

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 901 416**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06	(2006.01)
A61K 38/08	(2009.01)
A61P 3/04	(2006.01)
A61K 38/22	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)
C07K 14/575	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2017 PCT/KR2017/003448**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2018 WO18074682**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2017 E 17861361 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.11.2021 EP 3530667**

54 Título: **Péptido que presenta eficacia antiobesidad y antidiabetes y uso del mismo**

30 Prioridad:

19.10.2016 KR 20160135615

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

22.03.2022

73 Titular/es:

**CAREGEN CO., LTD. (100.0%)
46-38 LS-ro 91beon-gil Dongan-gu
Anyang-si, Gyeonggi-do 14119, KR**

72 Inventor/es:

**CHUNG, YONG JI y
KIM, EUN MI**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 901 416 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 eficacia antiobesidad y antidiabetes y uso del mismo

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a un complejo peptídico que presenta eficacia antiobesidad y antidiabética y a la utilización del mismo, tal como se define en las reivindicaciones.

10 **Antecedentes de la técnica**

En Corea, últimamente se ha incrementado la ingesta de grasas en la dieta, con el crecimiento de la economía y la occidentalización de la vida alimentaria y la aparición de enfermedades metabólicas, tales como la obesidad, la diabetes, la hiperlipemia, la hipertensión, la arterioesclerosis y el hígado graso se están incrementado debido a la insuficiente actividad física. Además, la obesidad no solo daña la estética de las personas más jóvenes, que prefieren una forma corporal delgada, sino que se asocia además a diversos trastornos, con la persistencia de la obesidad.

Actualmente, los agentes terapéuticos para la obesidad pueden clasificarse en términos generales en fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central afectando al apetito y fármacos que actúan sobre el tracto gastrointestinal inhibiendo la incorporación. Los fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central se encuentran disponibles comercialmente en forma de fármacos antiobesidad que inhiben el sistema nervioso serotoninérgico (5-HT), tales como la fenfluramina y la dexfenfluramina; que actúan a través del sistema nervioso noradrenérgico, tales como la efedrina y la cafeína, y que actúan sobre tanto el sistema nervioso serotoninérgico como el noradrenérgico, tal como la recientemente desarrollada sibutramina, según sus mecanismos respectivos. Además, representativo de los fármacos antiobesidad que actúan sobre el tracto gastrointestinal es el orlistat, etc., autorizado como agente terapéutico para la obesidad, que inhibe la lipasa intestinal a fin de reducir la incorporación de grasas.

Sin embargo, existen problemas con algunos de los fármacos actuales. Por ejemplo, recientemente se ha prohibido la comercialización de algunos fármacos, tales como la fenfluramina, debido al efecto secundario de producir hipertensión pulmonar primaria o enfermedad cardíaca valvular, y otros fármacos no pueden utilizarse simultáneamente en pacientes que sufren de insuficiencia cardíaca o enfermedad renal debido a la aparición de una presión sanguínea disminuida o de acidosis láctica.

La diabetes es un tipo de trastorno metabólico provocado por la secreción insuficiente de insulina o porque no se consigue un funcionamiento normal de la misma (DeFronzo, 1988), y se caracteriza por hiperglucemia con niveles elevados de glucosa en sangre, que causan una diversidad de síntomas y signos y provocan la excreción de glucosa en la orina. Recientemente se ha incrementado explosivamente la incidencia de diabetes debido al incremento de la tasa de obesidad, especialmente la obesidad abdominal.

Se ha estimado que el número de pacientes diabéticos era de 170 millones en todo el mundo en 2000 y se espera que alcance 370 millones en 2030. Sin embargo, recientemente se ha informado de que el número de pacientes diabéticos ya había alcanzado 350 millones en todo el mundo en 2008, que es mucho peor de lo esperado (Danaei *et al.*, 2011). Se ha informado de que más de aproximadamente 80% de los pacientes con diabetes de tipo 2 son obesos, mientras que solo 10% de los pacientes obesos presentan diabetes (Harris *et al.*, 1987).

La relación entre diabetes y obesidad se atribuye al hecho de que las adipoquinas y los ácidos grasos libres son secretados irregularmente provocando la acumulación de ácidos grasos en los tejidos sensibles a la insulina, tales como las células beta, los riñones, el hígado, el corazón, etc., dando como resultado lipotoxicidad. En el caso de que la hiperglucemia crónica no se trate correctamente, se verá acompañada de diversos síntomas patológicos, tales como retinopatía, disfunción renal, neuropatía y trastornos vasculares en el cuerpo. El control eficaz de los niveles sanguíneos de azúcar resulta esencial para prevenir dichas complicaciones.

Actualmente, el procedimiento de control de los niveles sanguíneos de azúcar se consigue mediante la mejora del estilo de vida (por ejemplo, la terapia de dieta y la terapia de ejercicio), la terapia farmacológica, etc. Sin embargo, la terapia de dieta o la terapia de ejercicio resultan difíciles de controlar e implementar estrictamente, y existen limitaciones a sus efectos. De esta manera, la mayoría de pacientes diabéticos se basan en el control de los niveles sanguíneos de azúcar por fármacos tales como la insulina, secretagogos de la insulina, sensibilizadores de la insulina y agentes hipoglucemiantes, así como una mejora del estilo de vida.

La insulina producida por un procedimiento recombinante es un fármaco esencial para los pacientes con diabetes de tipo 1 y pacientes con diabetes de tipo 2 que no consiguen controlar los niveles sanguíneos de azúcar, y resulta ventajosa en el control de los niveles sanguíneos de azúcar. Sin embargo, presenta las desventajas de la repulsión a las agujas de inyección, dificultades en el procedimiento de administración, riesgo de hipoglucemia y ganancia de peso.

Las meglitinidas, un tipo de secretagogos de insulina, son agentes de acción muy corta que se ingieren antes de las comidas, y entre ellas se incluyen NovoNorm (repaglinida), Fastic (nateglinida), Glufast (mitiglinida), y similares. Los sensibilizadores a la insulina se caracterizan porque causan poca hipoglucemia al ingerirlos solos, y entre ellos se incluyen los fármacos de biguanida, tales como metformina, fármacos de tiazolidindiona, tales como Avanida (rosiglitazona) y Actos (pioglitazona) y similares.

Recientemente, se han desarrollado agonistas de GLP-1 utilizando la acción del péptido 1 de tipo glucagón, una hormona que estimula la secreción de la insulina y entre ellos se incluyen exenátide y Victoza (liraglutide). Además, los inhibidores de la dipeptidilpeptidasa 4 (DDP-4) que inhiben la acción de DPP-4, un enzima que inactiva rápidamente GLP-1, son fármacos desarrollados recientemente y están ejemplificados representativamente por Januvia (nombre del ingrediente: sitagliptina).

Sin embargo, se ha informado que dichos fármacos presentan efectos secundarios, tales como hepatotoxicidad, trastornos gastrointestinales, enfermedades cardiovasculares y carcinogenicidad. El coste anual de tratamiento con dichos fármacos también es elevado, convirtiéndolo de esta manera en una barrera al tratamiento de la diabetes. En efecto, los costes sanitarios de la prediabetes y la diabetes fueron de aproximadamente 200 billones de KRW en los EE.UU. en 2007 (Dall *et al.*, 2010) y los costes sanitarios de la obesidad también se han acercado a aproximadamente 150 billones de KRW en EE.UU. en 2008 (Finkelstein *et al.*, 2009). Por lo tanto, hay una necesidad urgente de desarrollo de un fármaco que pueda reducir eficazmente los niveles sanguíneos de azúcar que deben aplicarse en el tratamiento de los pacientes tanto de diabetes como de la diabetes de tipo obeso, presentando simultáneamente pocos efectos secundarios.

El documento nº WO 02/069232 divulga péptidos con potencial actividad de unión a CMH de clase II humana, incluyendo un péptido de 13 aminoácidos de longitud de la Acrp30 (adiponectina) humana, que comprende la secuencia SEC ID nº 2 tal como se define en la presente memoria. Hidetoshi *et al.*, 2006, divulga que un fragmento peptídico de adiponectina humana, que comprende la secuencia SEC ID nº 2 tal como se define en la presente memoria, podría participar en las actividades anti-diabética, anti-aterogénica y/o anti-inflamatoria de la adiponectina. El documento nº WO 03/097689 describe fragmentos peptídicos de OBG3 (adiponectina) con actividad putativa de reducción del peso, incluyendo un péptido que comprende la secuencia SEC ID nº 2 tal como se define en la presente memoria. La patente nº EP3290434 describe péptidos que presentan la secuencia SEC ID nº 2 o la secuencia SEC ID nº 4, tal como se definen en la presente memoria, así como sus propiedades anti-obesidad y anti-diabetes.

Exposición

Problema técnico

Para lo anterior, los presentes inventores recientemente se han centrado en los mecanismos reguladores del metabolismo energético a fin de encontrar un procedimiento mejorado para tratar la obesidad, y han realizado investigación sobre las señales responsables de la acumulación de las grasas y las proteínas que afectan a la acumulación de las grasas con la ingesta de dietas ricas en grasas en el ser humano, partiendo de que el compuesto que debía desarrollarse debería presentar una elevada seguridad (baja toxicidad). Como resultado de la investigación sobre las señales para suprimir la expresión de las proteínas responsables de la acumulación de grasas y para descomponer las grasas ya acumuladas, y sobre las proteínas que participan en la señalización, los presentes inventores han conseguido desarrollar péptidos que estimulan la lipólisis.

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

De acuerdo con lo anterior, un objetivo de la presente exposición, que no es parte de la presente invención, es proporcionar un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

Otro objetivo de la presente exposición, no según la invención reivindicada, es proporcionar un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4, que presenta actividad anti-obesidad o anti-diabética.

Un objetivo adicional de la presente exposición, que no es parte de la presente invención, es proporcionar una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar la obesidad, que comprende uno o más péptidos seleccionados de entre el grupo que consiste en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

Un objetivo todavía adicional de la presente exposición, que no es según la invención reivindicada, es proporcionar una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar la diabetes, que comprende uno o más péptidos seleccionados de entre el grupo que consiste en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

Solución técnica

Como resultado de los esfuerzos para desarrollar varios péptidos excelentes que presenten una actividad biológicamente eficaz, los presentes inventores han completado la presente invención basándose en el resultado de que los péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en la SEC ID nº 1 a la SEC ID nº 7 muestran un efecto antiobesidad mediante la inhibición de la acumulación de grasas con las dietas ricas en grasas y mediante la descomposición de las grasas ya acumuladas, así como efectos profilácticos y/o terapéuticos sobresalientes sobre la diabetes, la diabetes de tipo obeso y las complicaciones diabéticas.

A continuación, en la presente memoria se describe en detalle la presente invención.

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

Un aspecto de la presente exposición, que no es según la invención reivindicada, se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

Otro aspecto de la presente exposición, que no es según la invención reivindicada, se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4, que presenta actividad antiobesidad y/o antidiabética.

Los péptidos pueden modificarse en el extremo N-terminal y/o C-terminal de los mismos con el fin de seleccionar algunas regiones de las secuencias de aminoácidos de los mismos e incrementar la actividad de los mismos. Mediante dichas modificaciones N-terminales y/o C-terminales, la estabilidad de los péptidos puede mejorarse significativamente y, por ejemplo, puede incrementarse la semivida del péptido después de la administración *in vivo*.

La modificación N-terminal puede llevarse a cabo mediante acoplamiento de los péptidos con un grupo protector seleccionado de entre el grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenilmetoxicarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y un polietilenglicol (PEG) en el extremo N-terminal. El grupo protector actúa protegiendo los péptidos frente al ataque de un enzima proteolítico *in vivo*.

La modificación C-terminal puede llevarse a cabo mediante acoplamiento de los péptidos con un grupo hidroxilo (-OH), un grupo amino (-NH₂), un grupo azida (-NHNH₂), o similar, en el extremo C-terminal.

Según un aspecto de la presente exposición, que no es según la invención reivindicada, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4 muestra el efecto de inhibir la acumulación de grasas por las dietas ricas en grasas y de descomponer las grasas ya acumuladas.

El péptido regula negativamente la expresión de los marcadores adipogénicos receptor-gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ), la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y/o la proteína 2 de unión a ácidos grasos específica del tejido adiposo (aP2).

El péptido regula positivamente la expresión de los factores lipolíticos lipasa sensible a fosfohormona (pHSL), proteína quinasa α 1 activada por AMP (AMPK- α 1), gen comparativo de identificación 58 (CGI-58) y/o triglicérido lipasa adiposa (ATGL). El péptido reduce el tamaño de los adipocitos.

Además, el péptido presenta los efectos de incrementar la lipólisis, inhibir la adipogénesis, reducir los niveles sanguíneos de azúcar, reducir el tamaño de los adipocitos y reducir los niveles de colesterol en sangre.

Estos resultados indican que los péptidos presentan una eficacia muy excelente en el tratamiento de la obesidad, la diabetes y la diabetes de tipo obeso.

El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4, corresponde, respectivamente, a la que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3 o SEC ID nº 5, con la excepción de que el residuo Ser se sustituye por el residuo Cys. Los péptidos emparejados correspondientes son prácticamente idénticos en términos de actividades antiobesidad y/o antidiabética.

Otro aspecto de la presente exposición no según la invención reivindicada, se refiere a un complejo peptídico que presenta actividades antiobesidad y/o antidiabética, que comprende dos o más péptidos que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID nº 1 a SEC ID nº 7 (excepto el complejo péptido tal como se define en las reivindicaciones, que es parte de la invención).

El complejo peptídico de la presente invención es, en particular, tal como se define en las reivindicaciones.

El complejo peptídico de la exposición que no es según la invención reivindicada comprende uno o más péptidos que consiste en las secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en la SEC ID nº 2 y

la SEC ID nº 4 (excepto el complejo peptídico tal como se define en las reivindicaciones), y puede comprender además uno o más péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6 y SEC ID nº 7.

5 Por ejemplo, el complejo peptídico de la exposición que no es según la invención reivindicada puede ser una combinación de los péptidos siguientes:

- (a) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1,
- (b) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 3 y
- 10 (c) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6 o SEC ID nº 7.

Además, el complejo peptídico de la exposición que no es según la invención reivindicada puede ser una combinación de los péptidos siguientes:

- 15 (a) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1,
- (b) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4 y
- (c) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6 o SEC ID nº 7.

20 Los complejos peptídicos, así como los péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 1 a SEC ID nº 7, presentan excelentes actividades antiobesidad y/o antidiabética.

Un aspecto adicional de la presente exposición, que no es según la invención reivindicada, se refiere a una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar la obesidad, que comprende uno o más péptidos seleccionados de entre el grupo que consiste en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4 como ingrediente activo.

La composición farmacéutica para los usos según la invención es, en particular, tal como se define en las reivindicaciones.

30 Los péptidos son excelentes en las funciones de inhibir la adipogénesis y descomponer lípidos, siendo capaces de esta manera de utilizarse en la prevención y/o el tratamiento de la obesidad.

La composición farmacéutica para prevenir y/o tratar la obesidad puede comprender además uno o más péptidos seleccionados de entre el grupo que consiste en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6 y SEC ID nº 7.

