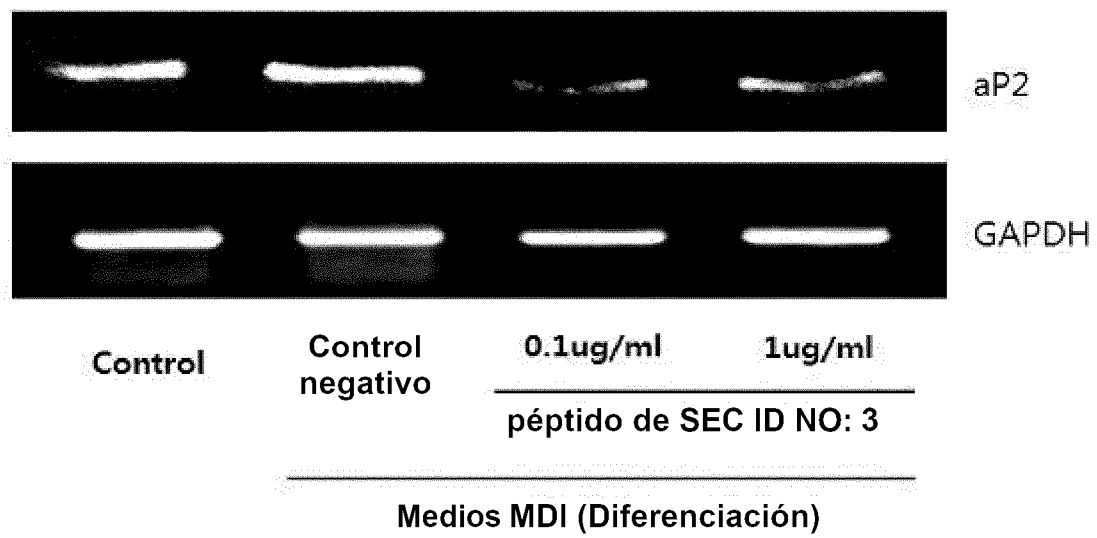


FIG. 3B

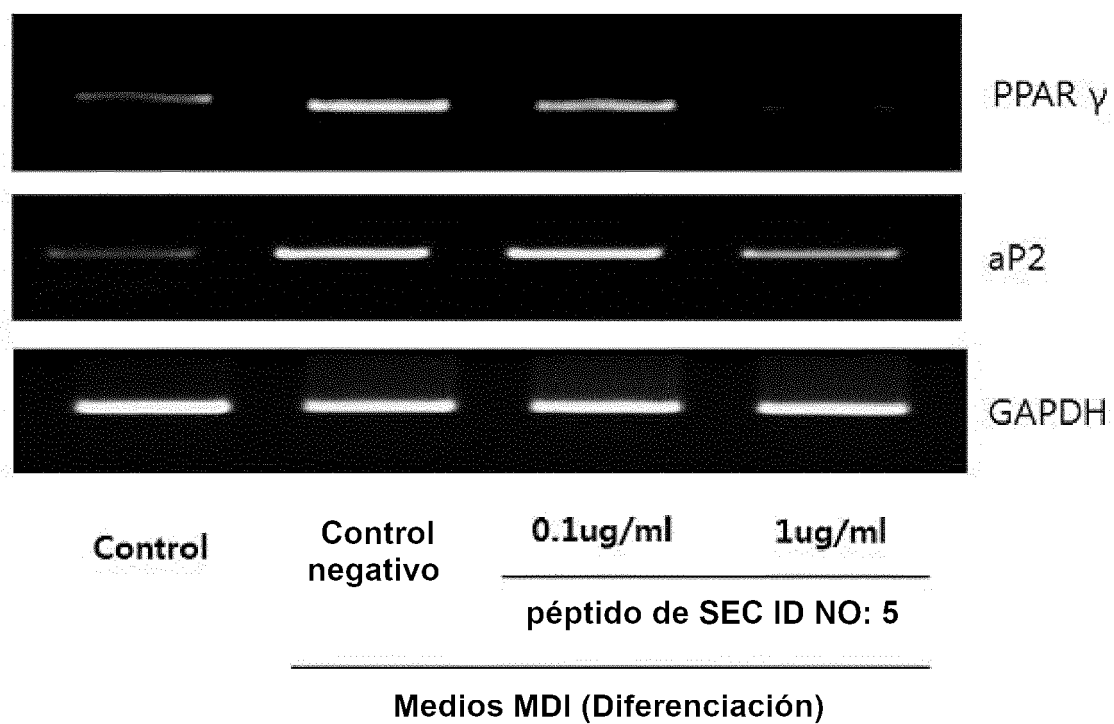


FIG. 3C

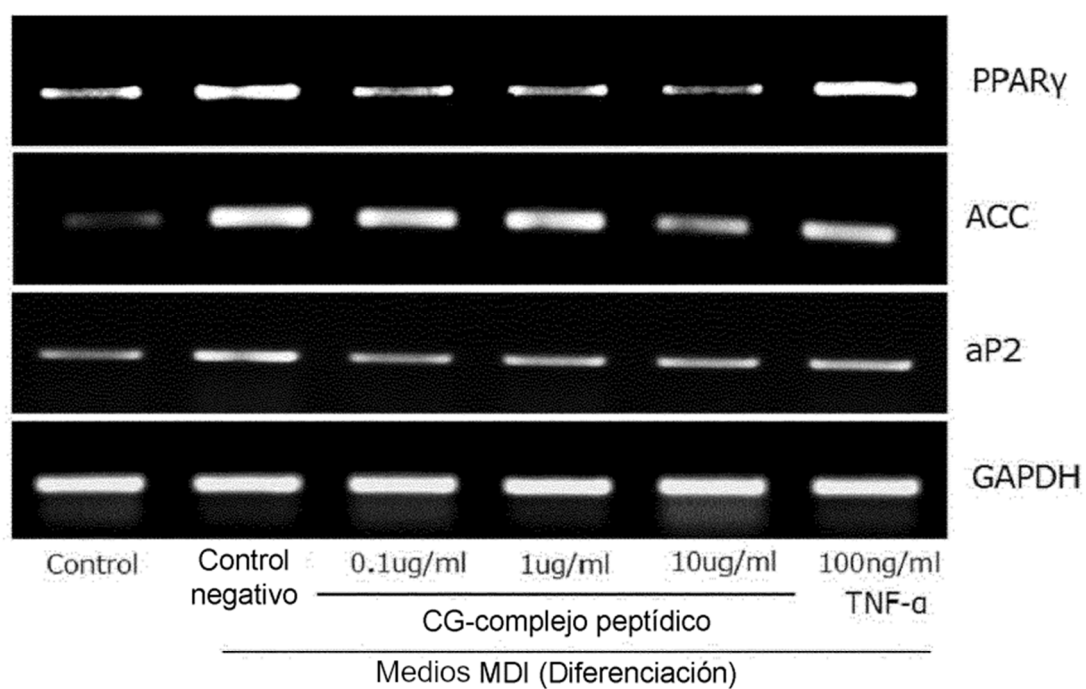


FIG. 4

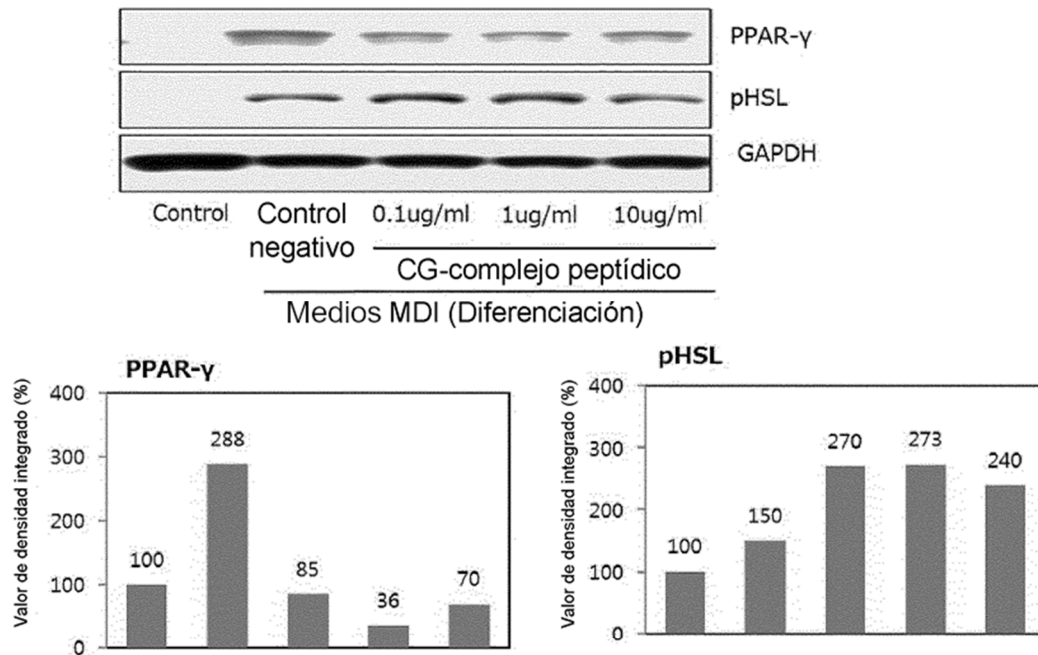


FIG. 5

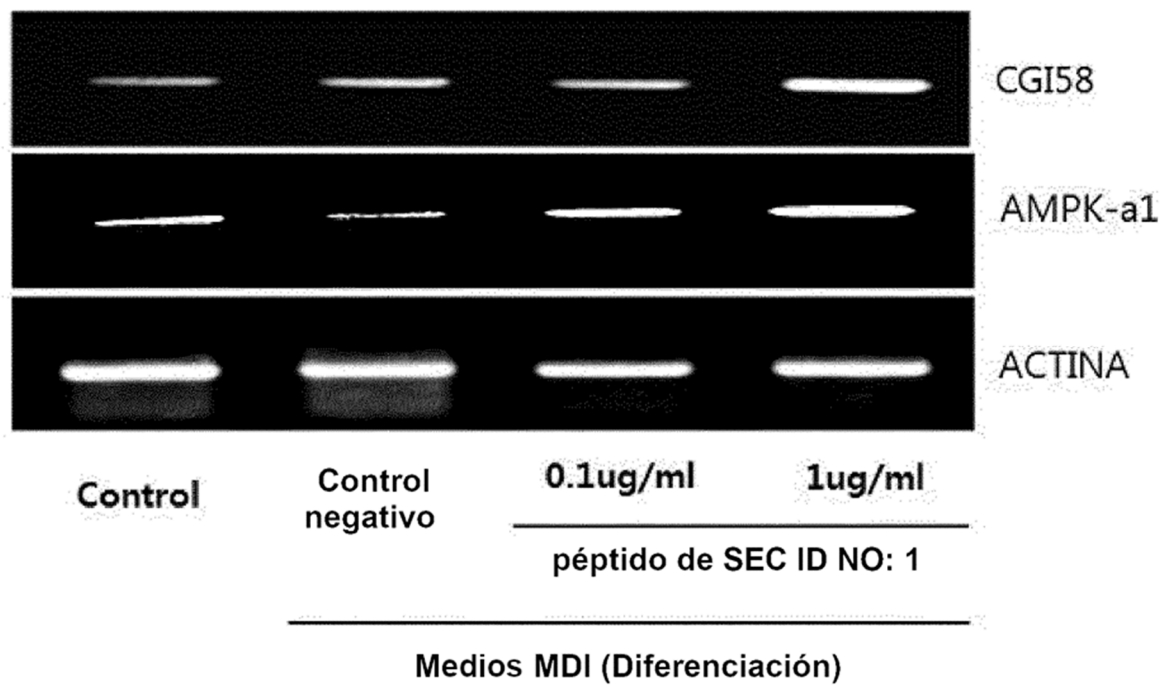


FIG. 6A

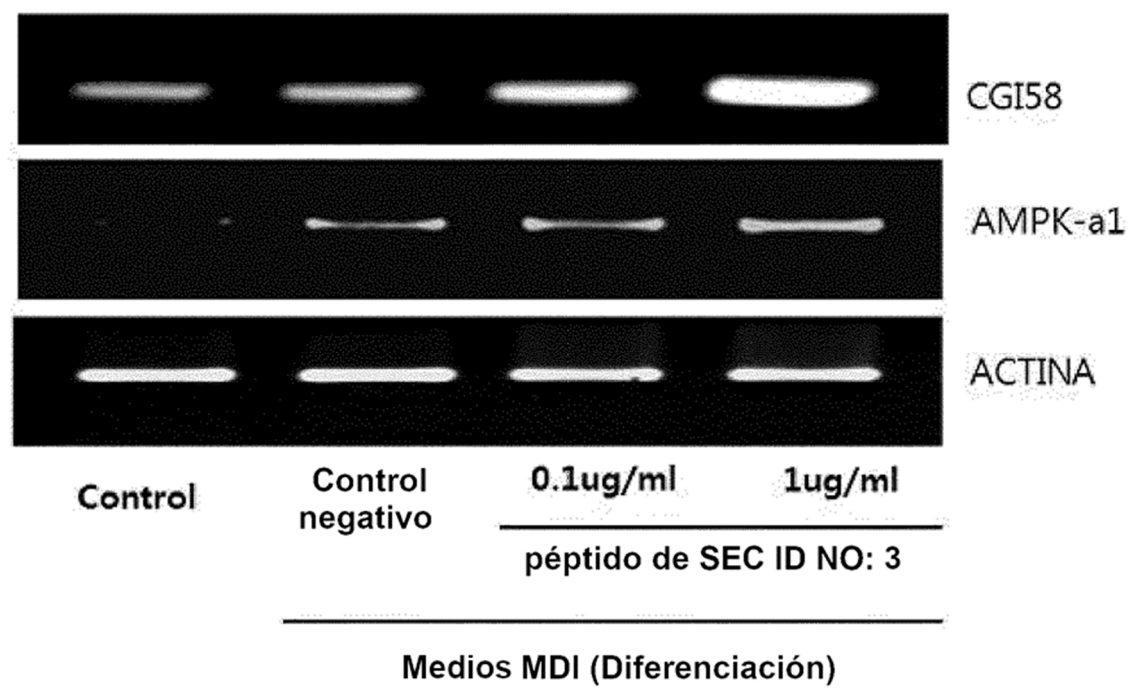


FIG. 6B

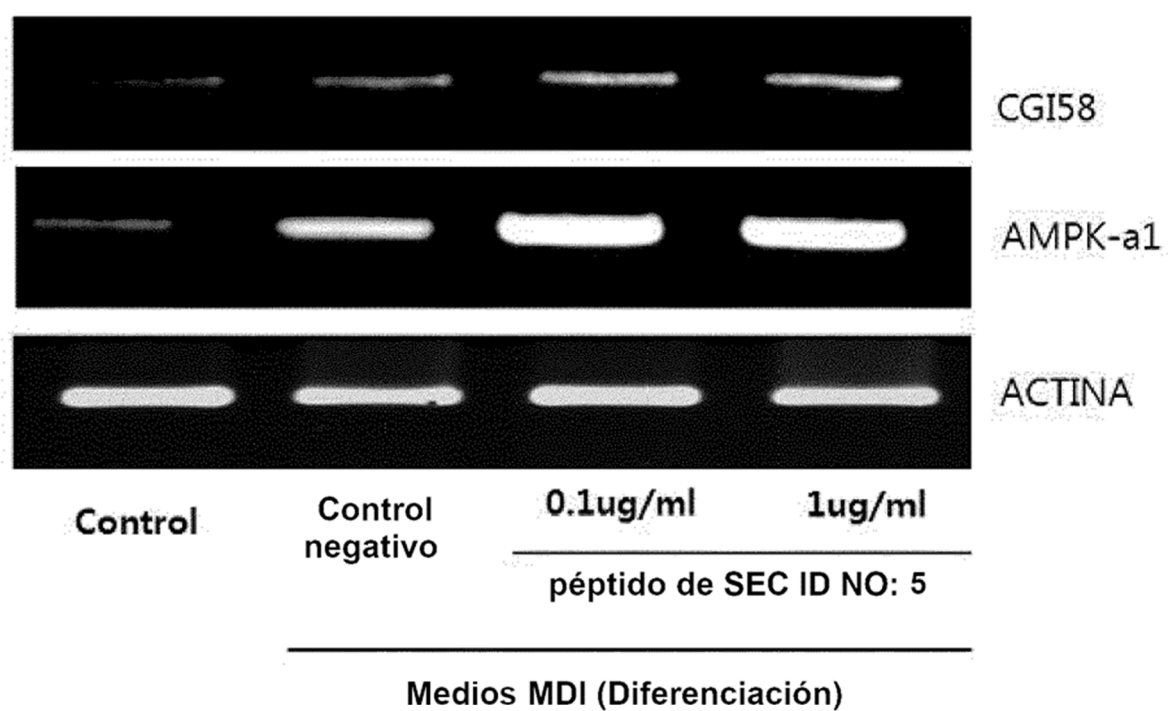


FIG. 6C

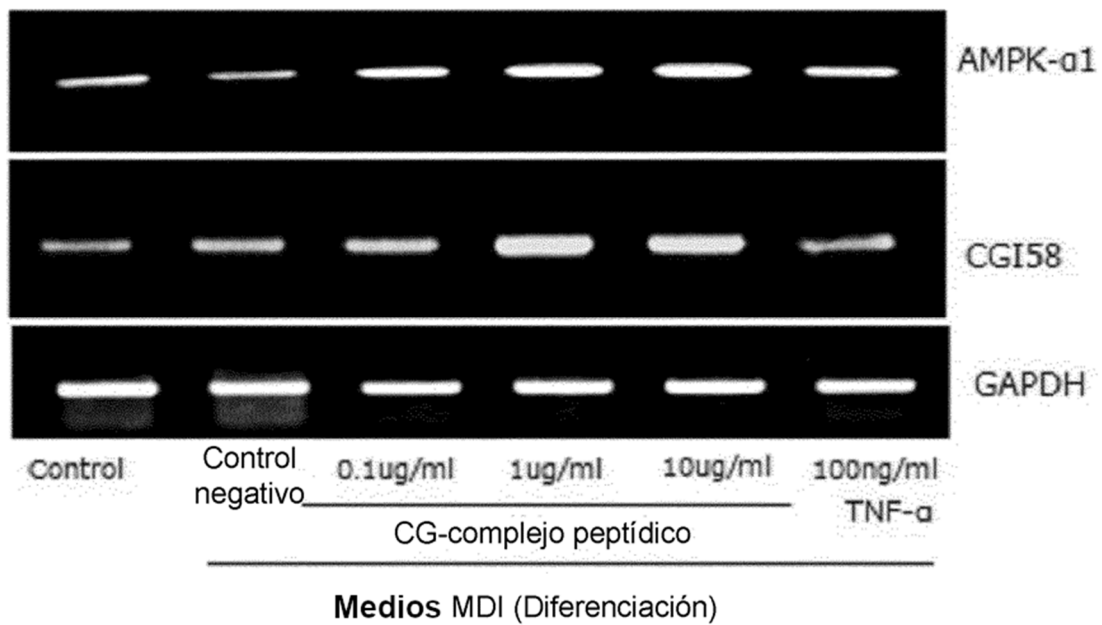


FIG. 6D

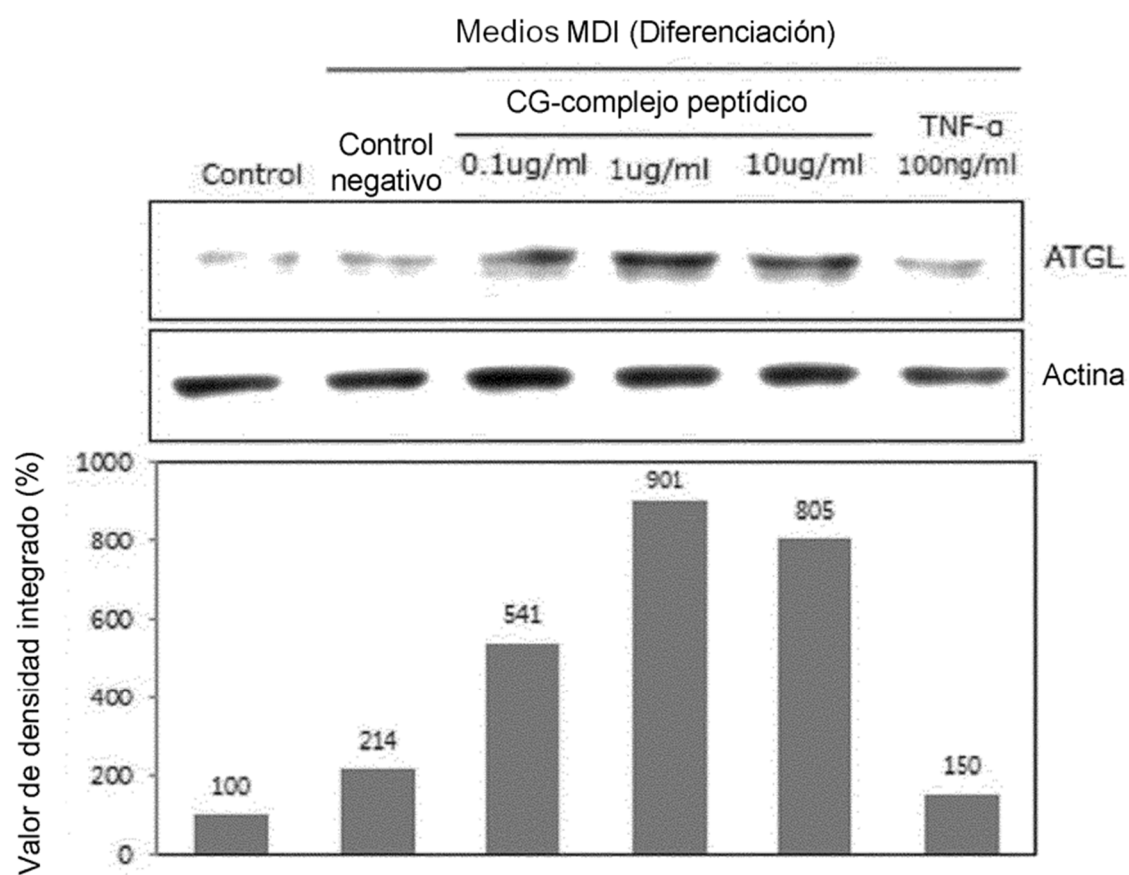