Un aspecto todavía adicional de la presente exposición, que no es según la invención reivindicada, se refiere a una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar la diabetes, que comprende uno o más péptidos seleccionados de entre el grupo que consiste en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4 como ingrediente activo.

Los péptidos muestran la eficacia de reducir eficazmente los niveles elevados de azúcar en sangre en modelos animales diabéticos, siendo capaces de esta manera de prevenir y/o tratar la diabetes.

La composición farmacéutica para prevenir y/o tratar la diabetes puede comprender además uno o más péptidos seleccionados de entre el grupo que consiste en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6 y SEC ID nº 7.

50 Según ejemplos preferentes de la presente exposición que no es según la invención reivindicada, la composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de la obesidad o la diabetes puede comprender: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz de péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Por ejemplo, los portadores farmacéuticamente aceptables son los utilizados comúnmente en las formulaciones y entre ellos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, lactosa, dextrosa, sucrosa, sorbitol, manitol, almidón, goma acacia, fosfato cálcico, alginato, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceite mineral.

60 Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender, además, aunque sin limitación, un lubricante, un humectante, un edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión y un conservante, además de los ingredientes anteriormente indicados.

65 Por ejemplo, se divulgan en detalle portadores y agentes farmacéuticamente aceptables adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences (19a ed., 1995).

Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse por vía oral o parenteral, preferentemente por vía parenteral. Para la administración parenteral, puede administrarse mediante, aunque sin limitación, inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal, administración tópica, administración transcutánea o similar.

Por ejemplo, la dosis de la composición farmacéutica que debe administrarse puede variar dependiendo de diversos factores, incluyendo la forma de dosificación, el modo de administración, la edad, el peso corporal, el sexo y la condición médica del paciente, la dieta, el tiempo y la vía de administración, la tasa de excreción, la sensibilidad, etc. Por ejemplo, el intervalo de dosis puede estar comprendido, aunque sin limitación, en los intervalos entre 0.0001 y 1,000 µg al día, entre 0.001 y 1000 µg al día, entre 0.01 y 1000 µg al día, entre 0.1 y 1000 µg al día o entre 1.0 y 1000 µg al día.

Por ejemplo, la composición farmacéutica puede formularse en una forma de dosis única o en envases multidosis, utilizando un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, según un procedimiento que pueda ser fácilmente llevado a cabo por el experto en la materia.

Por ejemplo, la formulación puede encontrarse en la forma de una solución, suspensión o emulsión en medio aceitoso o acuoso, o en la forma de un extracto, unos polvos, unos gránulos, una tableta, o una cápsula, y puede comprender además un agente dispersante y/o un estabilizador.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "péptido" se refiere a una molécula lineal formada mediante la unión de residuos aminoácidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Los péptidos de la presente invención pueden prepararse utilizando procedimientos de síntesis química conocidos de la técnica, especialmente técnicas sintéticas de fase sólida (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-54 (1963); y Stewart, *et al.*, Solid Phase Peptide Synthesis, 2a ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111, (1984)) o técnicas sintéticas en fase líquida (patente US nº 5.516.891).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "estabilidad" se refiere a la estabilidad de almacenamiento (por ejemplo, la estabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente), así como a la estabilidad *in vivo*.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para conseguir la eficacia o actividad anteriormente indicada del péptido.

Efectos ventajosos

En la presente memoria se divulga, como un aspecto no según la invención reivindicada, un péptido que presenta eficacia antiobesidad y antidiabética, y una composición para prevenir o tratar la obesidad o la diabetes que lo comprende, y el péptido de la presente invención muestra excelente eficacia en la diabetes y en la diabetes de tipo obeso. La supresión de la señalización de la insulina atribuida a la acumulación de grasa por dietas ricas en grasas o la acumulación de grasas en el hígado o el músculo, y la resistencia inducida a la insulina, causan la diabetes. Por lo tanto, los péptidos según la presente exposición, no según la invención reivindicada, pueden utilizarse para la utilización profiláctica o terapéutica de dicha diabetes y diabetes de tipo obeso.

Descripción de los dibujos

La figura 1a muestra las grasas acumuladas tras el tratamiento con el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2, según análisis mediante tinción con rojo aceite O.

La figura 1b muestra las grasas acumuladas tras el tratamiento con el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4, según análisis mediante tinción con rojo aceite O.

La figura 2a es un gráfico que muestra los resultados de acumulación de grasas tras el tratamiento con diversas concentraciones de complejos peptídicos comparativos según la presente exposición, según análisis mediante tinción con rojo aceite O.

La figura 2b es una fotografía que muestra los resultados de acumulación de grasas tras el tratamiento con diversas concentraciones de complejos peptídicos comparativos según la presente exposición, según análisis mediante tinción con rojo aceite O.

La figura 3a muestra los resultados medidos de los niveles de expresión del gen aP2, que participa en la adipogénesis, tras el tratamiento con el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2.

La figura 3b muestra los resultados medidos de los niveles de expresión del gen aP2, que participa en la adipogénesis, tras el tratamiento con el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4.

La figura 4 muestra los resultados medidos de los niveles de expresión de los genes PPAR γ , ACC y aP2, que desempeñan un papel importante en la adipogénesis, tras el tratamiento con diversas concentraciones de complejos peptídicos comparativos según la presente exposición.

5 La figura 5a muestra los resultados medidos de los niveles de expresión de la proteína PPAR γ , que desempeña un papel importante en la adipogénesis, y la proteína fosfo-HSL, que desempeña un papel importante en la lipólisis, tras el tratamiento con diversas concentraciones de complejos peptídicos comparativos según la presente exposición.

10 La figura 5b es un gráfico que muestra los resultados medidos de los niveles de expresión de la proteína PPAR γ , que desempeña un papel importante en la adipogénesis, tras el tratamiento con diversas concentraciones de complejos peptídicos comparativos según la presente exposición.

15 La figura 5c muestra los resultados medidos de los niveles de expresión de la proteína fosfo-HSL, que desempeña un papel importante en la lipólisis, tras el tratamiento con diversas concentraciones de complejos peptídicos comparativos según la presente exposición.

20 La figura 6a muestra los resultados medidos de los niveles de expresión de los genes AMPK- α 1 y CGI58, que participan en la descomposición de las grasas acumuladas, tras el tratamiento con el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 2.

25 La figura 6b muestra los resultados medidos de los niveles de expresión de los genes AMPK- α 1 y CGI58, que participan en la descomposición de las grasas acumuladas, tras el tratamiento con el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 4.

La figura 6c muestra los resultados medidos de los niveles de expresión de los genes AMPK- α 1 y CGI58, que participan en la descomposición de las grasas acumuladas, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición.

30 La figura 7a muestra una fotografía que muestra los resultados medidos de los niveles de expresión de la proteína ATGL, que participa en la descomposición de las grasas acumuladas, tras el tratamiento con diversas concentraciones de complejos peptídicos comparativos según la presente exposición.

35 La figura 7b muestra una fotografía que muestra los resultados medidos de los niveles de expresión de la proteína ATGL, que participa en la descomposición de las grasas acumuladas, tras el tratamiento con diversas concentraciones de complejos peptídicos comparativos según la presente exposición.

40 La figura 8a muestra los resultados de los niveles de expresión de la proteína fosfo-HSL, que participa en la descomposición de las grasas acumuladas, tras el tratamiento con el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 2, según análisis mediante inmunotinción.

45 La figura 8b muestra los resultados de los niveles de expresión de la proteína fosfo-HSL, que participa en la descomposición de las grasas acumuladas, tras el tratamiento con el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 4, según análisis mediante inmunotinción.

La figura 8c muestra los resultados de los niveles de expresión de la proteína fosfo-HSL, que participa en la descomposición de las grasas acumuladas, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición, según análisis mediante inmunotinción.

50 La figura 9 muestra los resultados medidos de los niveles de glicerol producidos, tras el tratamiento con diversas concentraciones de complejos peptídicos comparativos según la presente exposición.

55 La figura 10a muestra los resultados medidos de los tejidos adiposos descompuestos, tras el tratamiento con diversas concentraciones de complejos peptídicos comparativos según la presente exposición en un modelo experimental de ratones obesos.

La figura 10b muestra los resultados medidos de tamaños y números de los tejidos adiposos descompuestos, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición en un modelo experimental de ratones obesos.

60 La figura 11 muestra los resultados medidos de los niveles de expresión de la proteína fosfo-HSL, que participa en la descomposición de las grasas acumuladas, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición, según análisis mediante inmunotinción.

65 La figura 12 muestra los resultados medidos de cambios en: (a) peso corporal y (b) ingesta alimentaria de los ratones obesos, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición.

La figura 13 muestra los resultados medidos de imágenes de ratones obesos, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición.

5 La figura 14 muestra los resultados medidos de distribución de la grasa, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición en modelos de ratón obeso inducidos por la alimentación con una dieta rica en grasas en un modelo de ratón C57BL/6, que es un modelo animal experimental, según análisis mediante obtención de imágenes de micro-TC.

10 La figura 15 muestra los resultados observados de los tejidos de adipocitos obtenidos, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición en modelos de ratón obeso inducidos por la alimentación con una dieta rica en grasas en un modelo de ratón C57BL/6, que es un modelo animal experimental.

15 La figura 16a muestra los resultados observados de imágenes morfológicas de los adipocitos en tejidos de adipocitos obtenidos, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición en modelos de ratón obeso inducidos por la alimentación con una dieta rica en grasas en un modelo de ratón C57BL/6, que es un modelo animal experimental.

20 La figura 16b muestra los resultados observados de tamaños de los adipocitos en tejidos de adipocitos obtenidos, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición en modelos de ratón obeso inducidos por la alimentación con una dieta rica en grasas en un modelo de ratón C57BL/6, que es un modelo animal experimental.

25 La figura 16c es un gráfico que muestra los resultados observados de tamaños de los adipocitos en tejidos de adipocitos obtenidos, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición en modelos de ratón obeso inducidos por la alimentación con una dieta rica en grasas en un modelo de ratón C57BL/6, que es un modelo animal experimental.

30 La figura 17 muestra los resultados observados de los niveles de expresión de la proteína fosfo-HSL, que participa en la lipólisis, en adipocitos de tejidos de adipocitos obtenidos, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición en modelos de ratón obeso inducidos por la alimentación con una dieta rica en grasas en un modelo de ratón C57BL/6, que es un modelo animal experimental.

35 La figura 18 muestra los resultados medidos de niveles de colesterol en muestras de sangre obtenidas, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición en modelos de ratón obeso inducidos por la alimentación con una dieta rica en grasas en un modelo de ratón C57BL/6, que es un modelo animal experimental.

40 La figura 19 muestra los resultados medidos de niveles de azúcar en sangre en muestras de sangre obtenidas, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición en modelos de ratón obeso inducidos por la alimentación con una dieta rica en grasas en un modelo de ratón C57BL/6, que es un modelo animal experimental.

45 La figura 20 muestra los resultados medidos de cambios en los niveles de azúcar en sangre en muestras de sangre obtenidas, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición en modelos de ratón db/db de diabetes inducida.

50 La figura 21 muestra los resultados medidos de cambios en los niveles de colesterol en muestras de sangre obtenidas, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición en modelos de ratón db/db de diabetes inducida.

55 La figura 22 muestra los resultados medidos de los cambios en los niveles de azúcar en sangre en muestras de sangre obtenidas, tras el tratamiento con el péptido que consistía en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 en modelos de ratón db/db de diabetes inducida.

60 La figura 23 muestra los resultados medidos de los cambios en los niveles de azúcar en sangre en muestras de sangre obtenidas, tras el tratamiento con el péptido que consistía en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4 en modelos de ratón db/db de diabetes inducida.

Las figuras 24a a 24d muestran los resultados medidos de cambios en los niveles de azúcar en sangre en muestras de sangre obtenidas, tras el tratamiento con complejos peptídicos comparativos según la presente exposición en pacientes diabéticos que presentan niveles elevados de azúcar en sangre.

65 Mejor modo

La presente invención se refiere a un complejo peptídico tal como se define en las reivindicaciones.

A continuación, en la presente memoria, la presente invención y exposición se describirán en mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos siguientes, que incluyen ejemplos comparativos. Sin embargo, los ejemplos son únicamente ilustrativos de la presente invención y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la presente invención.

Ejemplos

10 Ejemplo de síntesis 1: síntesis peptídica

Se introdujeron 700 mg de resinas de cloruro de clorotritilo (resinas CTL, Nova Biochem, nº de cat. 01-64-0021) en un reactor y se añadieron a lo anterior 10 ml de cloruro de metileno (CM), seguido de la agitación durante 3 minutos. Tras la extracción de la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF) y se sometió a agitación durante 3 minutos y después se eliminó nuevamente el solvente. En el reactor se vertieron 10 ml de solución de diclorometano, se añadieron a los mismos 200 mmoles de Fmoc-Asn(Trt)-OH (Bachem, Suiza) y 400 mmoles de diisopropiletilamina (DIEA) y se sometieron a agitación para la disolución total y después se llevó a cabo la reacción bajo agitación durante 1 hora. Tras completar la reacción, se llevó a cabo el lavado y se llevó a cabo la reacción con una solución de metanol y DIEA (2:1) en DCM (diclorometano) durante 10 minutos y después se llevó a cabo el lavado con un exceso de DCM/DMF (1:1). Después, se eliminó la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF) y se sometió a agitación durante 3 minutos y después se eliminó nuevamente el solvente. Se vertieron 10 ml de una solución de desprotección (piperidina al 20%/DMF) en el reactor y se sometió a agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se extrajo la solución. Después, se añadió la misma cantidad de solución de desprotección para mantener la reacción durante 10 minutos nuevamente y seguidamente se extrajo la solución. Después, se llevó a cabo el lavado dos veces con DMF, una vez con CM y una vez con DMF durante 3 minutos, respectivamente, proporcionando las resinas de 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 solución en DMF y se disolvieron totalmente mediante agitación. Se añadieron 400 mmoles de fracción de DIEA en dos veces al reactor y después se sometieron a agitación durante por lo menos 5 minutos hasta la disolución completa del sólido. La solución de mezcla de aminoácidos disuelta se vertió en el reactor que contenía las resinas desprotegidas y se dejó que reaccionase durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación. Después de la reacción, se extrajo la solución de reacción mediante agitación de la misma tres veces, cada vez durante 5 minutos con una solución de DMF. Se sacó una pequeña cantidad de la resina reaccionada y se utilizó en una prueba de Kaiser (prueba de nitrógeno) para examinar el grado en que había progresado la reacción. Se llevó a cabo la misma reacción de desprotección que la indicada anteriormente, dos veces, con la solución de desprotección, proporcionando las resinas de Arg-Asn-CTL. Las resinas se lavaron suficientemente con DMF y CM y se sometieron a la prueba de Kaiser nuevamente para llevar a cabo un experimento de unión de aminoácidos, posteriormente, de la manera indicada anteriormente. Según las secuencias de aminoácidos seleccionadas, se llevaron a cabo secuencialmente reacciones en cadena en el orden de Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH y Fmoc-Leu-OH. Se eliminó el grupo protector Fmoc mediante la reacción de la secuencia de aminoácidos reaccionada con una solución de desprotección dos veces, cada vez durante 10 minutos y después se lavó bien. Se añadió anhídrido acético, DIEA y HoBt y se sometieron a acetilación durante 1 hora. Las resinas de peptidilo resultantes se lavaron con DMF, CM y metanol tres veces, respectivamente. Las resinas se secaron bajo un flujo lento de gas nitrógeno y después se secaron al vacío por completo bajo una atmósfera de P₂O₅. Las resinas se hicieron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente con 30 ml de una solución saliente (ácido trifluoroacético 81.5%, agua destilada 5%, tioanisol 5%, fenol 5%, EDT 2.5% y TIS 1%), mientras se sometía intermitentemente a agitación. Las resinas se filtraron y se lavaron con un volumen reducido de solución de TFA, seguido de la agrupación del filtrado con el líquido madre. La destilación se llevó a cabo bajo presión reducida de manera que el volumen total remanente fuese de la mitad, y después se añadieron 50 ml de éter frío para inducir la precipitación. Se recogieron los precipitados mediante centrifugación y se lavaron dos veces con éter frío. El líquido madre se sacó y se secó suficientemente bajo una atmósfera de nitrógeno para proporcionar 0.85 g del péptido no purificado NH₂-Leu-Lys-Thr-Arg-Asn-COOH (SEC ID nº 1) (rendimiento: 92%). Se sintetizaron los péptidos de 0.78 g de NH₂-Lys-Gly-Ala-Cys(Ser)-Thr-Gly-Trp-Met-Ala-COOH (SEC ID nº 2) (rendimiento: 82%), 0.92 g de NH₂-Ala-Cys(Ser)-Tyr-Leu-Pro-His-Pro-Trp-Phe-Cys(Ser)-COOH (SEC ID nº 4 y 5) (rendimiento: 85%) y 0.76 g de NH₂-Cys(Ser)-Asp-Leu-Arg-Arg-Leu-Glu-Met-Tyr-Cys(Ser)-COOH (SEC ID nº 6 y 7) (rendimiento: 88%). Se encontró que los péptidos de SEC ID nº 1, 2 y 4 presentaban pesos moleculares de 630.7 (calculado: 630.7), 924.5 (calculado: 924.1), 1236 (calculado: 1236.5) y 1301.5 (calculado: 1301.5), respectivamente, según mediciones mediante espectrometría de masas.

[Tabla 1]

SEC ID nº	Secuencia de aminoácidos	Análisis (espectrometría de masas)	
		Medido	Calculado
1	LKTRN	630.7	630.7
2	KGACTGWMA	924.5	924.1 (908.0)
3	KGASTGWMA		
4	ACYLPHPWFC		
5	ASYLPHPWFS	1236	1236.5 (1269.4)
6	CDLRRLEMYC	1301.5	1301.5
7	SDLRRLEMYS		

5 Por otra parte, cada péptido que consistía en las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1, SEC ID nº 3 y SEC ID nº 7 se mezcló en cantidades iguales para preparar un complejo peptídico y se evaluó su eficacia.

Ejemplo comparativo 1: ensayo de la actividad inhibidora de la adipogénesis

10 1-1. Inhibición de la acumulación de grasas utilizando preadipocitos (tinción de rojo aceite O)

Se incubaron las células preadipocitos 3T3-L1 hasta la confluencia y después se incubaron durante dos días después del tratamiento 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. Después, se intercambió el medio cada dos días por un medio que contenía 10 µg/ml de insulina. Tras inducir la diferenciación durante 10 días, se confirmó la generación de gotas en las células mediante tinción con rojo aceite O.

15 Los preadipocitos 3T3-L1 preparados se lavaron con PBS, se fijaron con formalina al 3.7% durante 1 hora, se lavaron con isopropanol al 60% y después se tizaron con solución de rojo aceite O a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras completar la tinción, se eliminó la solución de rojo aceite O, se lavaron las células tres veces con agua destilada y después se observaron las células teñidas con un microscopio con contraste de fase. Se muestran los resultados en las figuras 1a y 1b. Para el análisis cuantitativo, se extrajeron las grasas de las células utilizando isopropanol al 100% y las células se transfirieron en una cantidad de 200 µl/pocillo a placas de 96 pocillos y se midió la densidad óptica a 500 nm utilizando un lector ELISA. Se muestran los resultados en la figura 2.

20 Tal como se muestra en las figuras 1a y 1b, se confirmó que el grado de acumulación de grasas en las células se había reducido tras el tratamiento con el péptido que consistía en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4, según análisis mediante tinción con rojo aceite O.

25 Tal como se muestra en la figura 2, se confirmó que el grado de acumulación de grasas en las células también se había reducido tras el tratamiento con diversas concentraciones de los complejos peptídicos.

30 1-2. Supresión de la expresión de genes que participan en la adipogénesis

35 Se sembraron células 3T3-L1 (preadipocitos) a una densidad de 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Tras la incubación durante 24 horas, las células se incubaron durante 14 días en un incubador a 37°C tras el tratamiento con diversas concentraciones (0.1, 1 y 10 µg/ml) de los péptidos. Después, se recolectaron las células y se trataron con una solución de extracción de ARN (Easy Blue, Intron) a fin de preparar el ARN a partir del que a continuación se sintetizó el ADNc utilizando una premezcla de RT (Intron). Se llevó a cabo la PCR utilizando los cebadores para los marcadores adipogénicos (PPAR γ , ACC y aP2) y una premezcla de PCR (Intron). A continuación, se cargó cada uno de los productos de PCR en una cantidad de 5 µl en un gel de agarosa al 1% y se llevó a cabo la electroforesis y después se identificaron las bandas en un Gel-Doc. Se muestran los resultados en las figuras 3a y 3b.

40 Las secuencias de cebador específico de diana para la PCR de los marcadores adipogénicos son las siguientes:

45

[Tabla 2]

SEC ID nº	Cebador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de hibridación (°C)
8	PPAR γ _F	TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC	60
9	PPAR γ _R	AATCCTTGCCCTCTGAGAT	60
10	ACC_F	ACCTTACTGCCATCCCATGTGCT A	60

SEC ID nº	Cebador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de hibridación (°C)
11	ACC_R	GTGCCTGATGATCGCACGAACAA A	60
12	aP2_F	CATCAGCGTAAATGGGGATT	60
13	aP2_R	ACACATTCCACCACCAGCTT	60

Tal como se muestra en las figuras 3a y 3b, se observó que en la línea celular de osteoblastos de ratón 3T3-L1, que se incubó durante tres días después del tratamiento con el péptido que consistía en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4, los niveles de expresión del marcador adipogénico aP2 se habían reducido.

Tal como se muestra en la figura 4, se observó que, al incubar la línea celular de osteoblastos de ratón 3T3-L1, durante tres días después del tratamiento con los complejos peptídicos a una concentración de 0.1 µg/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml, los niveles de expresión de los marcadores adipogénicos PPAR γ , ACC y aP2 también se encontraban reducidos tanto en el grupo de control positivo tratado con 100 ng/ml de TNF α como el grupo tratado con complejo peptídico.

1-3. Observación de los niveles de expresión de proteínas inductoras de adipogénesis y lipólisis utilizando preadipocitos.

Se sembraron células 3T3-L1 (preadipocitos) a una densidad de 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Tras la incubación durante 24 horas, las células se incubaron durante 14 días en un incubador a 37°C tras el tratamiento con diversas concentraciones (0.1, 1 y 10 µg/ml) de los complejos peptídicos. Los lisados celulares obtenidos mediante tratamiento con un tampón de lisis celular se utilizaron para la cuantificación de las proteínas, y después se llevó a cabo una transferencia western utilizando un anticuerpo anti-PPAR γ (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), que es un anticuerpo contra un marcador adipogénico y un anticuerpo anti-pHSL (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), que es un anticuerpo contra un factor lipolítico.

Tal como se muestra en la figura 5, se observó que los niveles de expresión de la proteína PPAR γ marcadora adipogénica tras el tratamiento con diversas concentraciones de los complejos peptídicos se reducían en todos los casos de manera dependiente de la dosis y los niveles de expresión de la proteína pHSL factor lipolítico se reducían en todos los casos en el grupo tratado con complejo peptídico.

Ejemplo comparativo 2: ensayo de actividad lipolítica.

2-1. Niveles de expresión incrementados de genes participantes en la lipólisis.

Se sembraron células 3T3-L1 (preadipocitos) a una densidad de 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Tras la incubación durante 24 horas, las células se incubaron durante 14 días en un incubador a 37°C tras el tratamiento con diversas concentraciones (0.1, 1 y 10 µg/ml) de los péptidos (grupo de control positivo: 100 ng/ml de TNF α (SIGMA)). Después, se recolectaron las células y se trataron con una solución de extracción de ARN (Easy Blue, Intron) a fin de preparar el ARN a partir del que a continuación se sintetizó el ADNc utilizando una premezcla de RT (Intron). Se llevó a cabo la PCR utilizando cebadores para los marcadores (AMPK- α 1, CGI58) y una premezcla de PCR (Intron). A continuación, se cargó cada uno de los productos de PCR en una cantidad de 5 µl en un gel de agarosa al 1% y se llevó a cabo la electroforesis y después se identificaron las bandas en un Gel-Doc. Se muestran los resultados en la figura 6.

Las secuencias de cebador específico de diana para la PCR de los marcadores adipogénicos son las siguientes:

[Tabla 3]

SEC ID nº	Cebador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de hibridación (°C)
14	AMPK-1_F	TGACCGGACATAAAGTGGCTGTGA	60
15	AMPK-1_R	TGATGATGTGAGGGTGCCTGAACA	60
16	CGI58_F	TGTGCAGGACTCTTACTTGGCAGT	60
17	CGI58_R	GTTTCTTTGGGCAGACCGGTTTCT	60

Tal como se muestra en las figuras 6a y 6b, se observó que en los preadipocitos (3T3-L1), que se incubaron tras el tratamiento con los péptidos, los niveles de expresión del marcador adipogénico de los factores lipolíticos AMPK- α 1 y CGI-58 se encontraban incrementados en todos los tratados con péptidos

Tal como se muestra en la figura 6c, se observó que los niveles de expresión AMPK- α 1 y CGI-58 tras el tratamiento

con los complejos peptídicos se encontraban incrementados de manera dependiente de la dosis, y los niveles de expresión de los factores lipolíticos eran más altos que en el grupo de control positivo tratado con 100 ng/ml de TNF α .

5 2-2. Observación de los niveles de expresión de proteínas inductoras de lipólisis utilizando preadipocitos.

Se sembraron células 3T3-L1 (preadipocitos) a una densidad de 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Tras la incubación durante 24 horas, las células se incubaron durante 14 días en un incubador a 37°C tras el tratamiento con diversas concentraciones (0.1, 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$) de los complejos peptídicos (grupo de control positivo: 100 ng/ml de TNF α (SIGMA)). Los lisados celulares obtenidos mediante tratamiento con un tampón de lisis celular se utilizaron para la cuantificación de las proteínas, y después se llevó a cabo una transferencia western utilizando un anticuerpo anti-ATGL (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), que es un anticuerpo contra un factor lipolítico.

15 Tal como se muestra en la figura 7, se confirmó que los niveles de expresión del factor lipolítico ATGL resultaron incrementados por el tratamiento con los complejos peptídicos.

2-3. Observación de microscopía de fluorescencia de los niveles de expresión de proteínas inductoras de lipólisis utilizando preadipocitos.

20 Se sembraron células 3T3-L1 (preadipocitos) a una densidad de 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Tras la incubación durante 24 horas, las células se incubaron durante 14 días en un incubador a 37°C tras el tratamiento con cada péptido o complejo peptídico (1 $\mu\text{g/ml}$) (grupo de control positivo: 100 ng/ml de TNF α (SIGMA)). Seguidamente, las células se fijaron con etanol al 70% y después se sometieron a inmunotinción con un anticuerpo anti-fosfo-HSL (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) para observar los niveles de expresión celular de fosfo-HSL, un factor lipolítico.

30 Tal como se muestra en las figuras 8a a 8c, se confirmó que los niveles de expresión del factor lipolítico fosfo-HSL tras el tratamiento con cada péptido (véanse las figuras 8a y 8b) y complejo peptídico (véase la figura 8c) se encontraban incrementados.

2-4. Cuantificación del producto de lipólisis glicerol.

35 Se extrajeron tejidos adiposos de los abdómenes de ratones con obesidad inducida y se sembraron en una cantidad de 100 mg/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos y después se incubaron en un medio de cultivo (1 ml de tampón de Krebs-Ringer que contenía HEPES 25 mM, glucosa 5.5 mM y albúmina de suero bovino al 2% (p/v)). En el tiempo de la incubación, los tejidos se incubaron durante 48 horas después del tratamiento con 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ de los complejos peptídicos y 100 ng/ml de TNF α como control positivo. Se midió cuantitativamente el glicerol producido durante la lipólisis.

40 Tal como se muestra en la figura 9, se confirmó que la cantidad de glicerol resultante de la lipólisis tras el tratamiento con diversas concentraciones de complejos peptídicos se incrementaba de manera dependiente de la dosis. Se confirmó que la cantidad de glicerol también era superior que la resultante del grupo de control positivo tratado con TNF α .

45 2-5. Efecto lipolítico sobre los tejidos adiposos aislados a partir de ratones obesos.

50 Se clasificaron los tejidos adiposos en grasa blanca y grasa marrón dependiendo del color y se clasificaron en grasa subcutánea, grasa abdominal, grasa mesentérica (grasa visceral) y grasa epididimal según el sitio. Tras la disección, se extrajo cada grasa para aislar las grasas blancas. Las grasas blancas se introdujeron en una cantidad de 100 mg/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos y después se incubaron durante 72 horas en un medio de cultivo (1 ml de tampón de Krebs-Ringer que contenía HEPES 25 mM, glucosa 5.5 mM y albúmina de suero bovino al 2% (p/v)) tras el tratamiento con diversas concentraciones de los complejos peptídicos. Las grasas se cortaron en secciones y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se compararon las dimensiones de los adipocitos bajo un microscopio (TS100, Nikon) a un aumento de 200x.

55 Tal como se muestra en la figura 10a, se confirmó que las grasas tras el tratamiento con diversas concentraciones de los complejos peptídicos se habían reducido de tamaño en comparación con el grupo de control.

60 Tal como se muestra en la figura 10b, se observó que, como resultado de la medición del tamaño de los adipocitos con el programa después de la tinción, el tamaño de las células en los tejidos adiposos con compartimientos de membrana celular bien distintos se había reducido en el grupo tratado con complejo peptídico.

2-6. Observación de factor lipolítico en tejidos adiposos.