FIG. 7

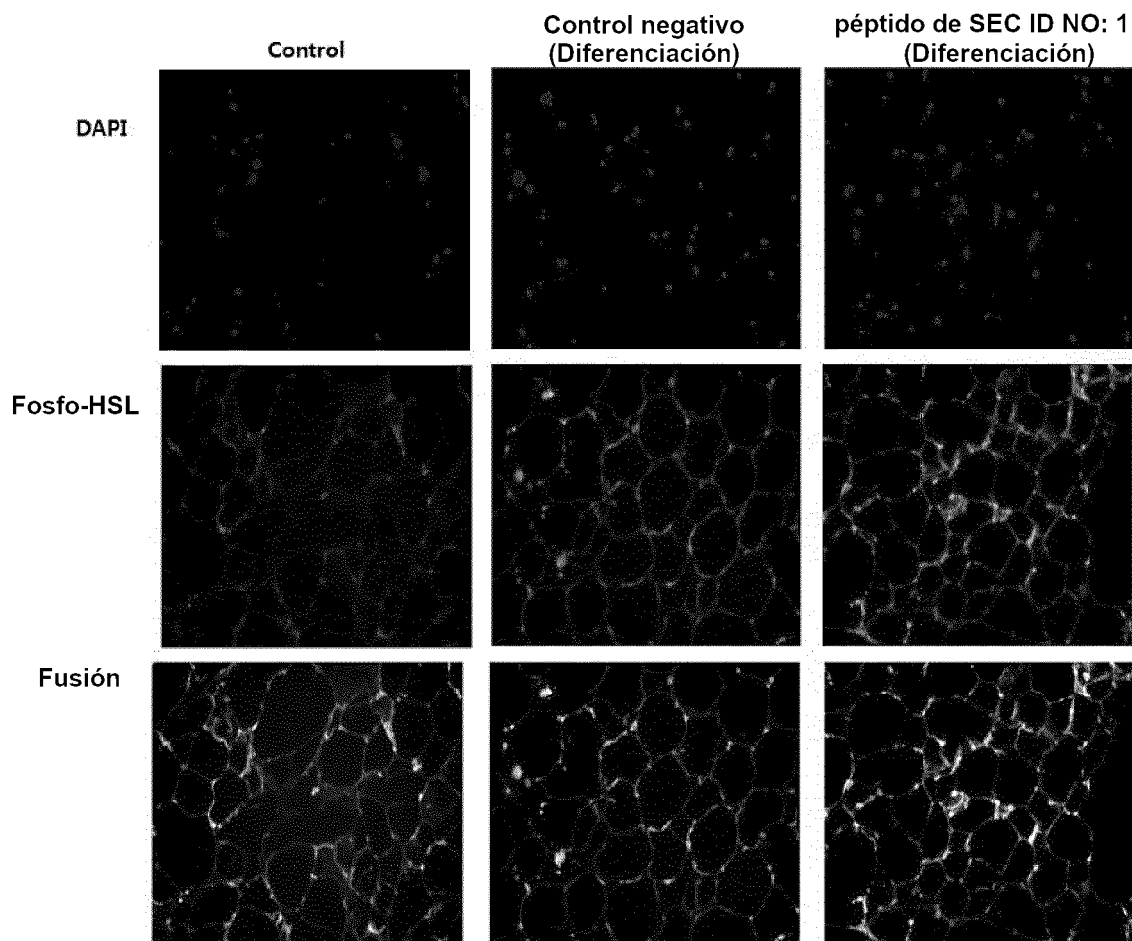


FIG. 8A

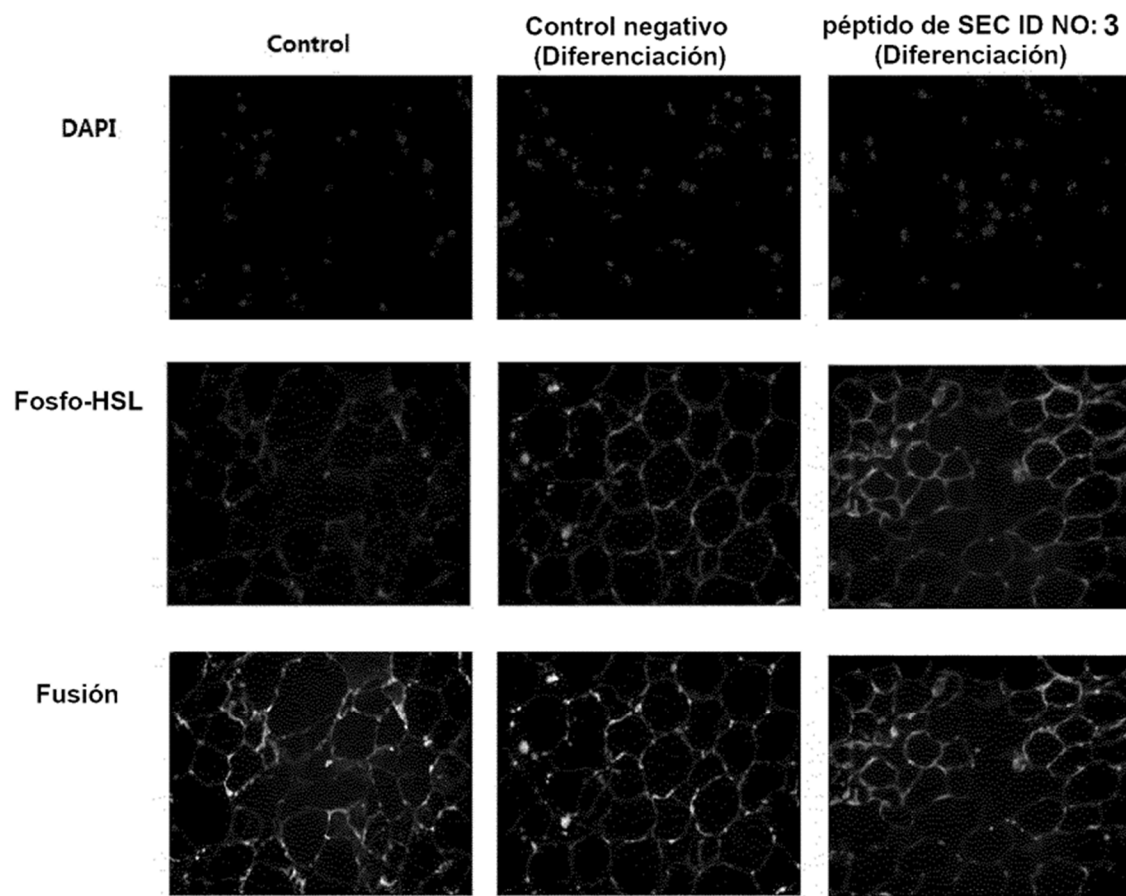


FIG. 8B

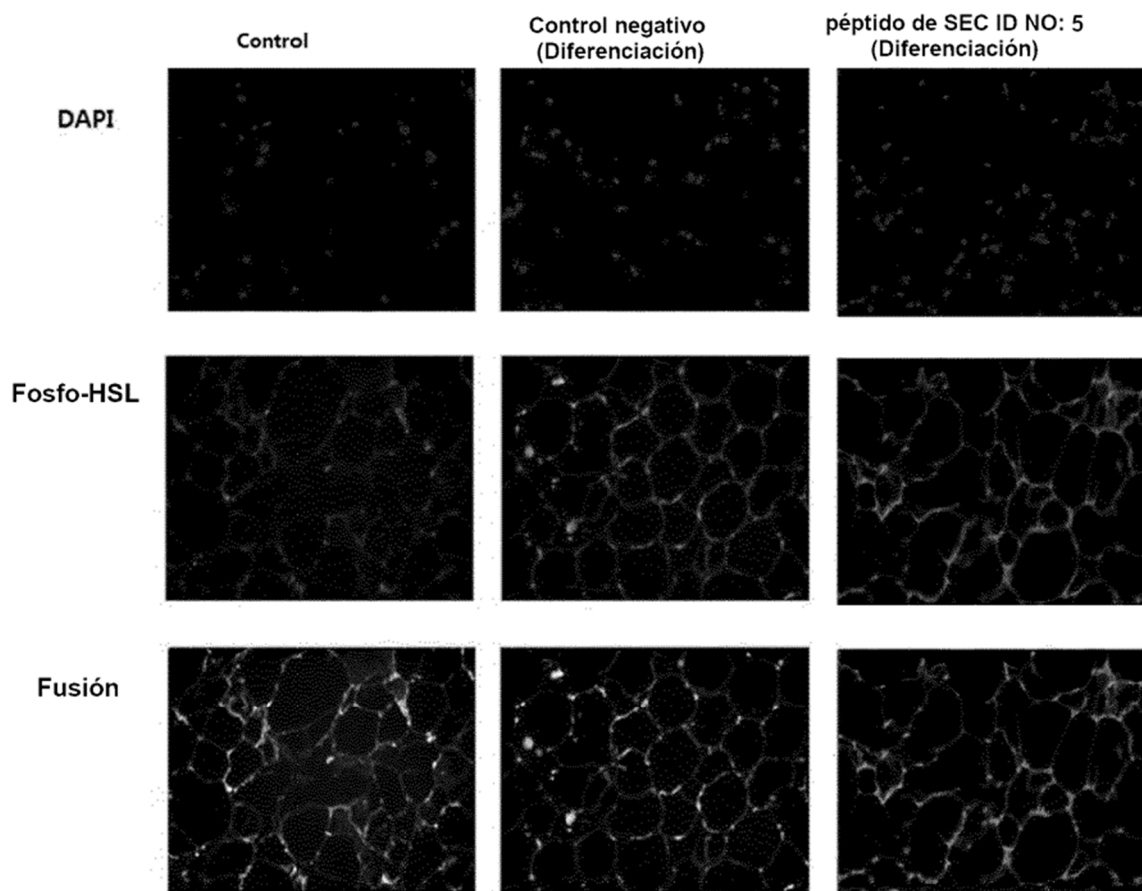


FIG. 8C

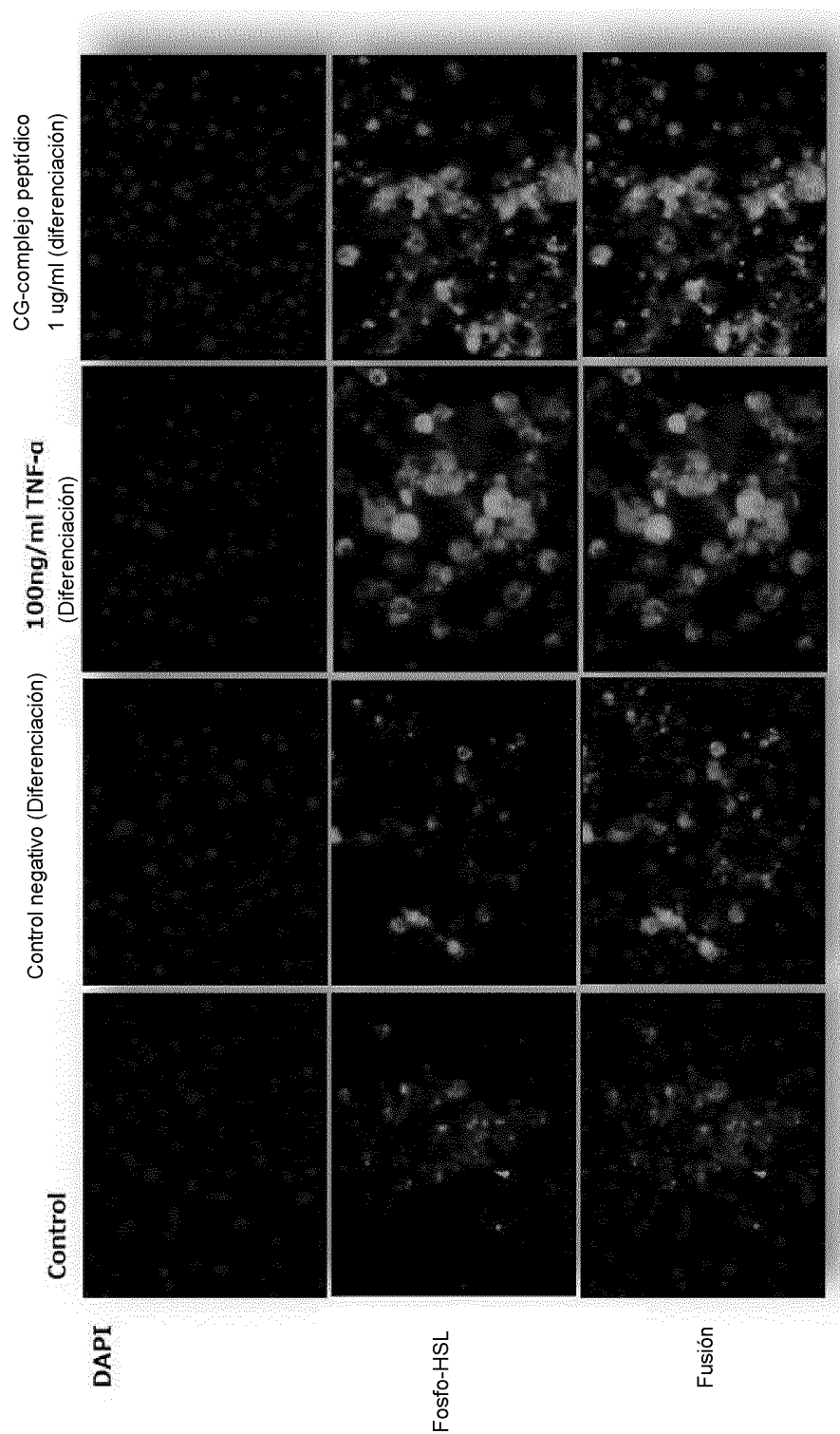


FIG. 8D

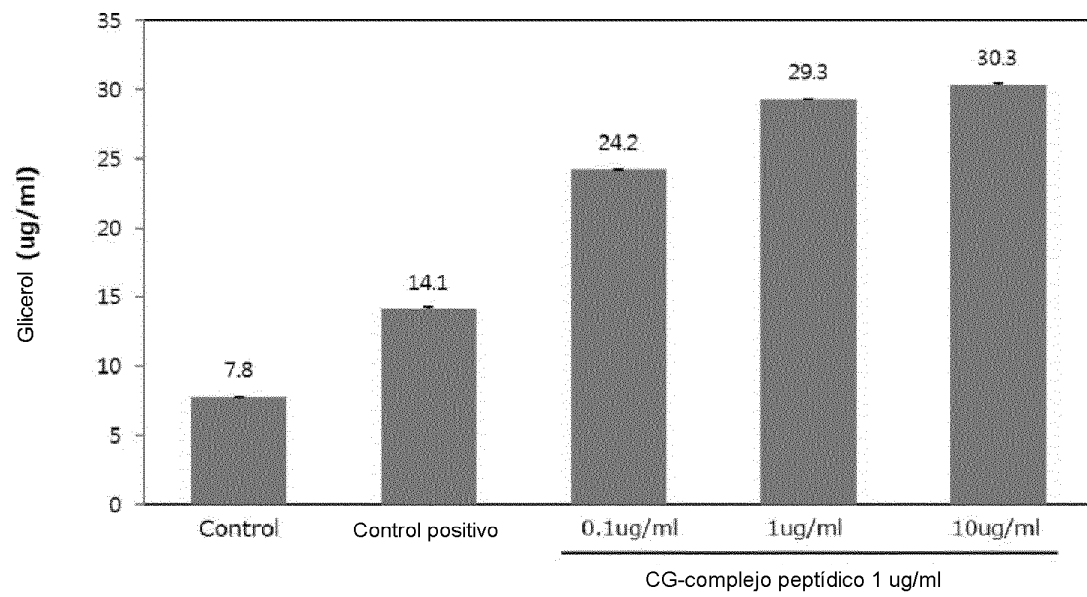


FIG. 9

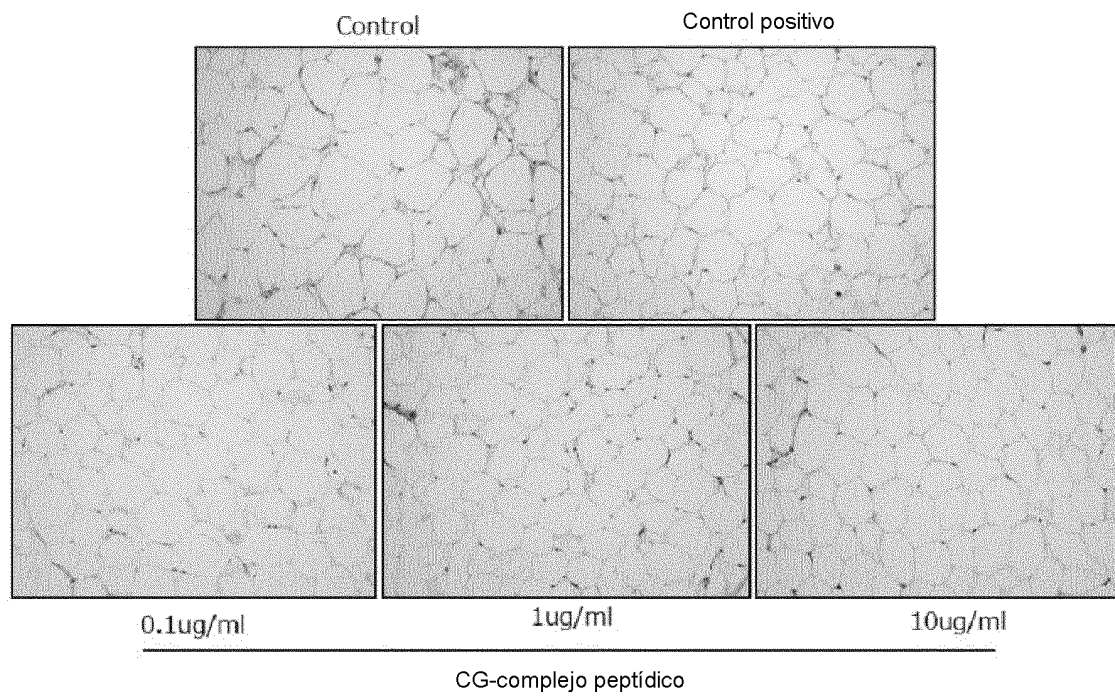


FIG. 10A

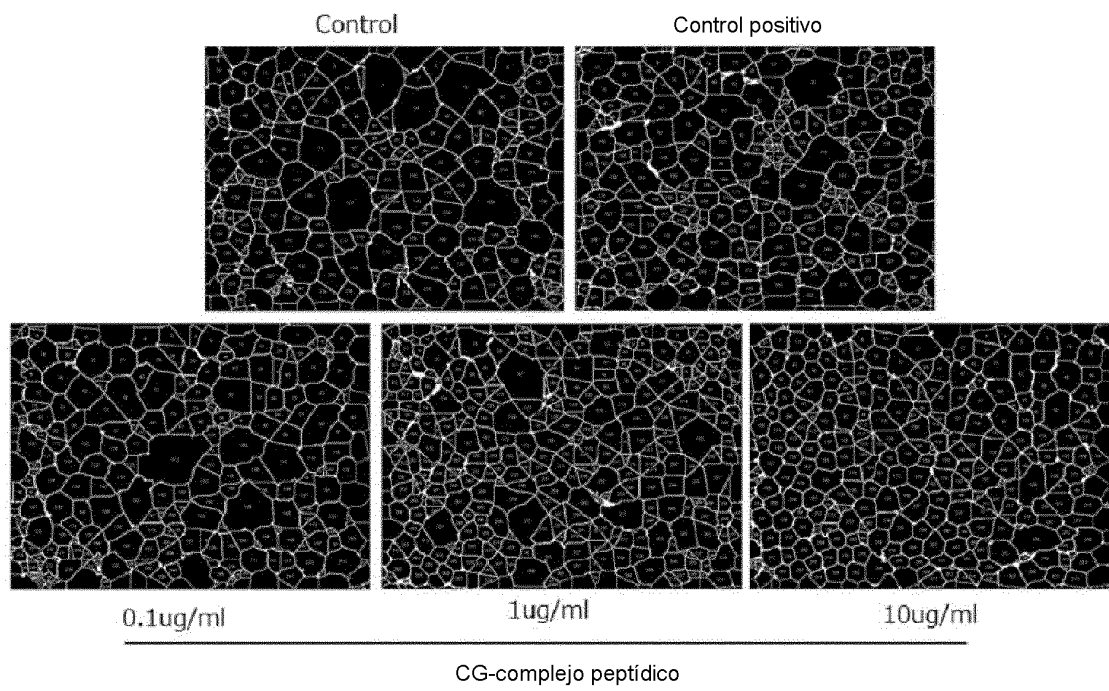


FIG. 10B

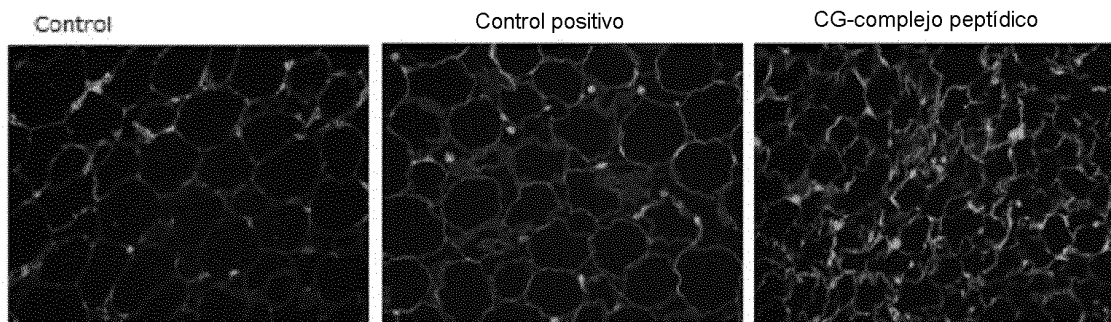


FIG. 11

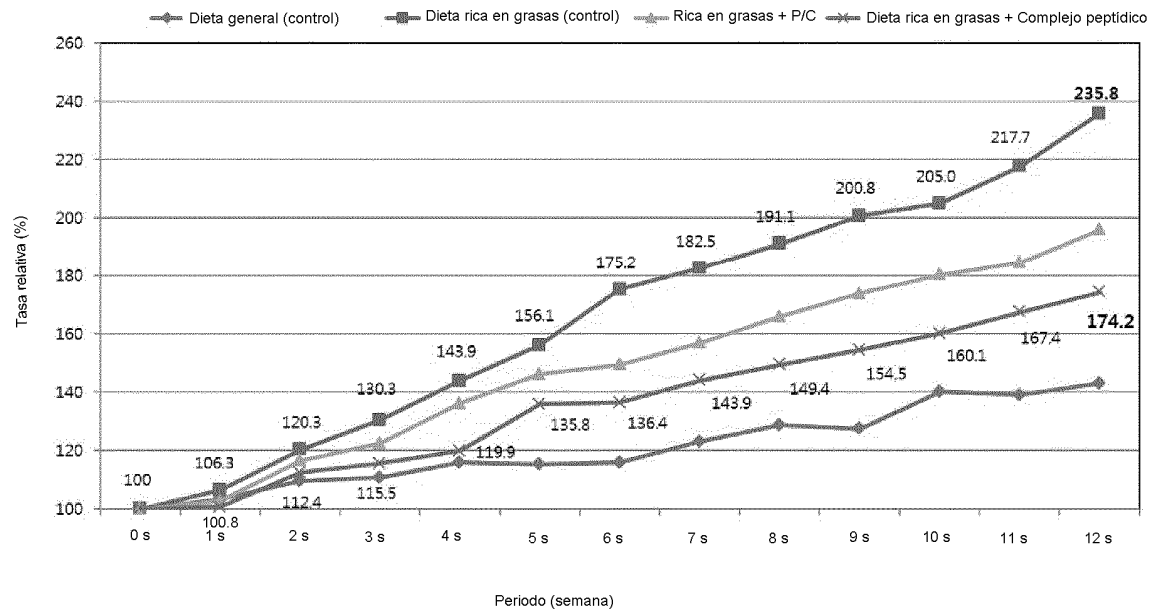