65 Se extrajeron tejidos adiposos de los abdómenes de ratones con obesidad inducida y se sembraron en una cantidad de 100 mg/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos y después se incubaron en un medio de cultivo (1 ml

de tampón de Krebs-Ringer que contenía HEPES 25 mM, glucosa 5.5 mM y albúmina de suero bovino al 2% (p/v)). En el tiempo de la incubación, los tejidos se incubaron durante 48 horas después del tratamiento con los complejos peptídicos y 100 ng/ml de TNF α como control positivo. Se confirmó la expresión del factor lipolítico fosfo-HSL marcado (sustancia fluorescente verde).

5 Tal como se muestra en la figura 11, se confirmó que los niveles de expresión del factor lipolítico fosfo-HSL en tejidos adiposos se habían incrementado tras el tratamiento con el complejo peptídico.

10 Ejemplo comparativo 3: efecto supresor de la adipogénesis y estimulador de la lipólisis en animales experimentales.

15 Los modelos de obesidad inducida OID (obesidad inducida por la dieta), que se han convertido en obesos por la alimentación con dietas ricas en grasas de ratones C57BL/6 normales, se utilizaron para el experimento antiobesidad en el que se utilizaron 5 μ g/ml de TNF α como fármaco de control positivo. Como control, se utilizó la alimentación con una dieta general, no una dieta rica en grasas. En dicho experimento, se alimentaron con una dieta rica en grasas durante 12 semanas, mientras se aplicaban los complejos peptídicos o el fármaco de control positivo. Durante el experimento, se confirmó la pérdida de peso.

20 TNF α y los compuestos activos antiobesidad se inyectaron por vía intraperitoneal a las 15:00-16:00 cada semana durante 12 semanas. Se midieron los pesos corporales y las cantidades dietéticas inmediatamente antes de la inyección del primer fármaco y después se midieron a intervalos semanales.

25 Se recogieron las muestras de sangre de la vena de la cola después del final del experimento de inyección de fármaco y después se midieron los niveles de azúcar en sangre utilizando Accu-Check Active (Roche) y se analizaron los niveles de colesterol utilizando el kit de cálculo de Colesterol (BioVision).

30 Se clasificaron los tejidos adiposos en grasa blanca y grasa marrón dependiendo del color y se clasificaron en grasa subcutánea, grasa abdominal, grasa mesentérica (grasa visceral) y grasa epididimal según el sitio. Tras la disección, se extrajo cada grasa. Para el examen histológico, las grasas se fijaron con formalina tamponada neutra al 10%, se incluyeron en bloques de parafina, se cortaron en secciones de 5 μ m de grosor y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

35 Para analizar el grado de fosforilación del factor lipolítico HSL, se llevó a cabo la tinción fluorescente utilizando un anticuerpo anti-pHSL. Se prepararon las muestras de tejido, se montaron en medio de montaje de gelatina de glicerina y se cubrieron con un cubreobjetos. Se obtuvieron imágenes de los tejidos con una cámara digital incorporada en un microscopio (Nikon, TS100) y se observaron las imágenes bajo el microscopio.

40 Se confirmó que se había producido la ganancia de peso corporal de los ratones de 20.9 g a 28.74 g al alimentarlos con una dieta general y de 20.99 g a 49.5 g al alimentarlos con una dieta rica en grasas, durante 12 semanas desde el inicio del experimento hasta el final del experimento. Sin embargo, se confirmó que se había producido una ganancia de peso tanto del grupo alimentado con dieta rica en grasas como del grupo tratado con complejo peptídico, de 21.1 g a 36.76 g durante 12 semanas de inicio a fin del experimento, indicando una reducción significativa de la ganancia de peso (174.2%) en comparación con el grupo de control alimentado con la dieta rica en grasas (235.8%) (véanse las tablas 4 y 5 y la figura 12). Las tablas 4 y 5 muestran los resultados medidos de peso corporal en gramos (g) y el porcentaje (%) tras el tratamiento con complejos peptídicos en modelos de ratón obeso.

[Tabla 4]

Semana	Dieta general (control)	Dieta rica en grasas (control)	R.G.+C/P	R.G.+Complejo P.
0	20.09	20.99	22.41	21.10
1	20.75	22.32	23.00	21.26
2	21.99	25.25	26.12	23.72
3	18.23	27.35	27.45	24.36
4	23.26	30.20	30.51	25.29
5	23.16	32.76	32.76	28.65
6	23.28	36.78	33.49	28.79
7	24.71	38.31	35.14	30.37
8	25.84	40.12	37.15	31.53
9	25.59	42.14	38.97	32.59
10	28.13	43.02	40.39	33.78
11	27.90	45.70	41.35	35.33
12	28.74	49.50	43.91	36.76

50

[Tabla 5]

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

5 Tal como se muestra en la figura 13, se observó que, tras completar el experimento de 12 semanas, los tamaños corporales del grupo tratado con complejo peptídico se habían mantenido en niveles similares a los de ratones normales (dieta general) en comparación con los del grupo alimentado con dieta rica en grasas, según el análisis de las fotografías.

[Tabla 6]

10

	Volumen total (mm ³)	Grasas totales (mm ³)	Grasas viscerales (mm ³)	Grasa subcutánea (mm ³)
Control (dieta general)	4958.25	702.72	380.09	322.63
DRG (2 semanas)	6530.09	2084.98	1411.14	673.84
DRG (10 semanas)	12464.91	8014.03	5821.27	2192.76
DRG (10 semanas) + complejo (8 semanas)	6012.12	1391.75	871.15	520.60
DRG (10 semanas) + C.P. (8 semanas)	8240.67	4165.80	2833.72	1332.08

15 Tal como se muestra en la figura 14 y la tabla 6, se confirmó que, como resultado del examen de la grasa (amarilla) distribuida en todo el cuerpo del ratón mediante la obtención de imágenes de micro-TC tras 12 semanas de experimento, la cantidad de grasas distribuidas en todo el cuerpo en los ratones del grupo de control alimentado con una dieta rica en grasas se había incrementado notablemente en comparación con la del grupo de control alimentado con dieta general, mientras que la cantidad de grasas distribuida en todo el cuerpo tanto en el grupo alimentado con complejo peptídico como el grupo alimentado con dietas ricas en grasas se había reducido notablemente.

20 Tal como se muestra en la figura 15, se confirmó que, como resultado de la comparación de los volúmenes de tejido adiposo después de que los ratones hubiesen completado la obtención de imágenes de micro-TC, se diseccionaron para extraer los tejidos adiposos distribuidos en todo el cuerpo, la cantidad de grasas en los ratones del grupo de control alimentado con dieta rica en grasas era superior a la del grupo de control alimentado con dieta general, mientras que la cantidad de grasas tanto en el grupo alimentado con dieta rica en grasas como el grupo alimentado con complejo peptídico se había reducido notablemente.

25 Tal como se muestra en la figura 16a, se confirmó que, como resultado de la visualización de los tamaños de las grasas después del aislamiento de las mismas y la tinción con H+E, el tamaño de las grasas de tanto el grupo alimentado con dieta rica en grasas como del grupo alimentado con complejo peptídico, era inferior al del grupo de control alimentado con dieta rica en grasas.

30 Tal como se muestra en las figuras 16b y 16c, se confirmó que, como resultado del análisis del tamaño de las grasas utilizando el programa, al considerar que el tamaño de las grasas del grupo de control alimentado con la dieta general era de 100%, el tamaño de las grasas del grupo alimentado con dieta rica en grasas se había incrementado a 127%, mientras que el tamaño de las grasas del grupo alimentado con dieta rica en grasas y del grupo alimentado con complejo peptídico se había reducido a 97%.

35 Tal como se muestra en la figura 17, se confirmó que, como resultado de la medición de los niveles de expresión del factor lipolítico fosfo-HSL, expresado en tejidos adiposos después del aislamiento de las grasas, los niveles de expresión de fosfo-HSL en el grupo alimentado con dieta rica en grasas y complejo peptídico se habían

40

incrementado.

5 Tal como se muestra en la figura 18, se confirmó que, como resultado de la medición de los niveles de colesterol en sangre en los ratones tras completar el experimento, los niveles de colesterol en sangre eran de 2.52 µg/ml en el grupo alimentado con dieta general, de 3.5 µg/ml en el grupo alimentado con dieta rica en grasas y de 2.86 µg/ml en el grupo alimentado con dieta rica en grasas y complejo peptídico. Lo anterior indica que el complejo peptídico redujo los niveles de colesterol que estaban elevados por la obesidad.

10 Tal como se muestra en la figura 19, se confirmó que, como resultado de la medición de los niveles de azúcar en sangre tras completar el experimento, los niveles de azúcar en sangre eran de 174 mg/dl en el grupo alimentado con dieta general, y se incrementaron a 235 mg/dl en el grupo alimentado con dieta rica en grasas, mientras que los niveles de azúcar en sangre eran de 183 mg/dl en el grupo alimentado con dieta rica en grasas y complejo peptídico y se habían reducido de manera similar a los del grupo alimentado con dieta general.

15 **Ejemplo comparativo 4: control de los niveles de azúcar en sangre.**

En el presente experimento animal, se utilizaron ratones C57BL/6 macho (ratón normal) (adquiridos de Samtako Bio Korea, Co., Ltd.) y C57BLKS/JLepr (ratón de modelo de diabetes, ratón db/db) (adquirido de Central Lab. Animal Inc.), junto con el complejo peptídico como material antidiabético y/o antiobesidad, y sitagliptina como fármaco de control positivo.

25 En el presente ejemplo, el complejo activo antidiabetes y/o antiobesidad se evaluó para eficacia antidiabética aguda (administración única) en un modelo de ratón normal y en un modelo potencialmente diabético genéticamente, utilizando la PTG (prueba de tolerancia a la glucosa), que es un procedimiento diagnóstico representativo para la diabetes.

30 Las condiciones ambientales de alojamiento de los ratones se mantuvieron a una temperatura de 22-24°C y una humedad relativa de 50-30%, con cuatro animales por jaula. Además, se mantuvieron las condiciones ambientales a una iluminancia de entre 150 y 300 Lux entre las 8:00 y las 20:00, y 12 horas de iluminación y 12 horas de oscuridad al día. Se dejó libre acceso a los ratones a una dieta general (18% de proteínas, fabricada en 2018, Harlan Laboratories Inc., EE.UU.). Los ratones se sometieron a ayuno durante 4 horas o más antes del experimento ITT y durante 12 horas o más antes del experimento GTT. Las formulaciones de complejo se administraron por vía oral forzosamente con ayuda de una jeringa desechable de administración oral una hora antes del experimento GTT. Para el experimento GTT, se dejó libre acceso a los ratones a una dieta rica en grasas en la hora 0 (cero) del experimento. 35 Tras 40 minutos de acceso libre a una dieta rica en grasas, se recogieron muestras de sangre de la vena de la cola a intervalos de 0, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos para examinar los niveles de glucosa en sangre. Se midieron las muestras de sangre para los niveles de glucosa en sangre utilizando Accu-Check active (Roche). Por otra parte, se seleccionó la sitagliptina, utilizada como agente terapéutico para la diabetes, como un fármaco de control positivo y se administró a una dosis de 100 mg/kg. Las formulaciones de complejo seleccionadas como candidatos activos antidiabetes y/o antiobesidad se dividieron en dosis de 100 mg/kg para los grupos experimentales, y se utilizaron cuatro ratones en cada grupo experimental.

45 Tal como se muestra en la figura 20, se observó que los niveles elevados de azúcar en sangre con la dieta rica en grasas se reducían después del tratamiento con el complejo peptídico. En los modelos de ratón de diabetes inducida, se redujeron los niveles elevados de azúcar en sangre en la diabetes.

50 Tal como se muestra en la figura 21, se confirmó que los niveles sanguíneos de colesterol tanto en el grupo alimentado con dieta rica en grasas como en el grupo alimentado con complejo peptídico eran inferiores a los observados en el grupo de control alimentado con dieta rica en grasas.

Además, tras un ayuno de 16 horas, los ratones DB/DB con diabetes inducida fueron alimentados durante 30 minutos y después se les administraron los péptidos. Se midieron los niveles de azúcar en sangre en diferentes tiempos y se muestran los resultados en las figuras 22 y 23 y en las tablas 7 y 8.

55 [Tabla 7]

	Normal	Diabetes, rica en grasas	
		PBS	SEC ID nº 2
Ayuno	105	78	181
30 minutos	184	227	219
60 minutos	181	250	231
120 minutos	147	301	174
240 minutos	151	247	158
300 minutos	135	200	152

[Tabla 8]

	Normal	Diabetes, rica en grasas	
		PBS	SEC ID nº 4
Ayuno	115	218	222
30 minutos	159	251	249
60 minutos	125	255	229
120 minutos	121	366	215
240 minutos	112	312	180
300 minutos	119	253	165

5 Tal como se muestra en las figuras 22 y 23 y en las tablas 7 y 8, se observó que los niveles de azúcar en sangre en los grupos tratados con el péptido que consistía en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4 se habían reducido de manera dependiente del tiempo.

Ejemplo comparativo 5: observación del efecto de reducción del nivel de azúcar en sangre mediante un experimento clínico.

10 Se llevó a cabo un breve ensayo clínico con sujetos de entre 45 y 65 años de edad con un nivel de azúcar en sangre en ayunas de 170 mg/dl o superior. Recibieron una formulación de complejo 30 minutos después de las comidas. Se recogieron muestras de sangre de los sujetos a intervalos de 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos y después se midieron los niveles sanguíneos de azúcar utilizando Accu-Chek active (Roche). Se muestran los resultados en las figuras 24a y 24b.

15 Tal como se muestra en las figuras 24a a 24d, se observó que los niveles de azúcar en sangre por la formulación de complejo se habían reducido en todos los sujetos de ensayo.

20 Disponibilidad industrial

La presente invención se refiere a un complejo peptídico que presenta eficacia antiobesidad y antidiabética y a la utilización del mismo, tal como se define en las reivindicaciones.

25 <110> CAREGEN CO., LTD.