FIG. 12

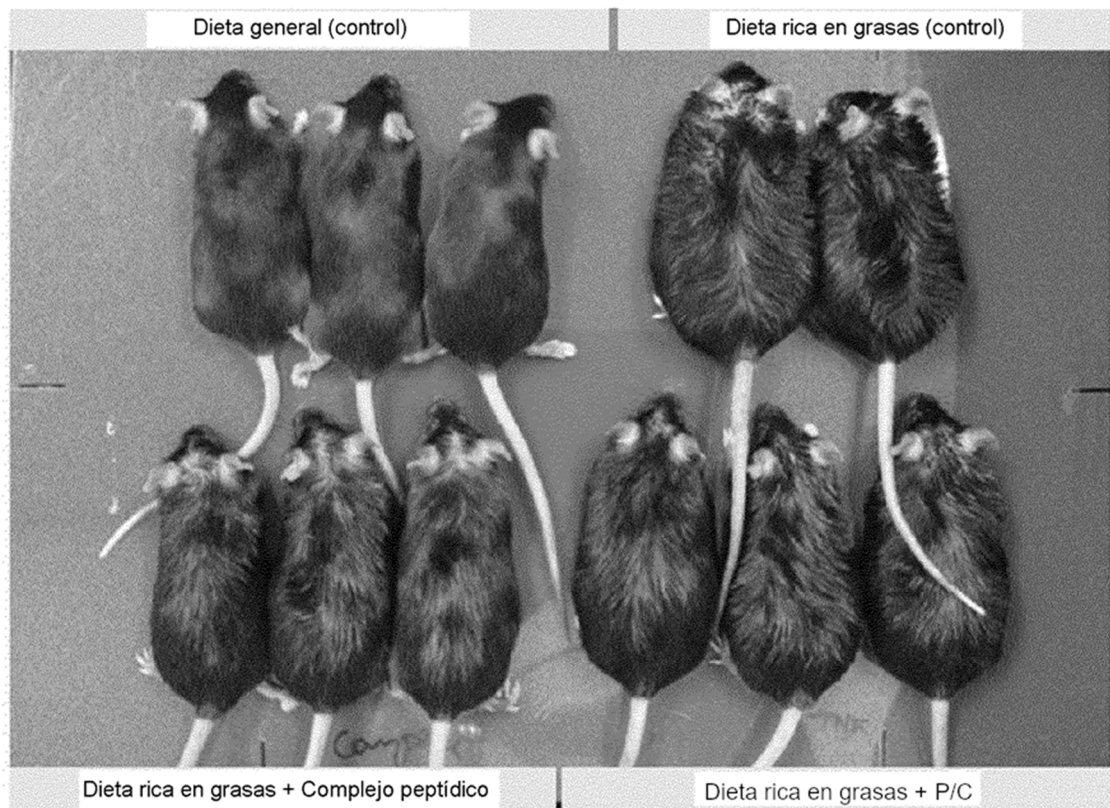


FIG. 13

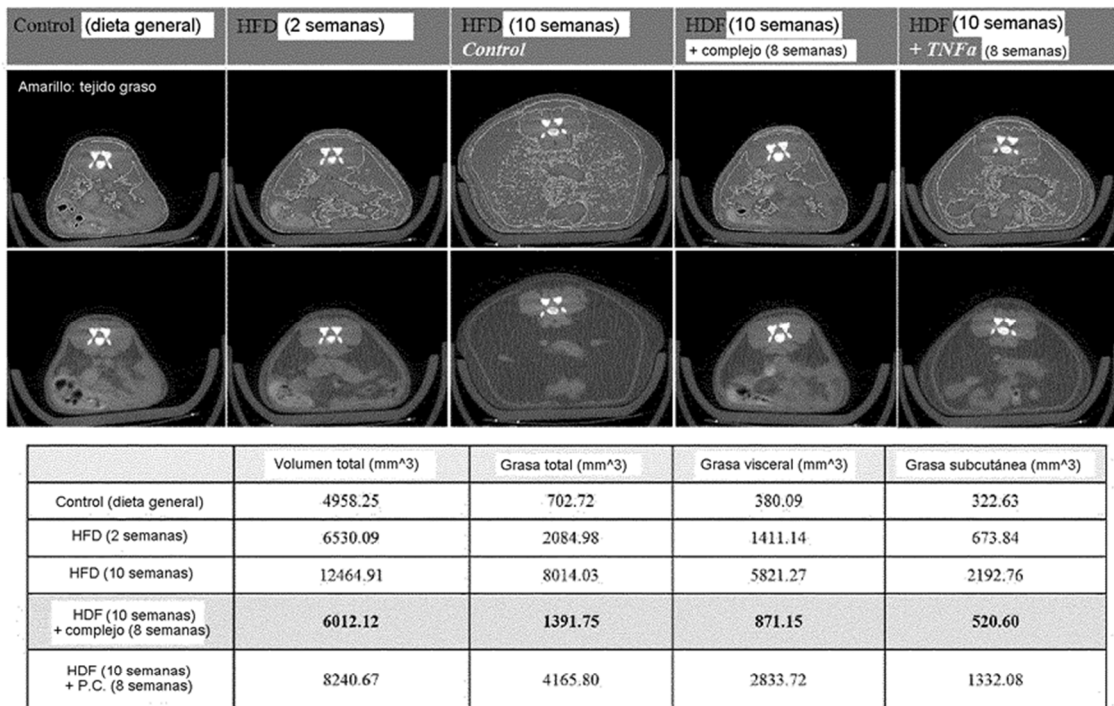


FIG. 14

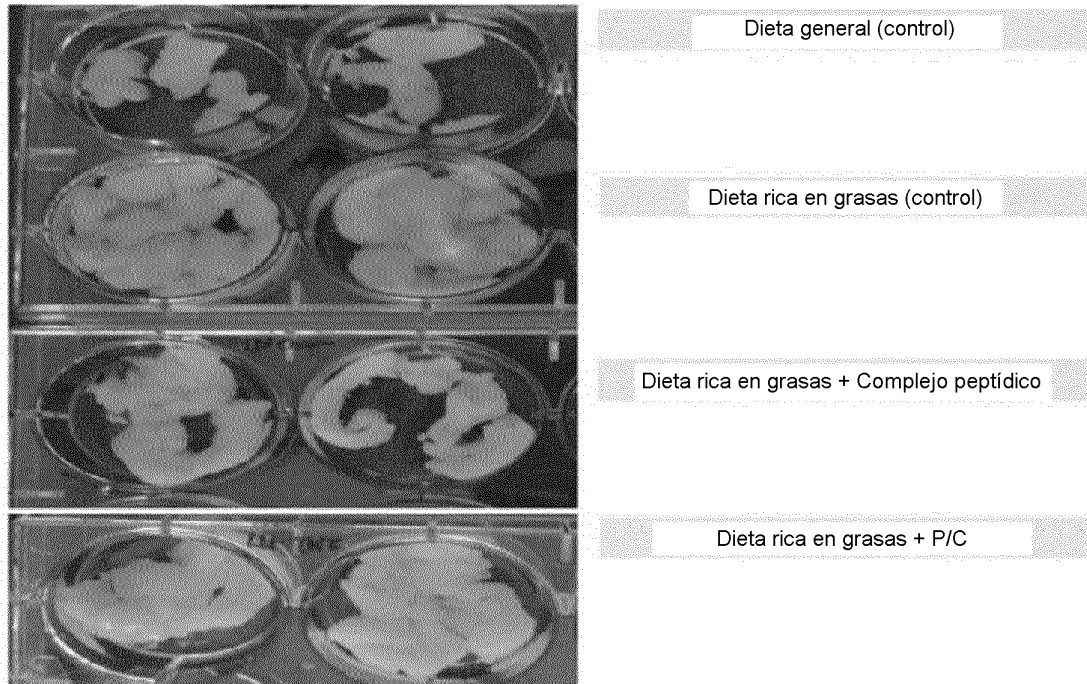


FIG. 15

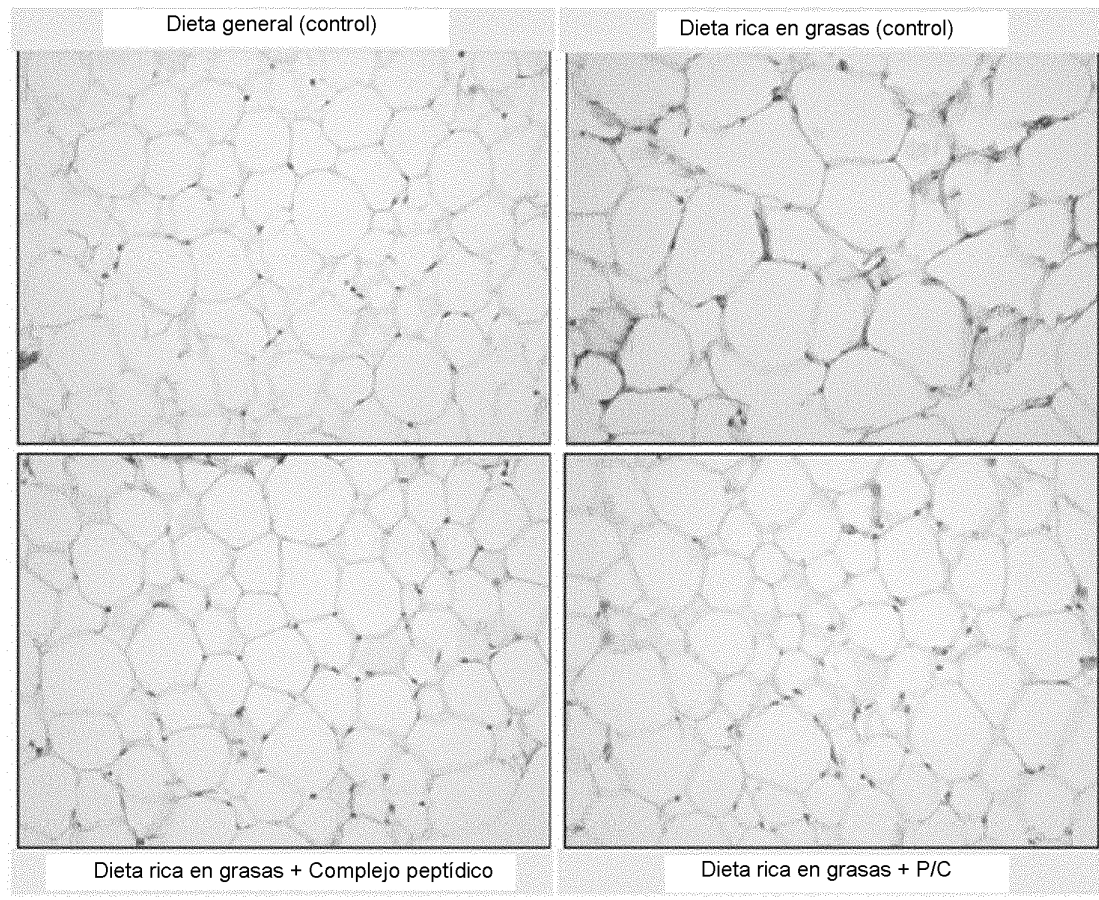


FIG. 16A

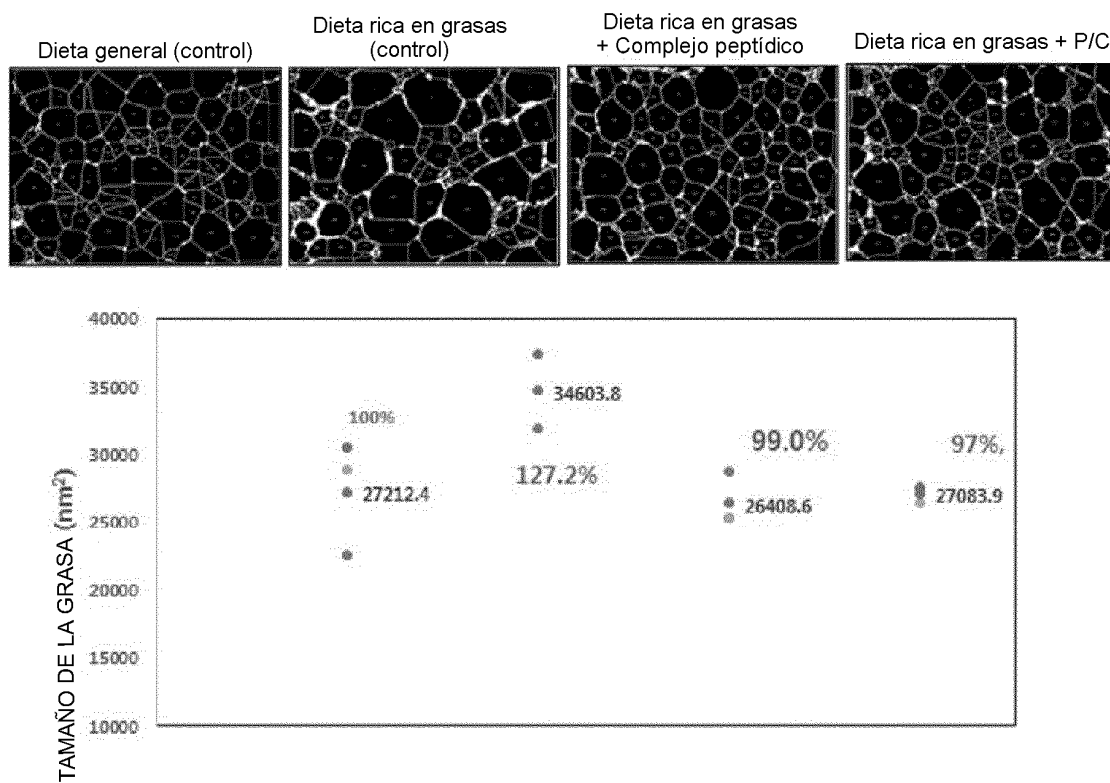


FIG. 16B

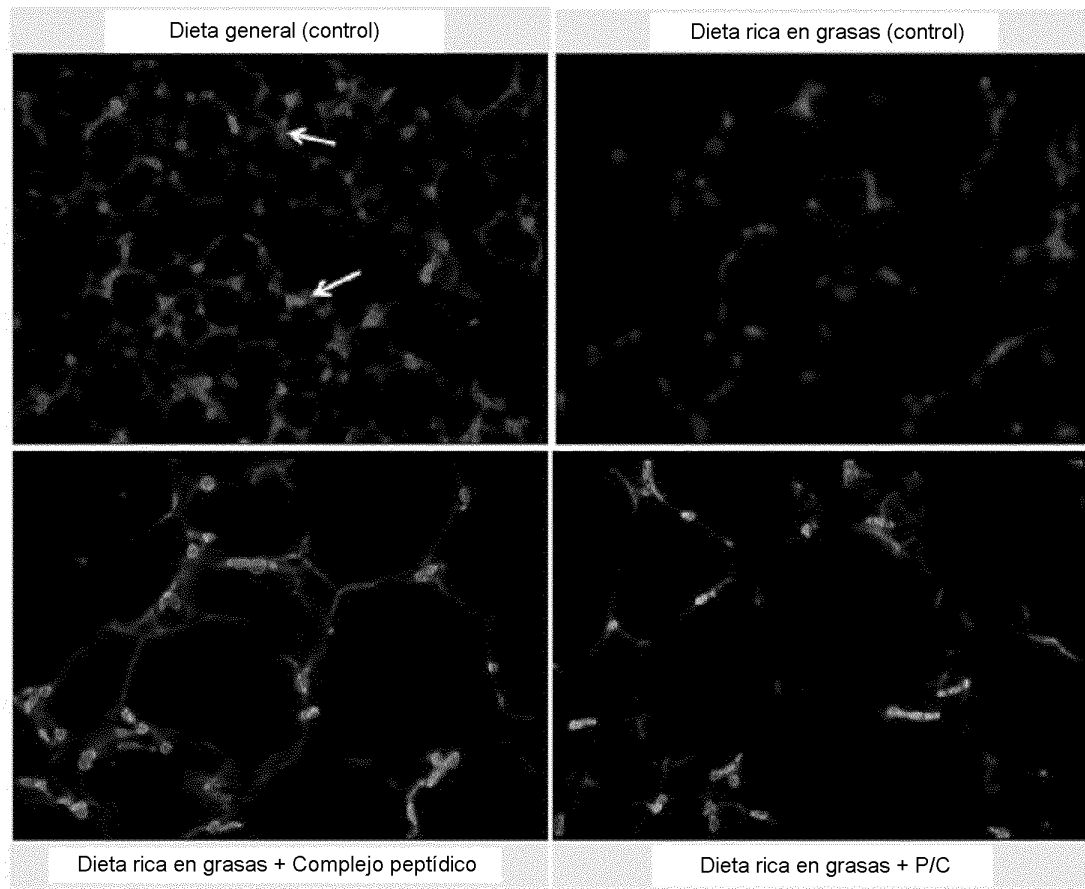


FIG. 17

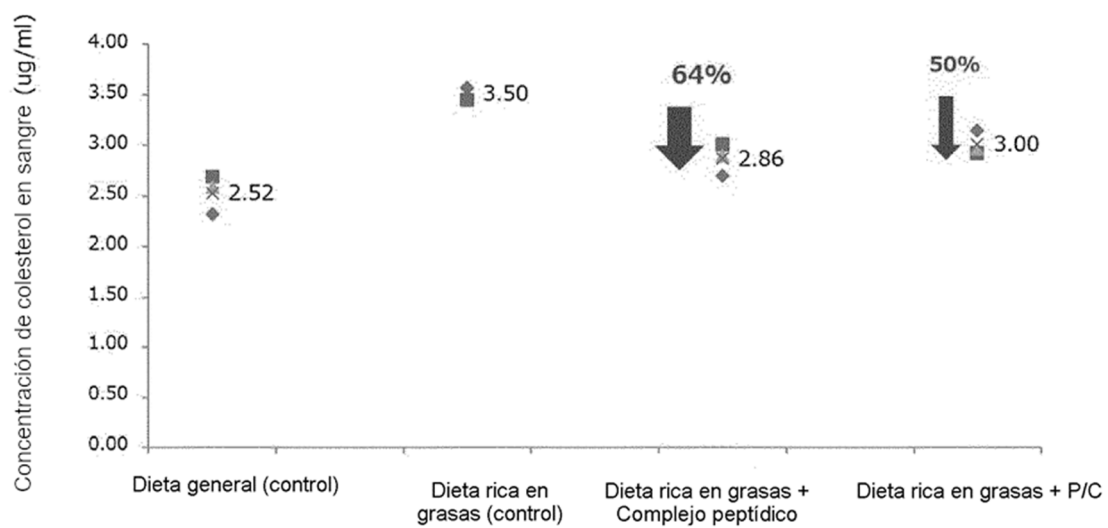


FIG. 18

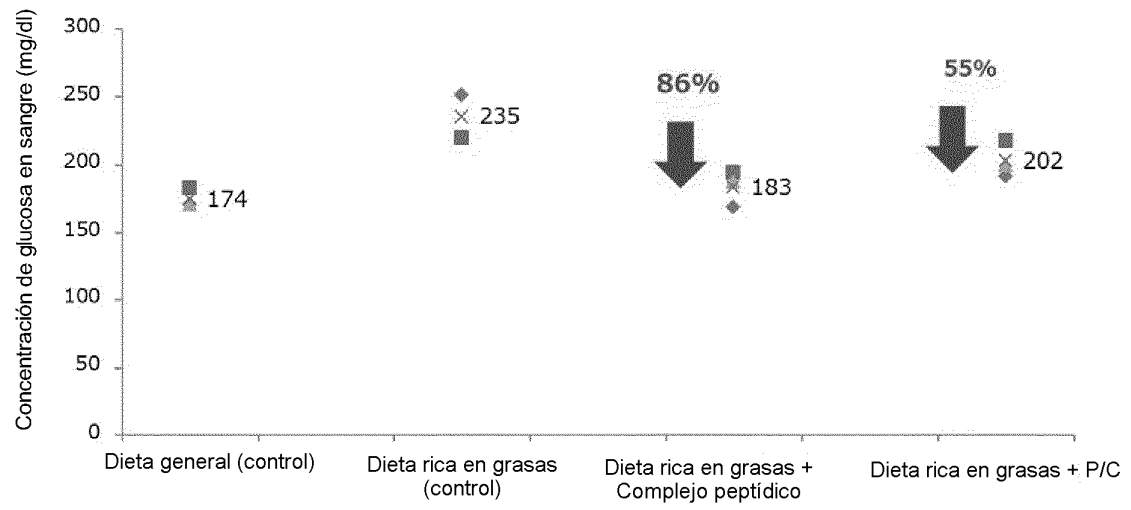


FIG. 19

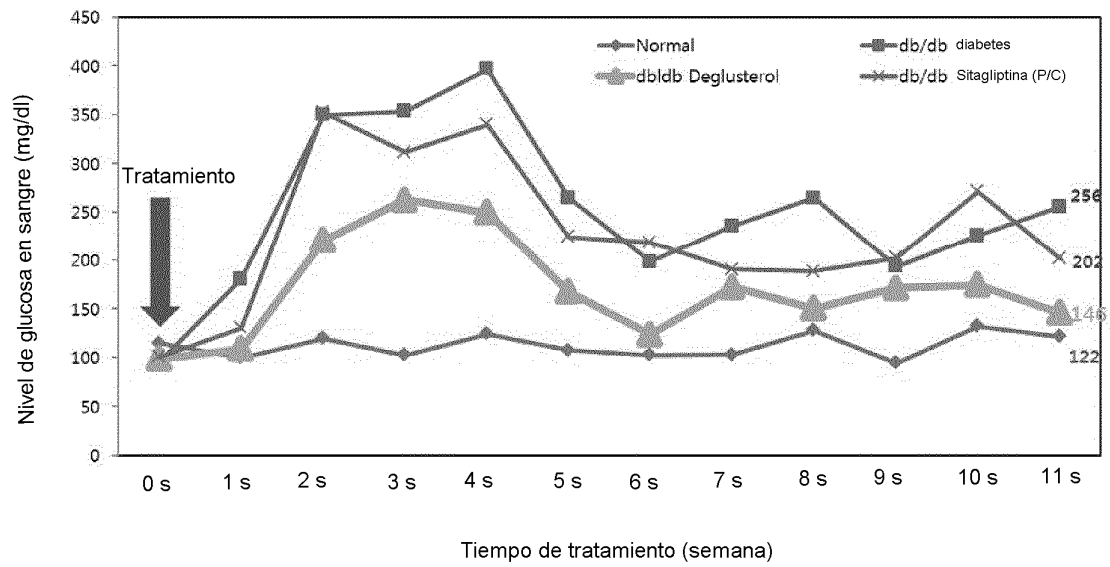


FIG. 20A

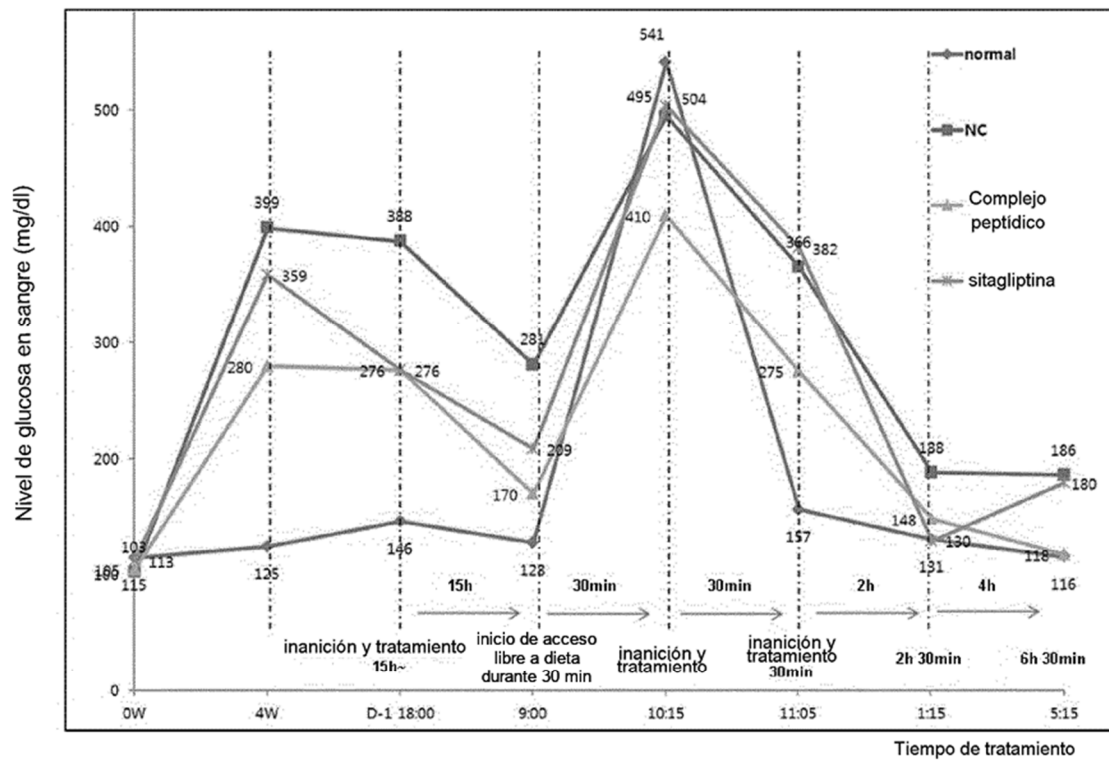


FIG. 20B

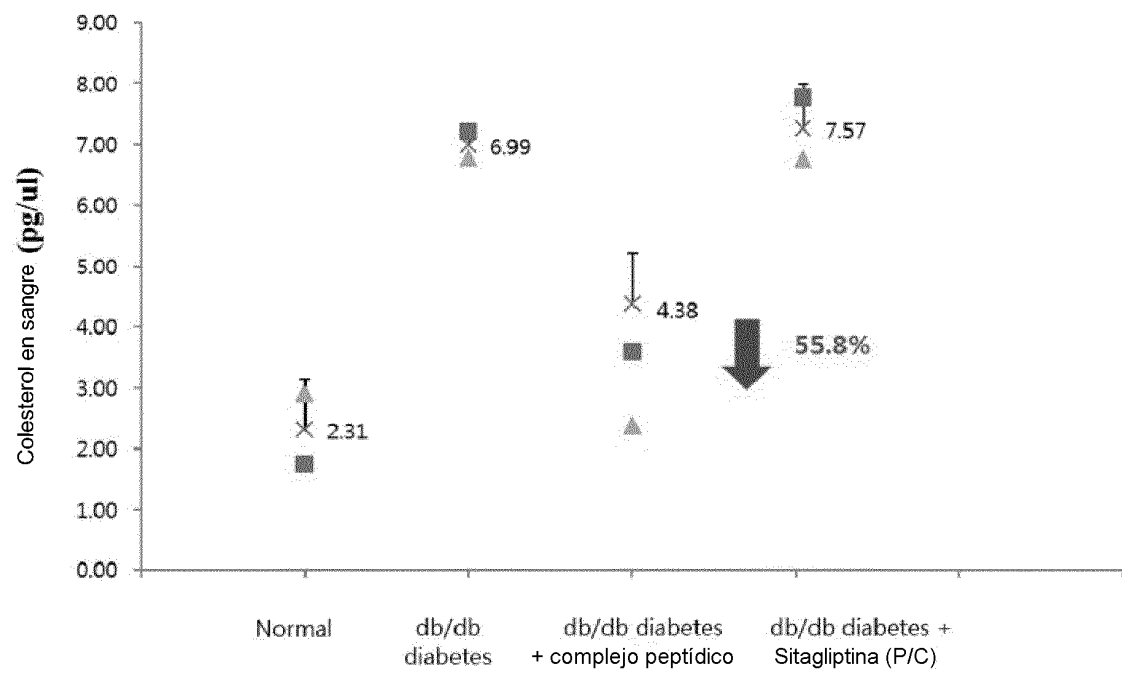


FIG. 21

		nivel de azúcar en sangre (mg/dl)						
		Nivel de azúcar en sangre en ayunas	Ingesta y dieta	30 min después de comer	60 min después de comer	120 min después de comer	240 min después de comer	300 min después de comer
Normal	Normal	105		184	181	147	151	135
diabetes rica en grasas	PBS	178		227	250	301	247	200