<120> Péptidos que tienen efectos antiobesidad y antidiabetes y uso de los mismos

30 <130> PP170021

<160> 17

<170> KopatentIn 2.0

35 <210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Péptido 1

<400> 1

Leu Lys Thr Arg Asn

1 5

45 <210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Péptido 2

<400> 2

Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala

1 5

55

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido 3
 <400> 3
 Lys Gly Ala Ser Thr Gly Trp Met Ala
 10 1 5
 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido 4
 20 <400> 4
 Ala Cys Tyr Leu Pro His Pro Trp Phe Cys
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido 5
 30 <400> 5
 Ala Ser Tyr Leu Pro His Pro Trp Phe Ser
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido 6
 40 <400> 6
 Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys
 1 5 10
 45 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Péptido 7
 <400> 7
 Ser Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Ser
 1 5 10
 55 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 60

ES 2 901 416 T3

<220>
<223> PPARgamma F

<400> 8
5 tttcaaggg tgccagttc 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> PPARgamma R

<400> 9
15 aatccttggc cctctgagat 20

<210> 10
<211> 24
20 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ACC F

<400> 10
25 accttactgc catcccatgt gcta 24

<210> 11
30 <211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ACC R

<400> 11
35 gtgcctgatg atgcacgaa caaa 24

<210> 12
40 <211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> aP2 F

<400> 12
50 catcagcgta aatggggatt 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> aP2 R

<400> 13
60 acacattcca ccaccagctt 20

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 901 416 T3

<220>

<223> AMPK-a1 F

<400> 14

5 tgaccggaca taaagtggt gtga 24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> AMPK-a1 R

<400> 15

15 tgatgatgtg aggtgcctg aaca 24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CGI58 F

<400> 16

25 tgtgcaggac tcttacttg cagt 24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CGI58 R

<400> 17

35 gtttcttgg gcagaccgt ttct 24

REIVINDICACIONES

- 5 1. Complejo peptídico que comprende: (i) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 y (ii) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4.
2. Complejo peptídico según la reivindicación 1, en el que el complejo peptídico presenta actividad antiobesidad o antidiabética.
- 10 3. Complejo peptídico según la reivindicación 1, en el que el péptido se acopla con un grupo protector seleccionado de entre el grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenilmetoxicarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y un polietilenglicol (PEG) en el extremo N-terminal.
- 15 4. Complejo peptídico según la reivindicación 1, en el que el péptido se acopla con un grupo hidroxilo (-OH), un grupo amino (-NH₂), o un grupo azida (-NHNH₂) en el extremo C-terminal.
- 20 5. Complejo peptídico según la reivindicación 2, en el que el complejo peptídico regula negativamente la expresión de uno o más marcadores adipogénicos seleccionados de entre el grupo que consiste en receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR γ), acetil-CoA carboxilasa (ACC) y proteína 2 de unión a ácidos grasos específica del tejido adiposo (aP2).
- 25 6. Complejo peptídico según la reivindicación 1, en el que el complejo peptídico regula positivamente la expresión de uno o más factores lipolíticos seleccionados de entre el grupo que consiste en lipasa sensible a hormona fosforilada (pHSL), proteína quinasa α 1 activada por AMP (AMPK- α 1), gen comparativo de identificación 58 (CGI-58) y/o triglicérido lipasa adiposa (ATGL).
- 30 7. Complejo peptídico según la reivindicación 1, en el que el péptido incrementa la lipólisis.
8. Complejo peptídico según la reivindicación 1, en el que el péptido inhibe la adipogénesis.
9. Complejo peptídico según la reivindicación 1, en el que el péptido reduce los niveles de azúcar en sangre.
10. Complejo peptídico según la reivindicación 1, en el que el péptido reduce el tamaño de los adipocitos.
- 35 11. Complejo peptídico según la reivindicación 1, en el que el péptido reduce los niveles de colesterol en sangre.
- 40 12. Composición farmacéutica para la utilización en la prevención o el tratamiento de la obesidad, que comprende un complejo peptídico que comprende: (i) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 y (ii) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4 como ingrediente activo.
- 45 13. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 12, que comprender además uno o más péptidos seleccionados de entre el grupo que consiste en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6 y SEC ID nº 7.
- 50 14. Composición farmacéutica para la utilización en la prevención o el tratamiento de la diabetes, que comprende un complejo peptídico que comprende: (i) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 y (ii) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4 como ingrediente activo.
15. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 14, que comprender además uno o más péptidos seleccionados de entre el grupo que consiste en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6 y SEC ID nº 7.