	péptido de SEC ID N°: 1	172		212	225	163	147	145

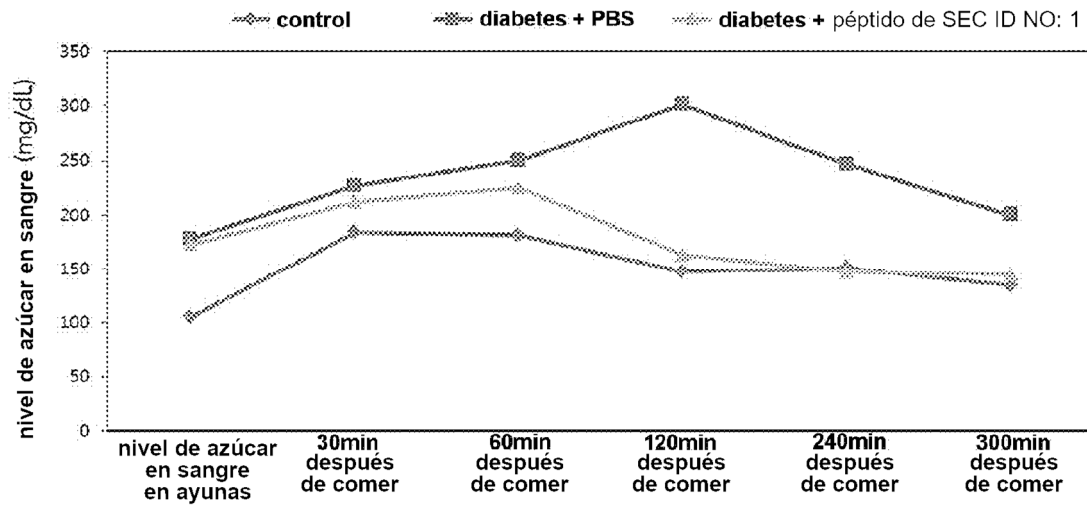


FIG. 22A

		nivel de azúcar en sangre (mg/dl)						
		Nivel de azúcar en sangre en ayunas	Ingesta y dieta	30 min después de comer	60 min después de comer	120 min después de comer	240 min después de comer	300 min después de comer
Normal	Normal	105		184	181	147	151	135
diabetes rica en grasas	PBS	178		227	250	301	247	200
	péptido de SEC ID N°: 3	181		219	231	174	158	152

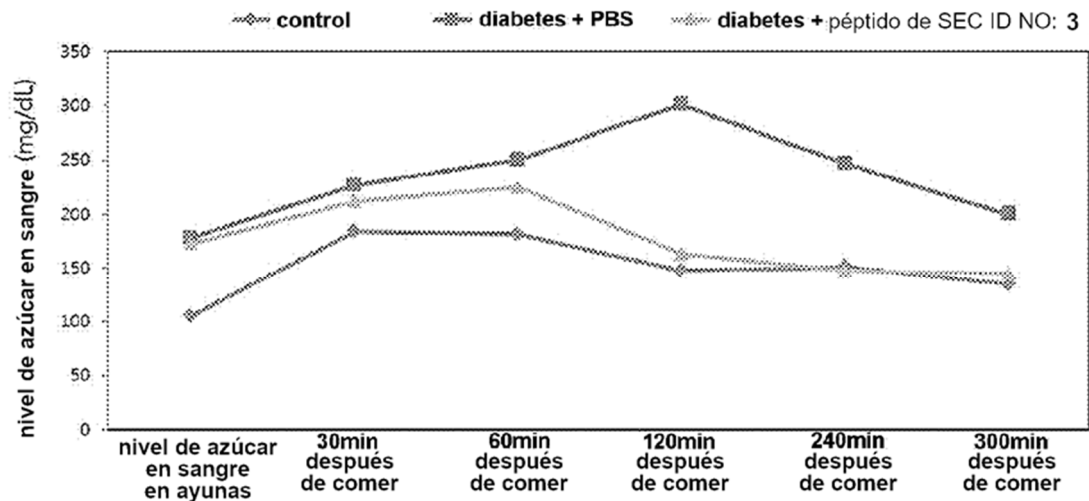


FIG. 22B

nivel de azúcar en sangre (mg/dl)								
		Nivel de azúcar en sangre en ayunas	Ingesta y dieta	30 min después de comer	60 min después de comer	120 min después de comer	240 min después de comer	300 min después de comer
Normal	Normal	105		184	181	147	151	135
diabetes rica en grasas	PBS	178		227	250	301	247	200
	péptido de SEC ID N°: 5	165		220	231	198	172	166