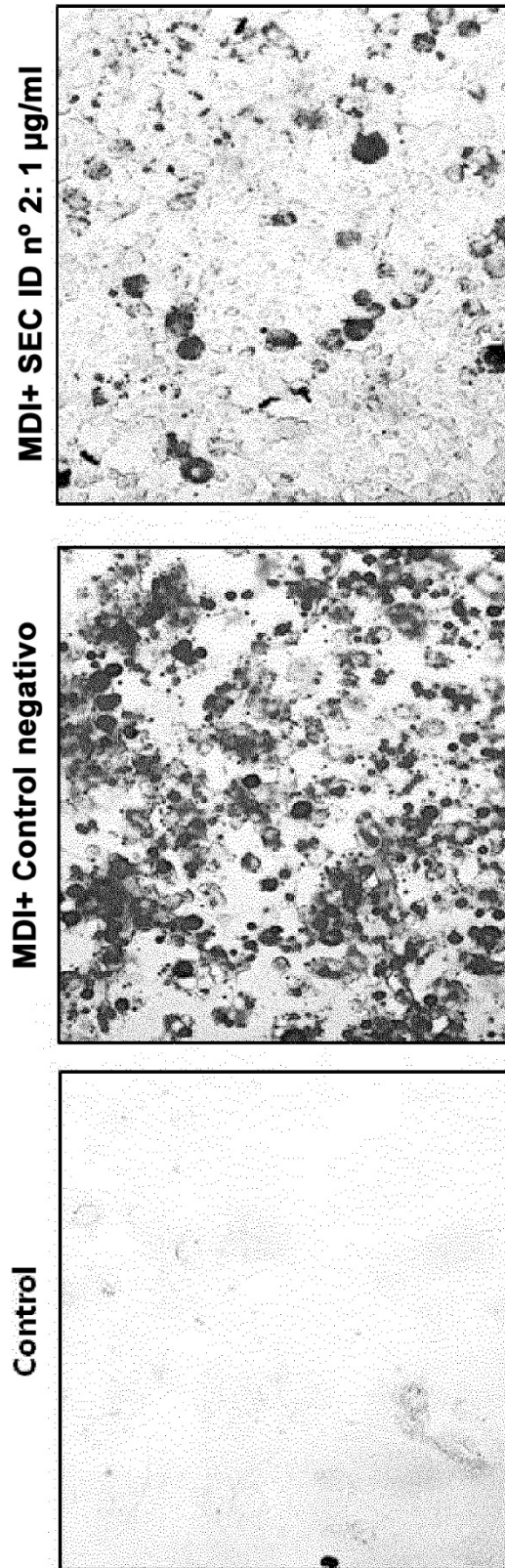


FIG. 1A

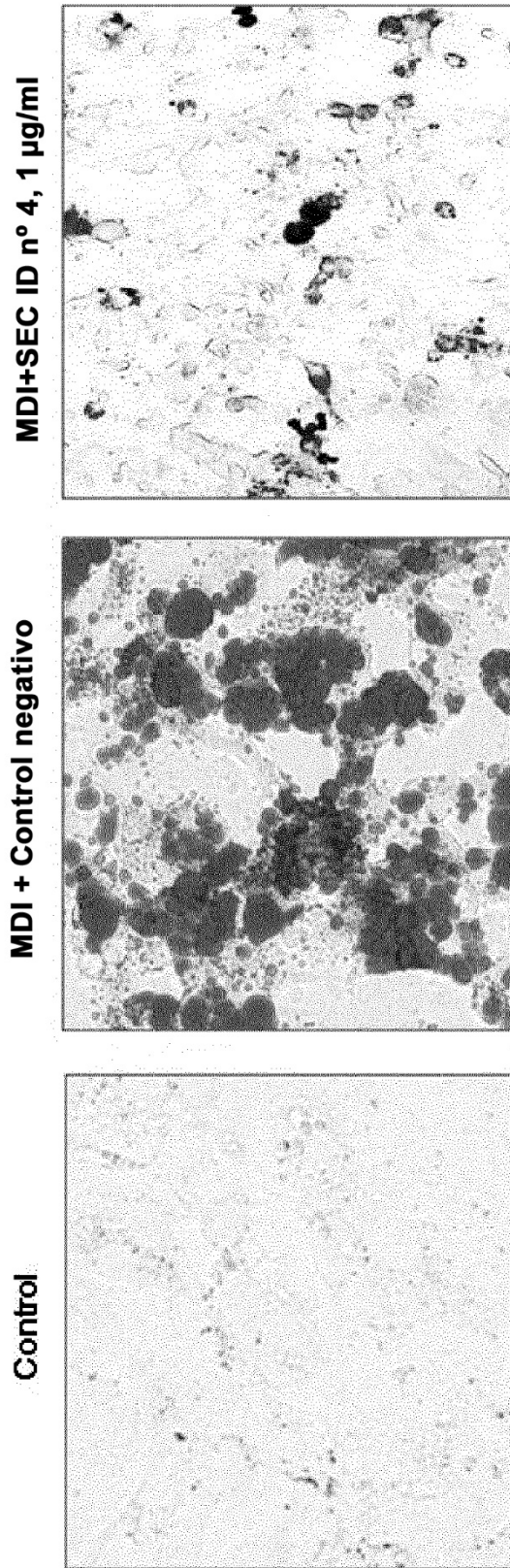


FIG. 1B

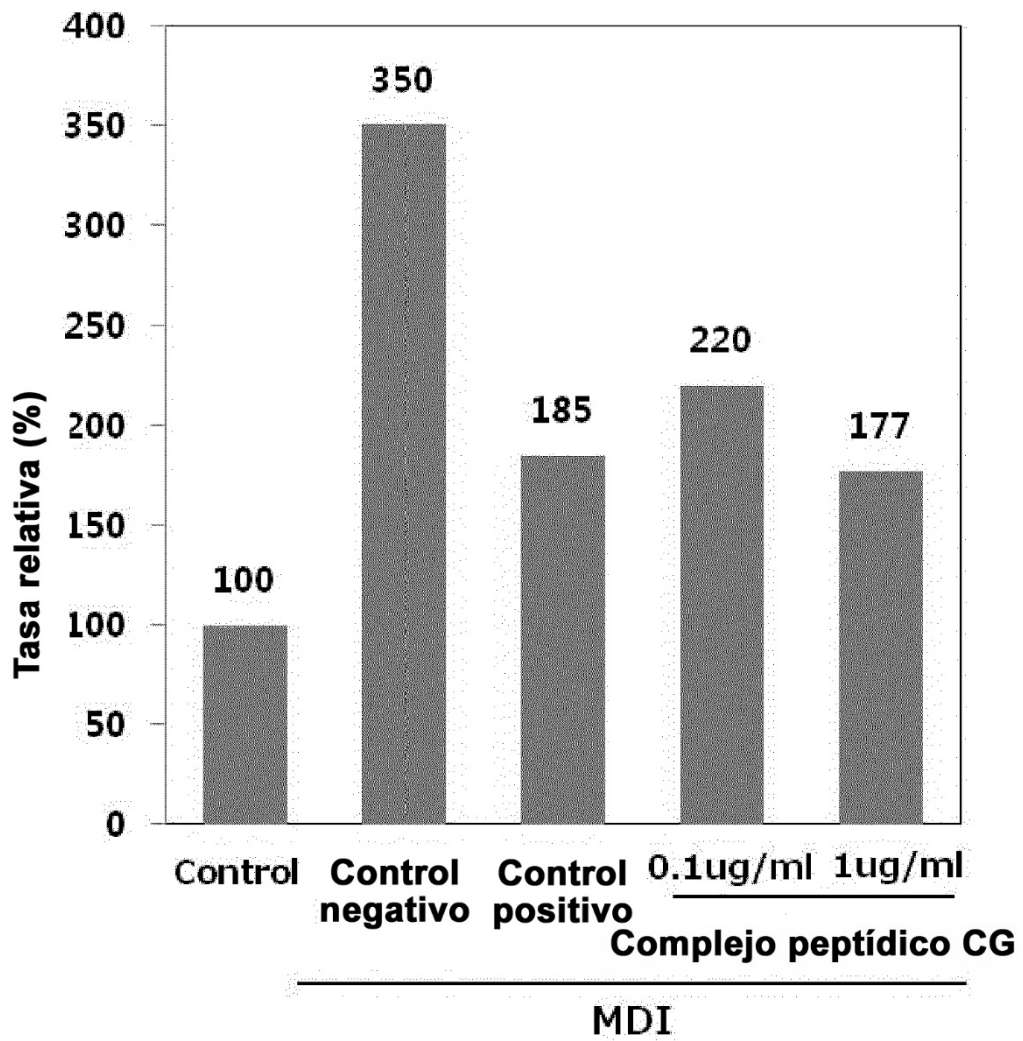


FIG. 2A

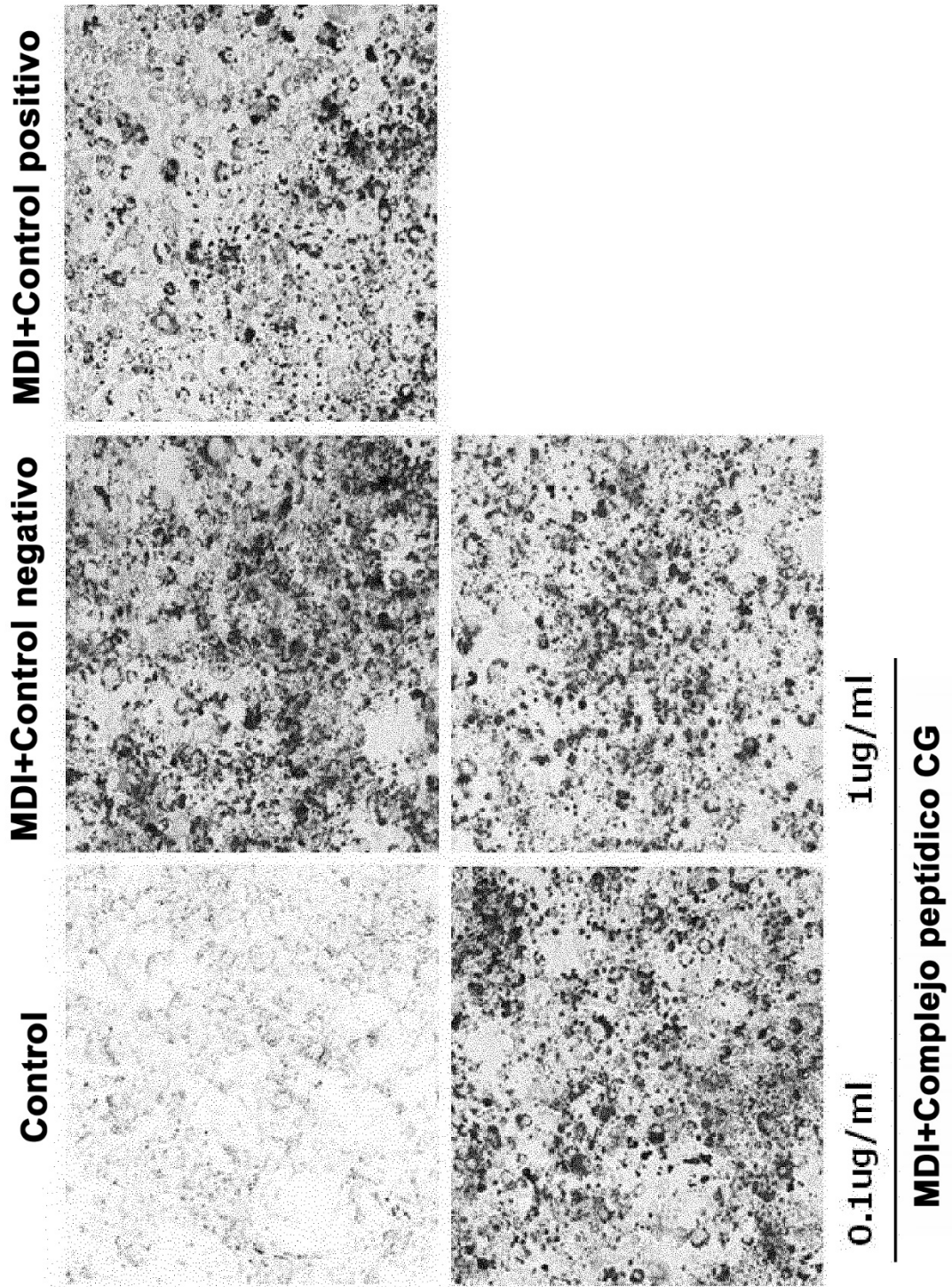


FIG. 2B

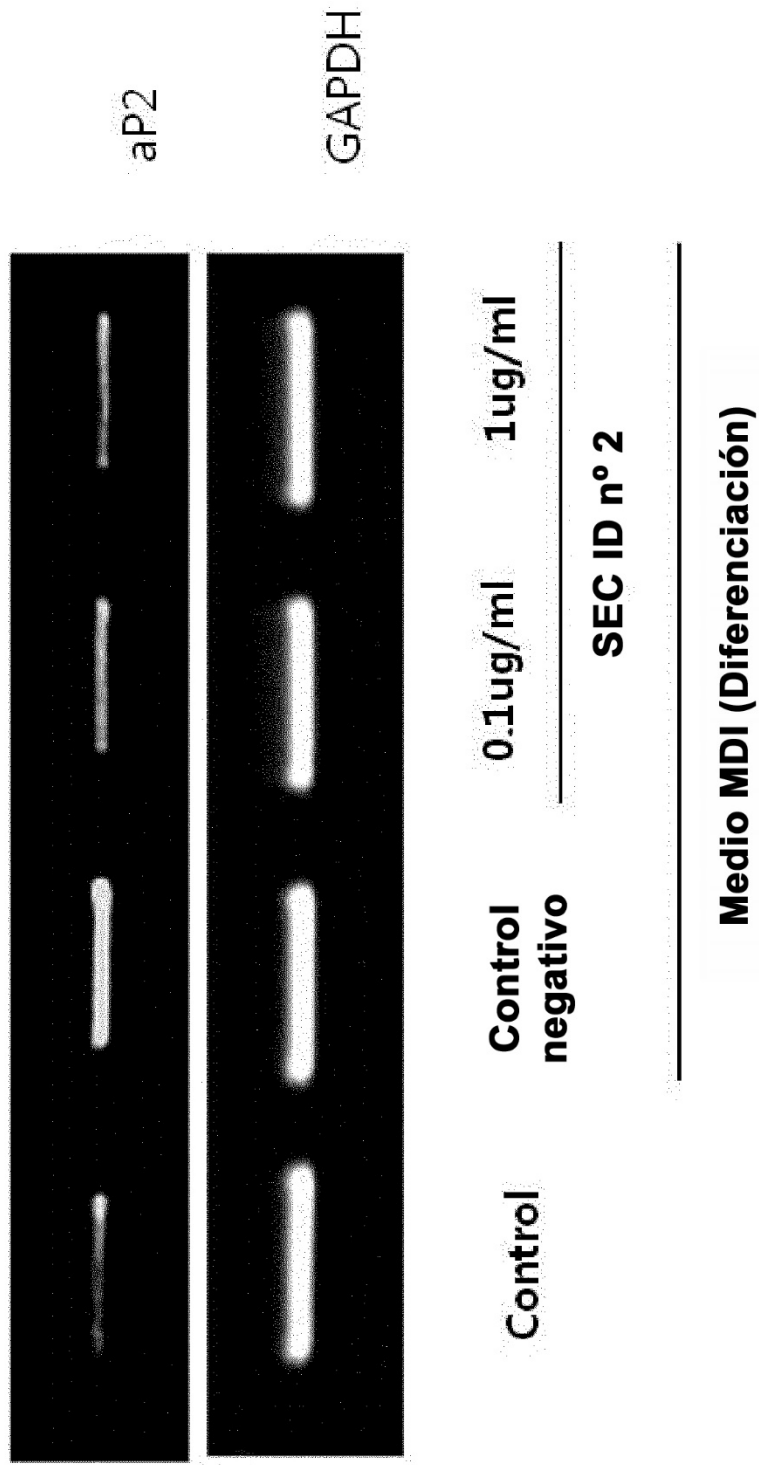


FIG. 3A

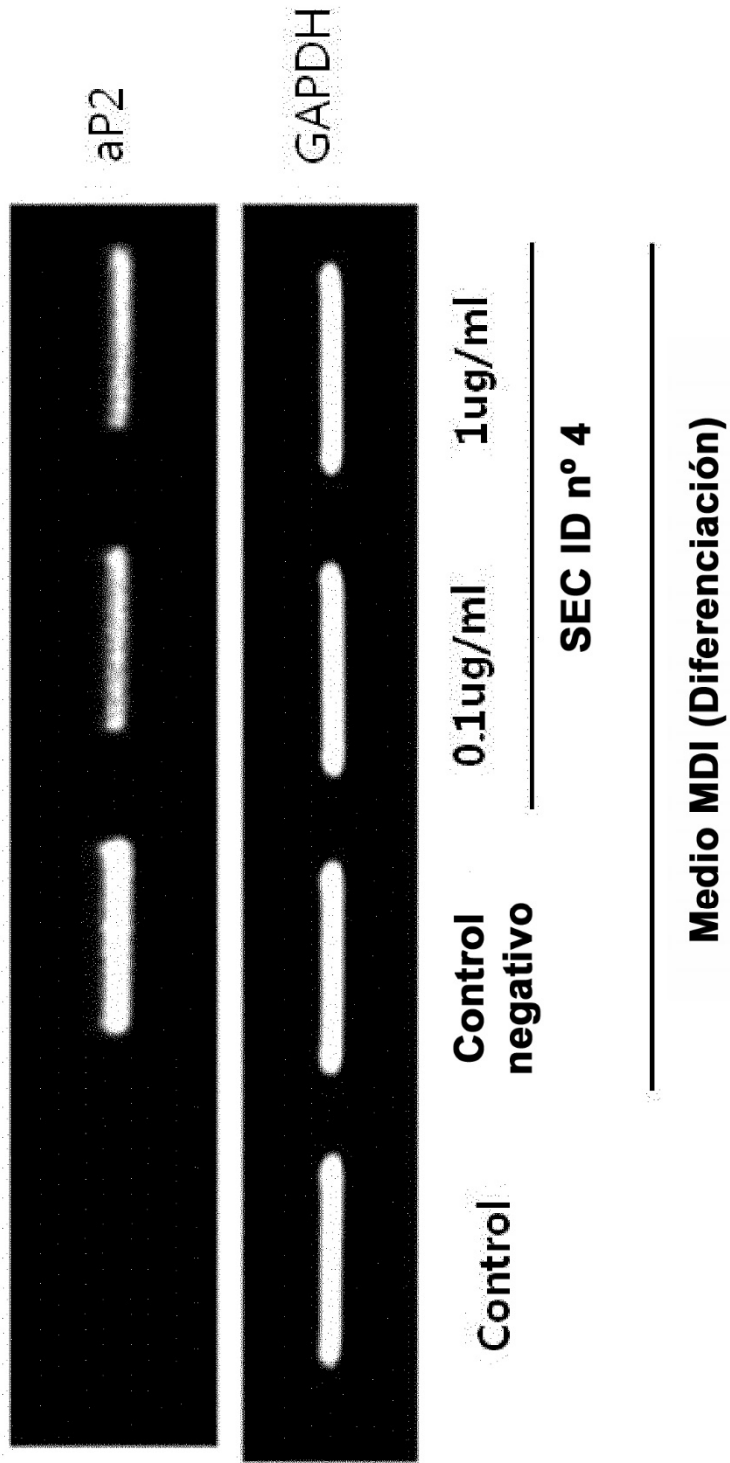