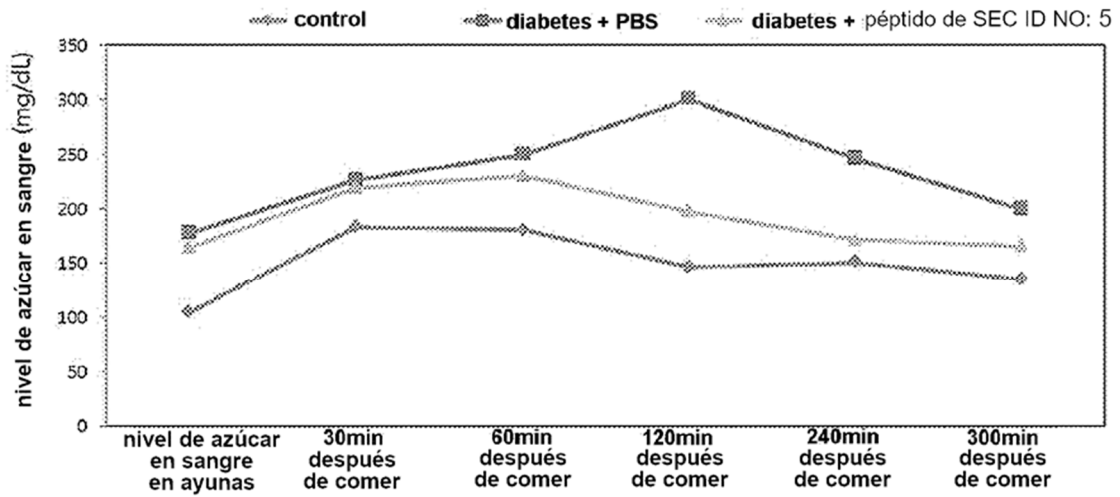


FIG. 22C

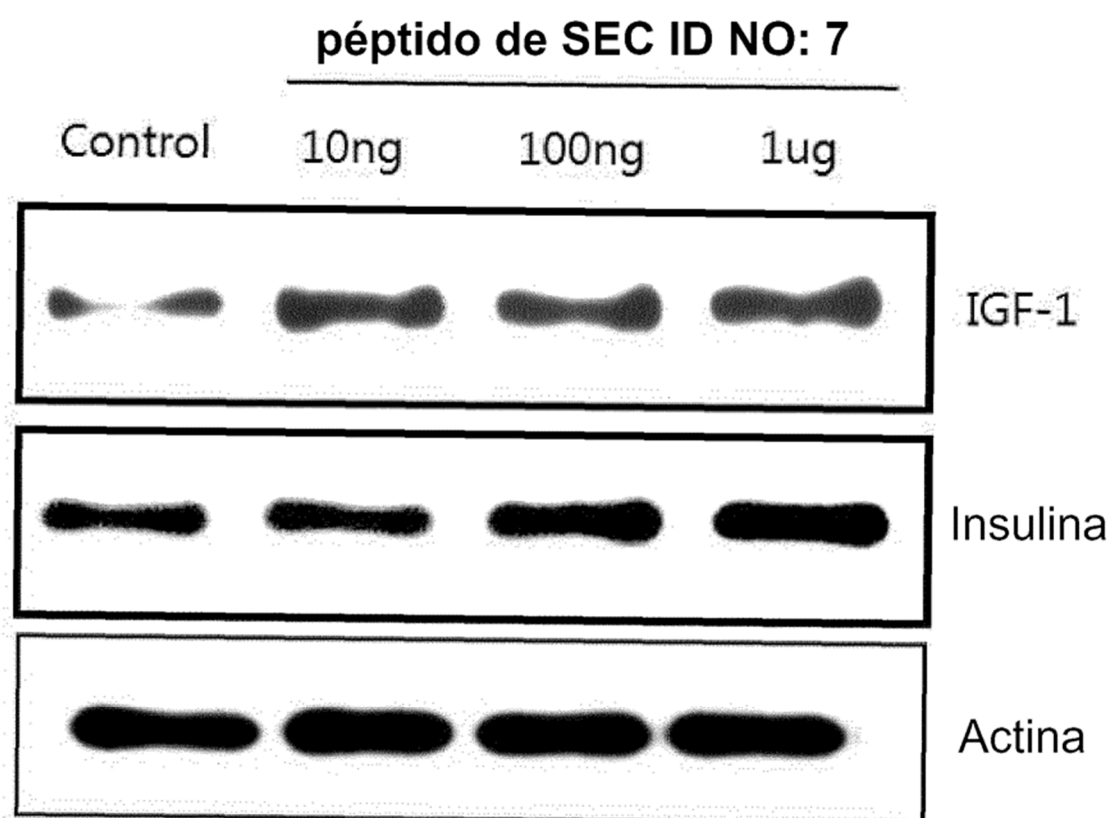


FIG. 23

		nivel de azúcar en sangre (mg/dl)						
		Nivel de azúcar en sangre en ayunas	Ingesta y dieta	30 min después de comer	60 min después de comer	120 min después de comer	240 min después de comer	300 min después de comer
Normal	Normal	105		184	181	147	151	135
diabetes rica en grasas	PBS	178		227	250	301	247	200
	péptido de SEC ID N°: 7	165		219	223	171	169	163