FIG. 3B

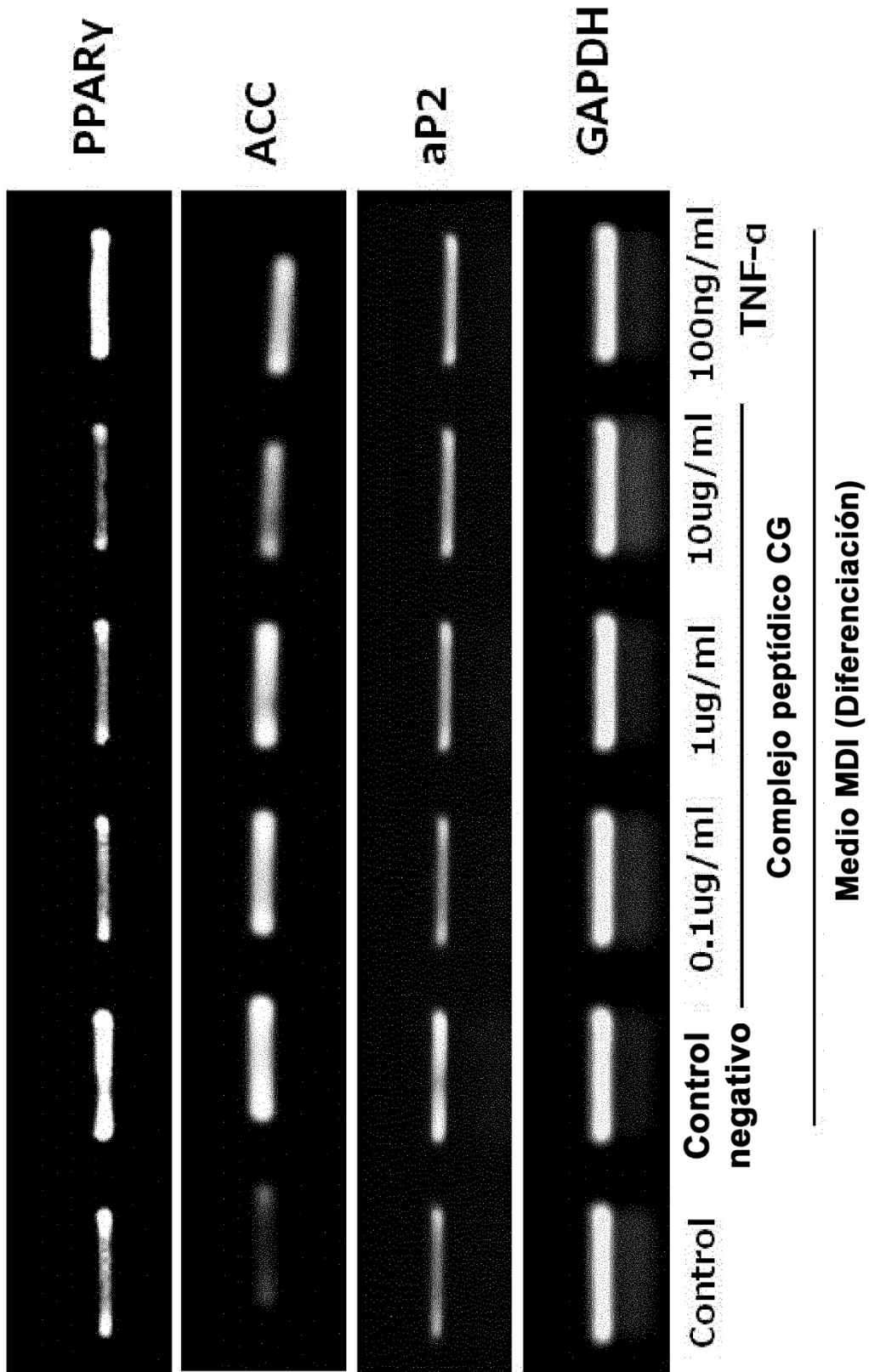


FIG. 4

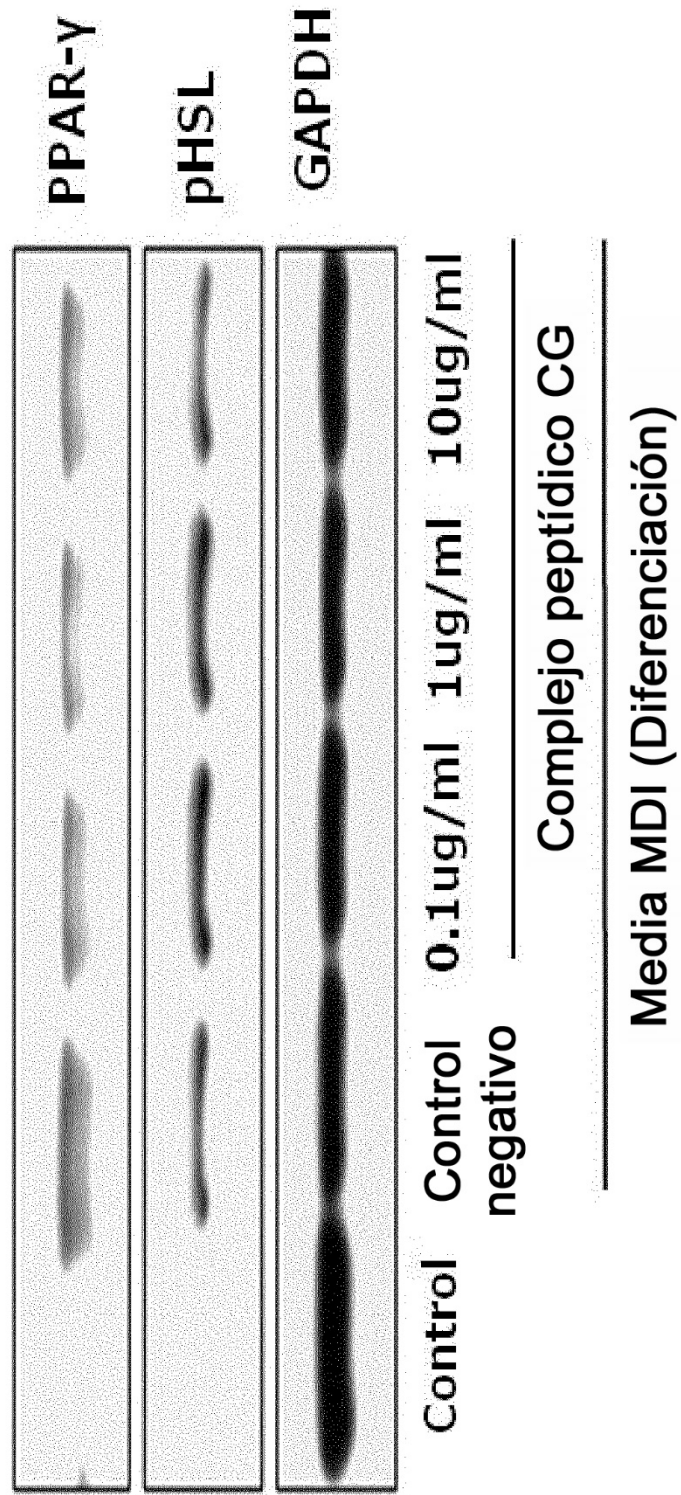


FIG. 5A

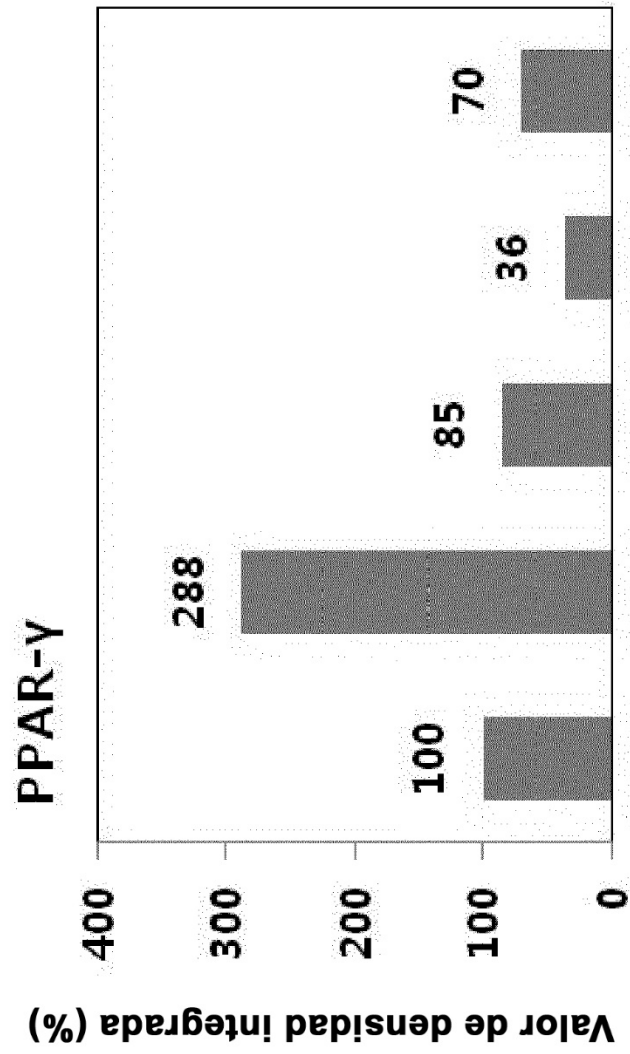


FIG. 5B

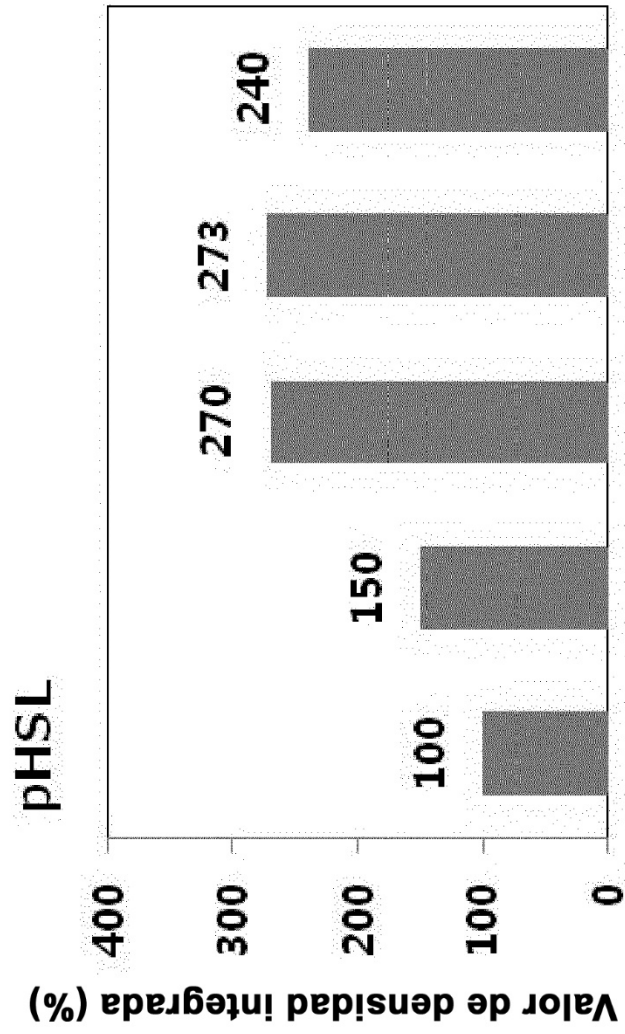


FIG. 5C

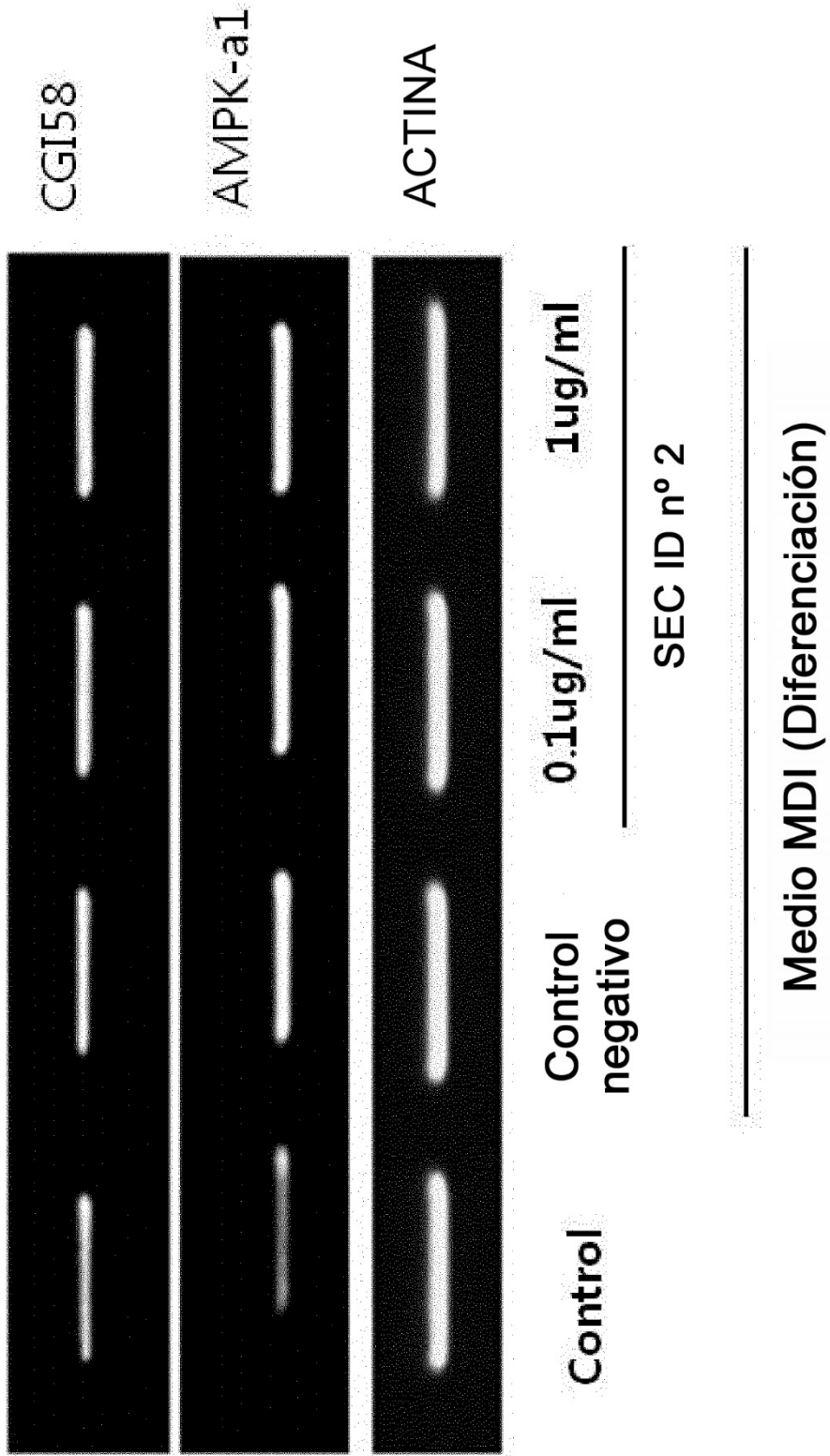


FIG. 6A