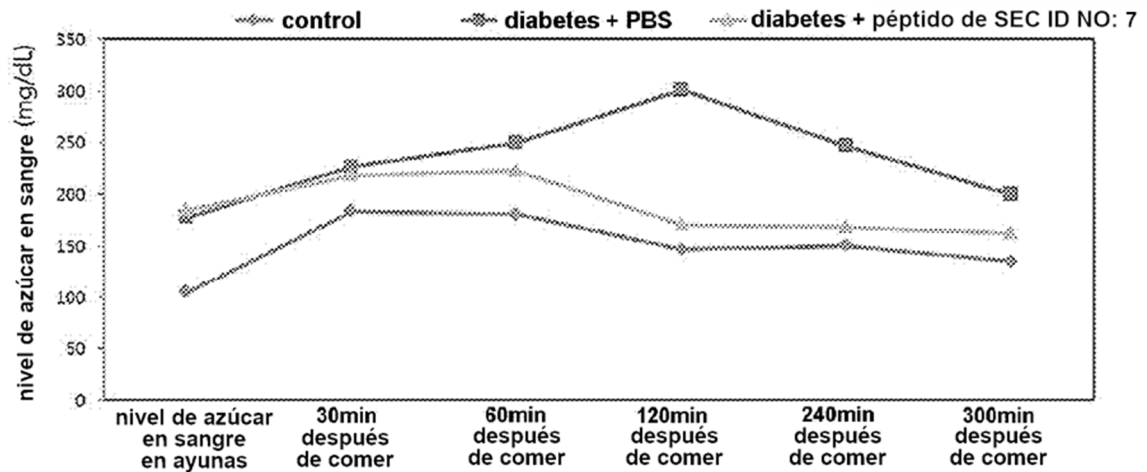


FIG. 24

Edad: 59
 Diabetes mellitus tipo 2 humana
 Tratamiento: una vez al día

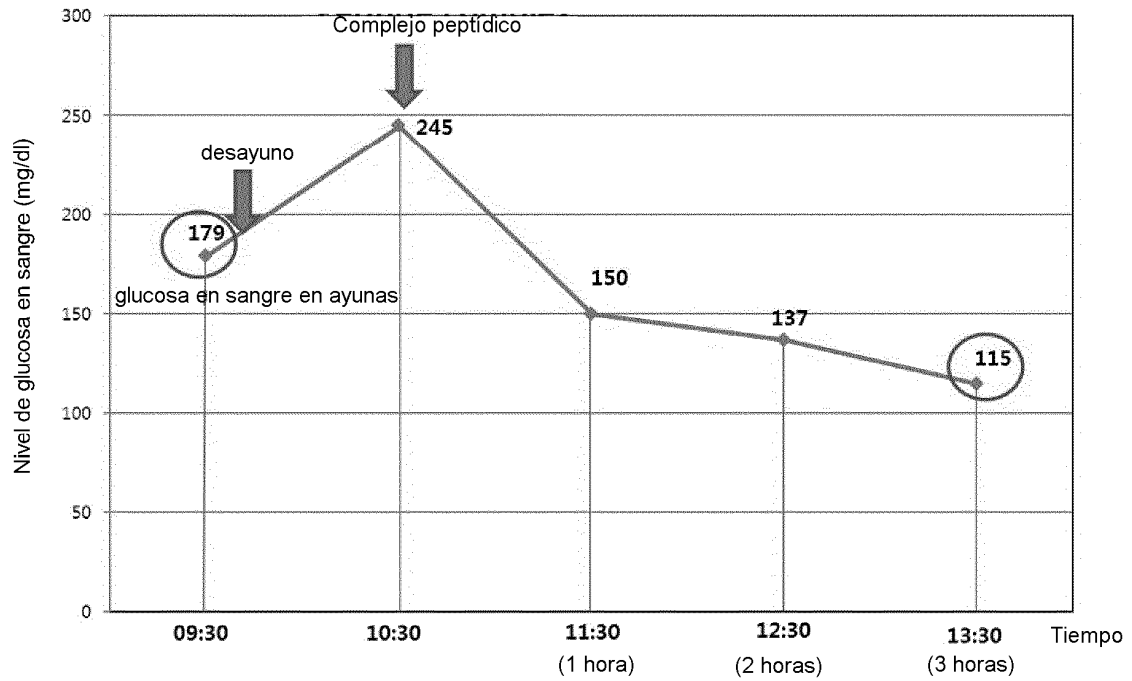


FIG. 25A

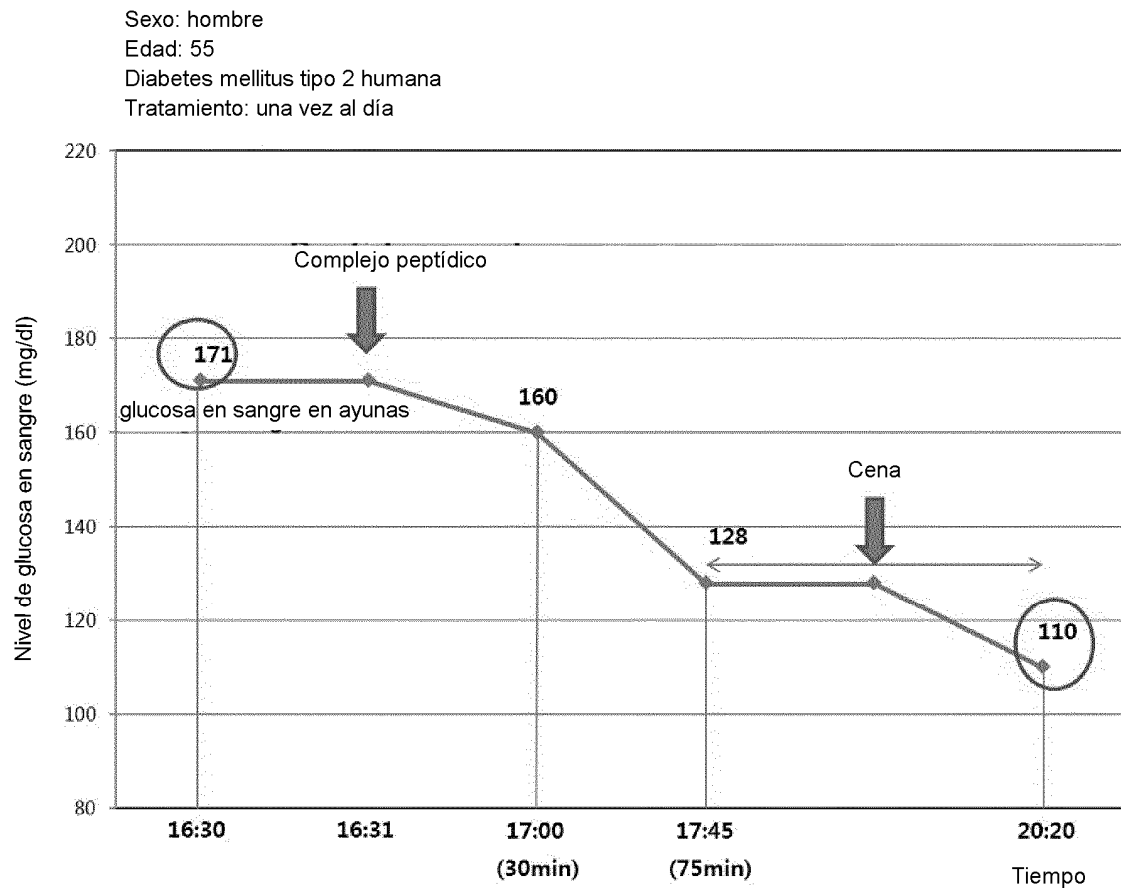


FIG. 25B

Sexo: Mujer
 Edad: 65
 Diabetes mellitus tipo 2 humana
 Tratamiento: una vez al día

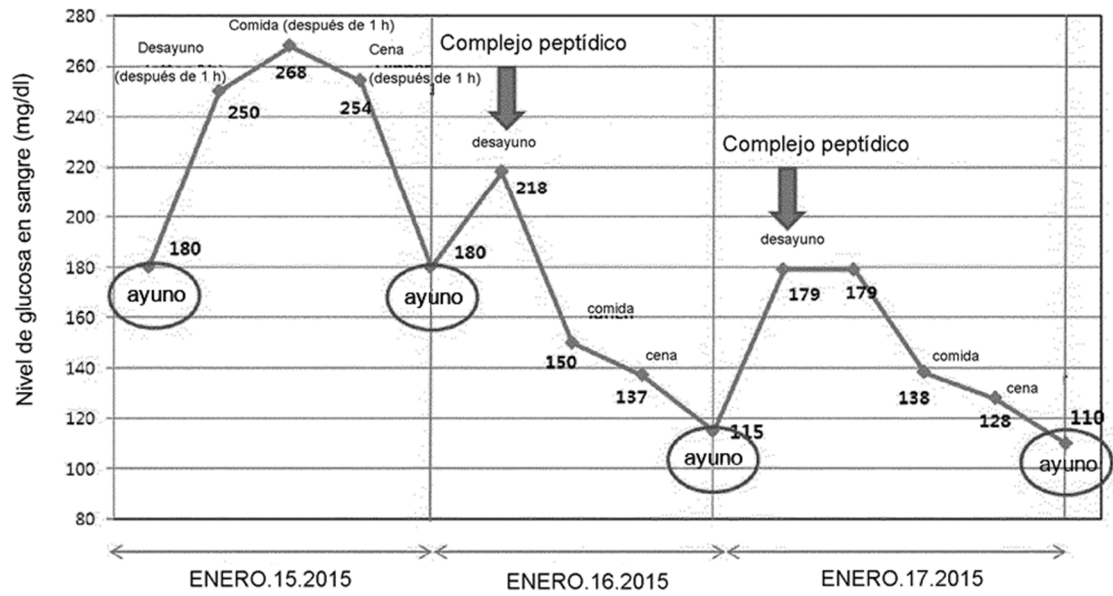


FIG. 25C

Sexo: Hombre (normal)
 Edad: 45
 Tratamiento: una vez al día

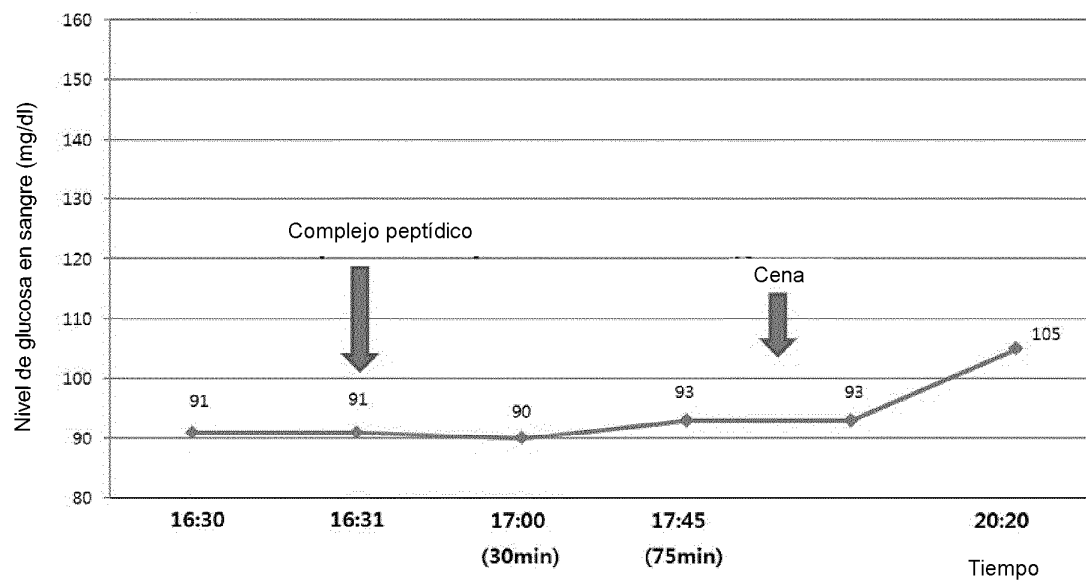


FIG. 25D