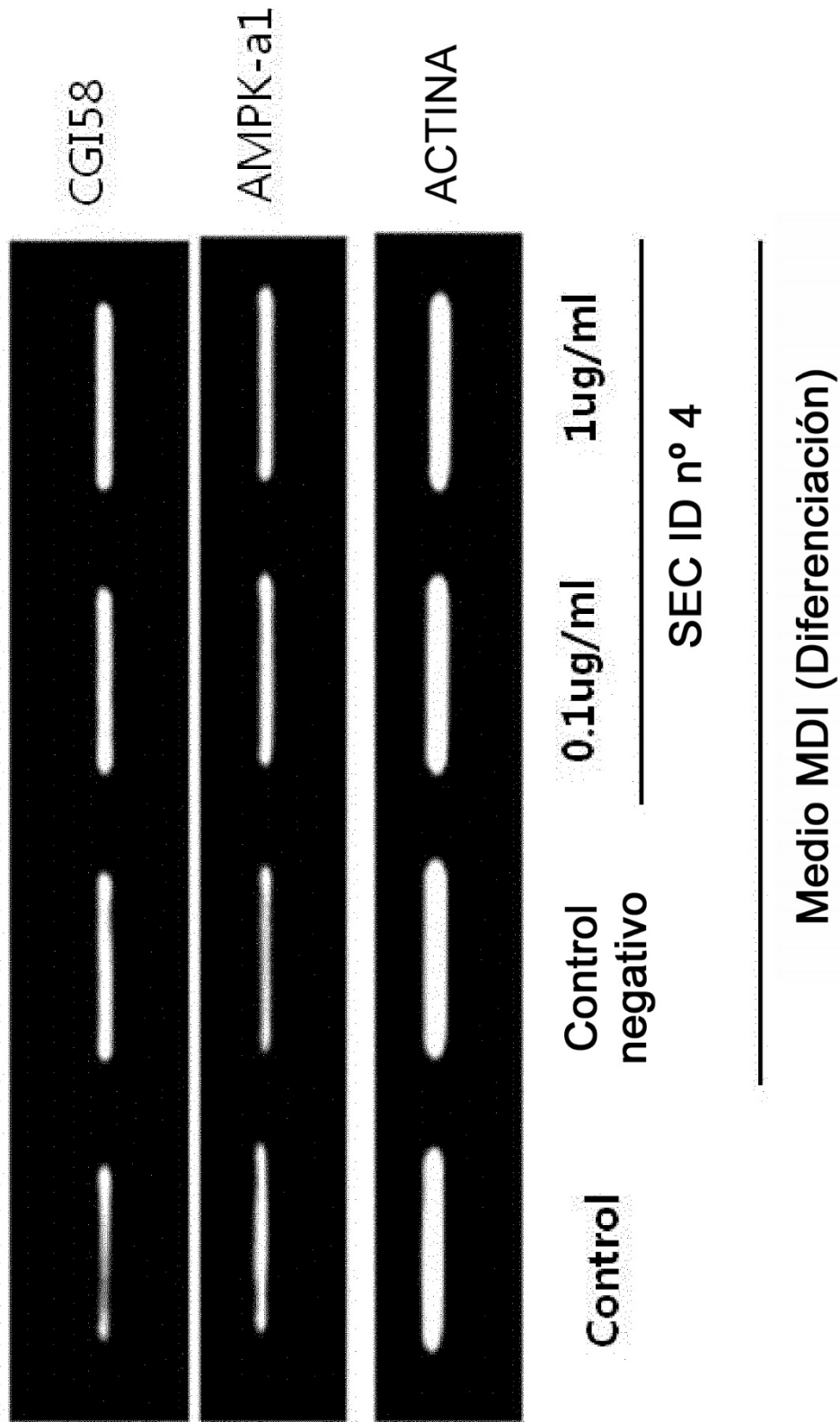


FIG. 6B

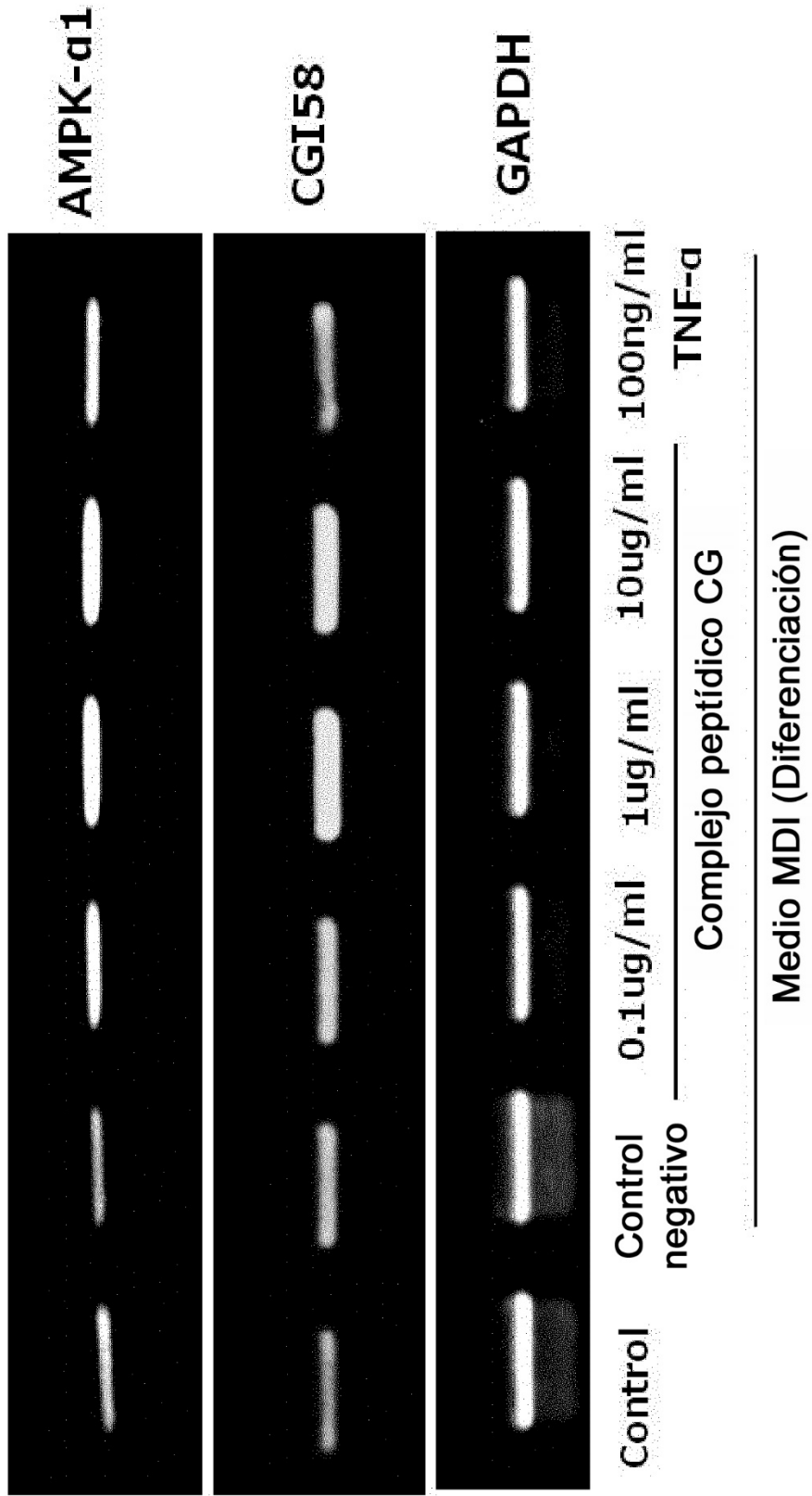


FIG. 6C

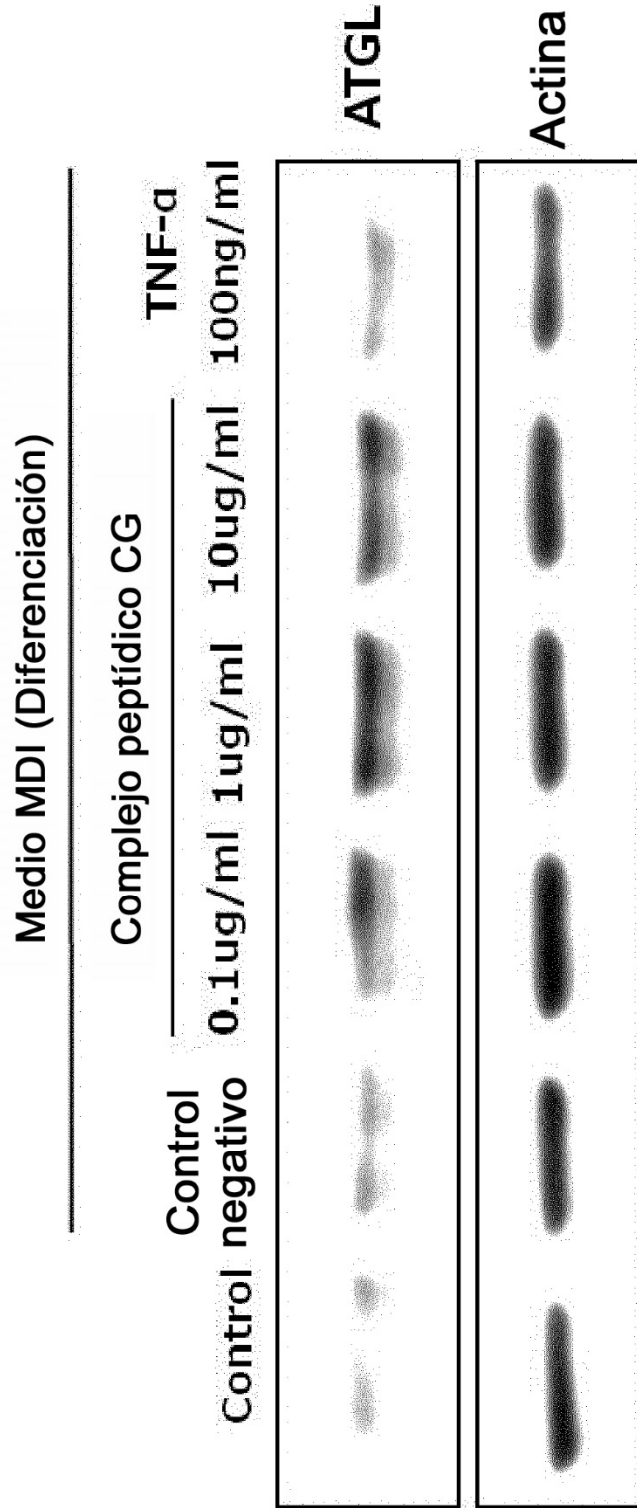


FIG. 7A

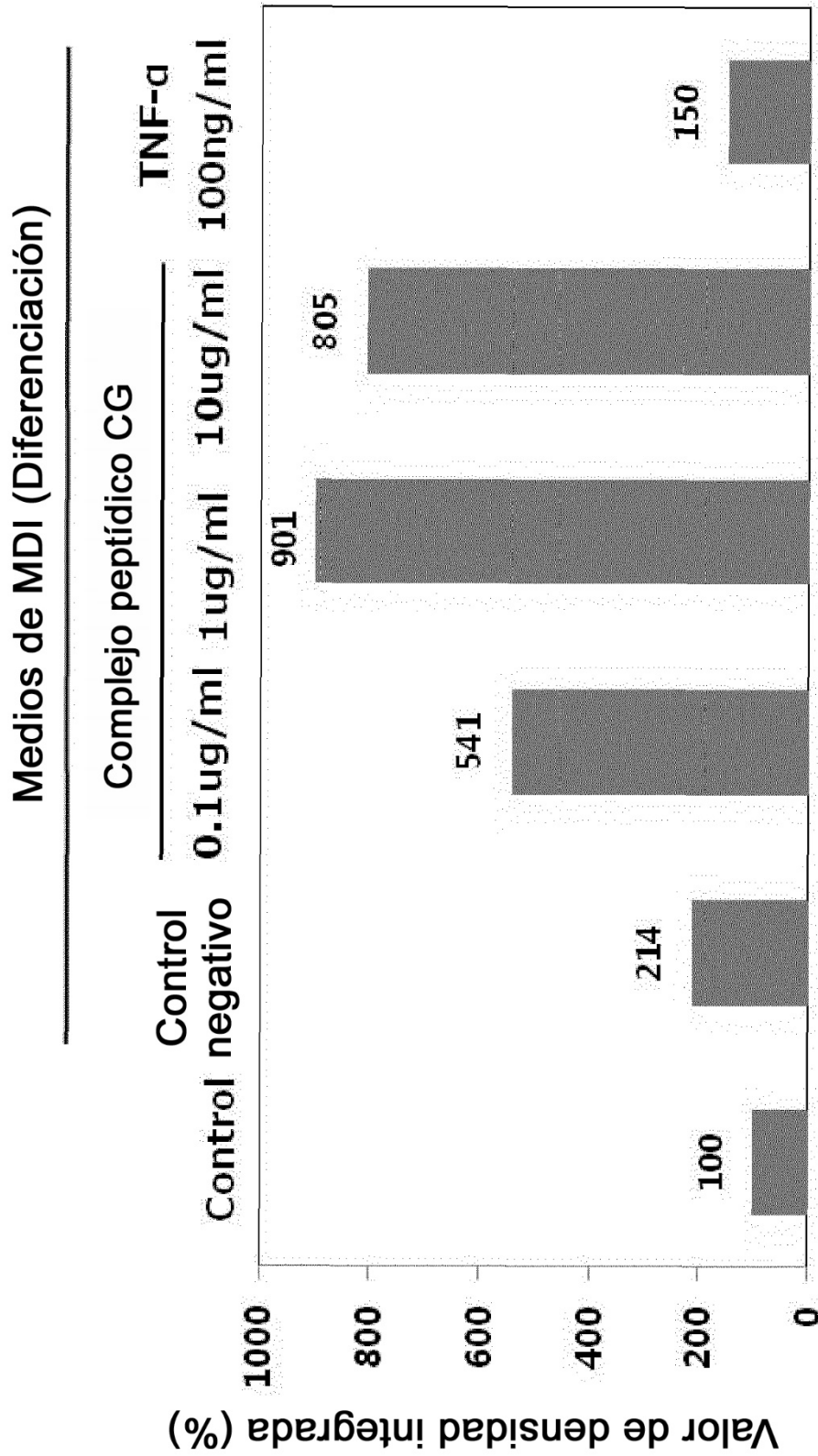


FIG. 7B

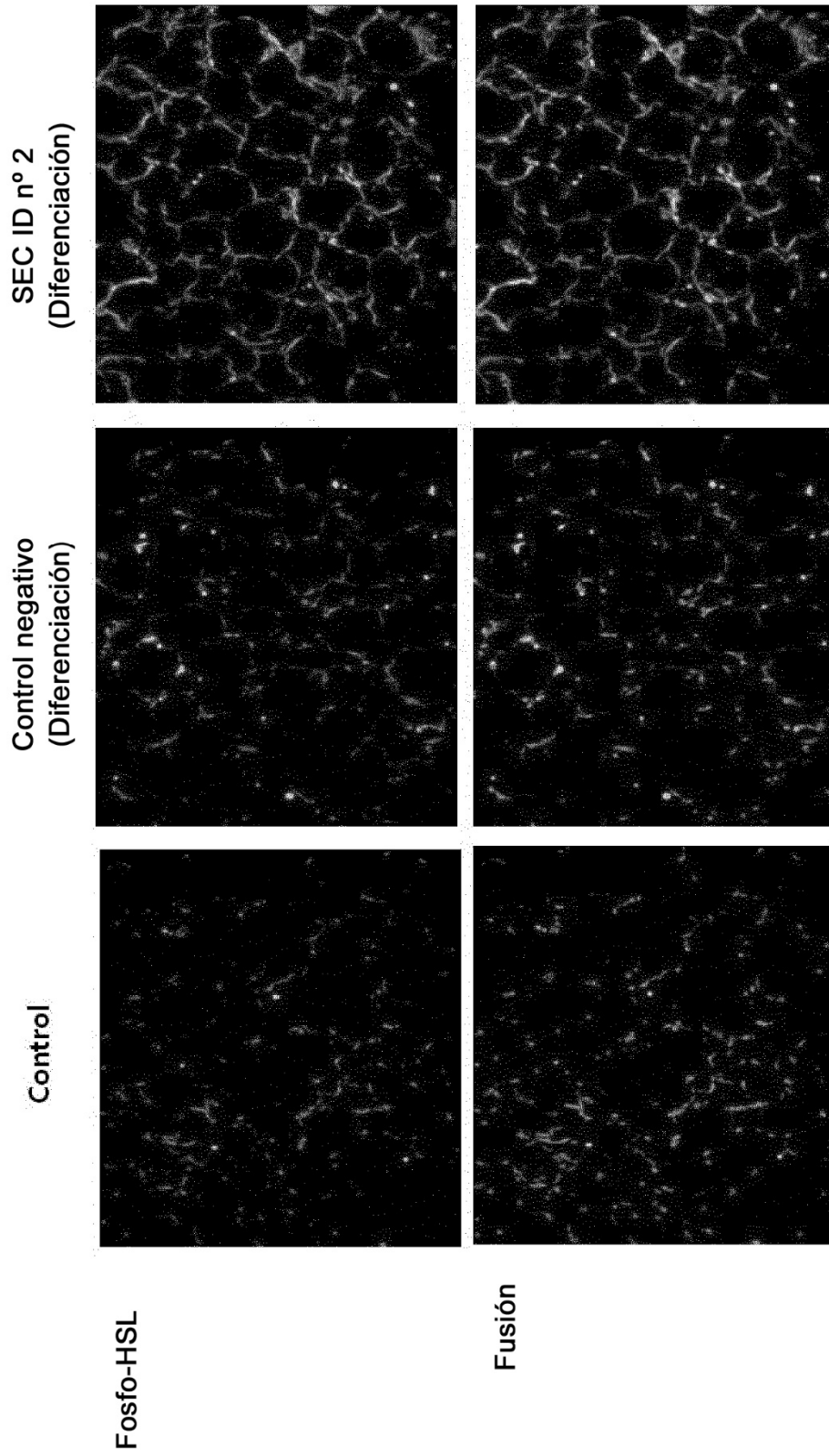


FIG. 8A

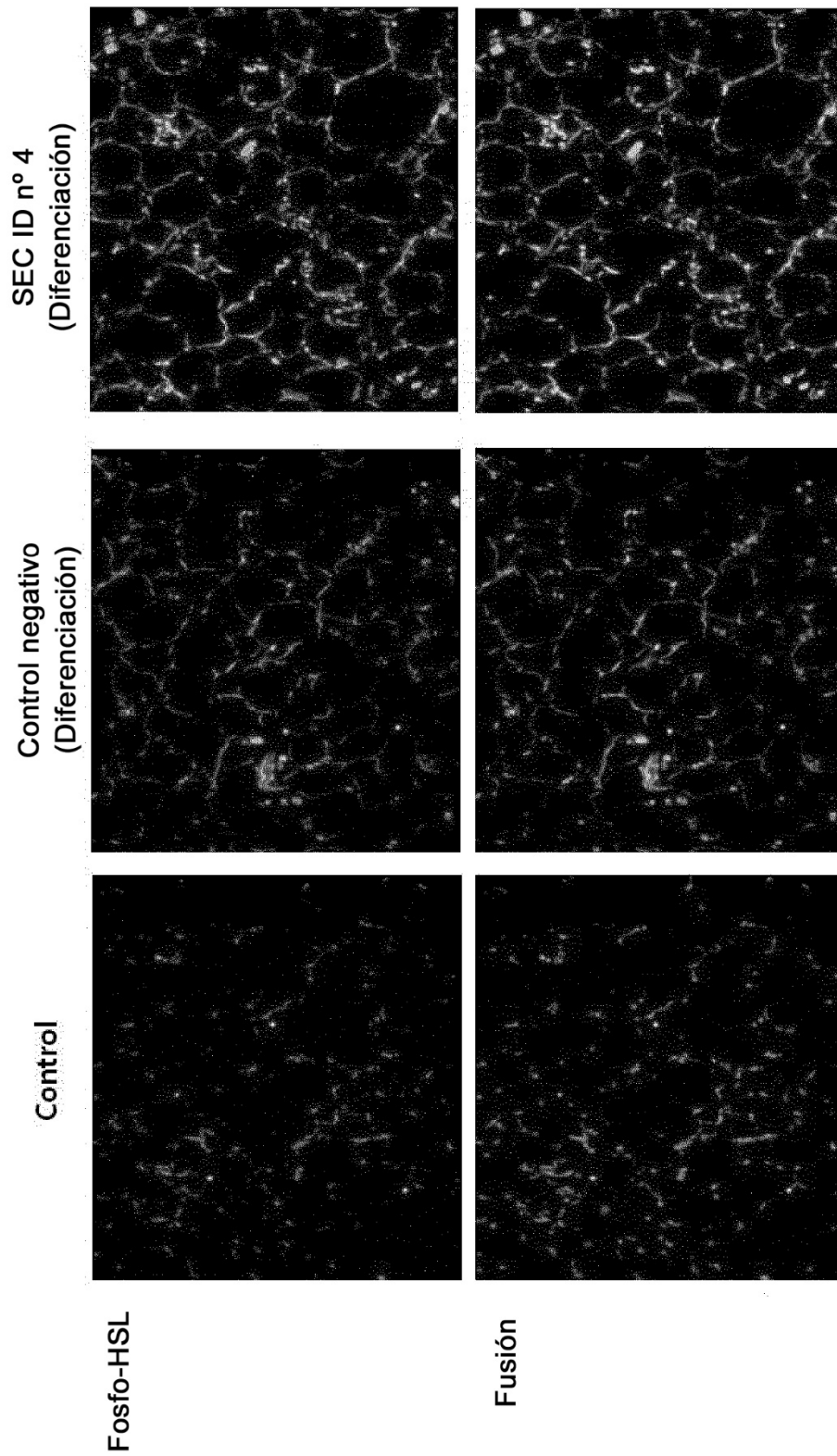


FIG. 8B

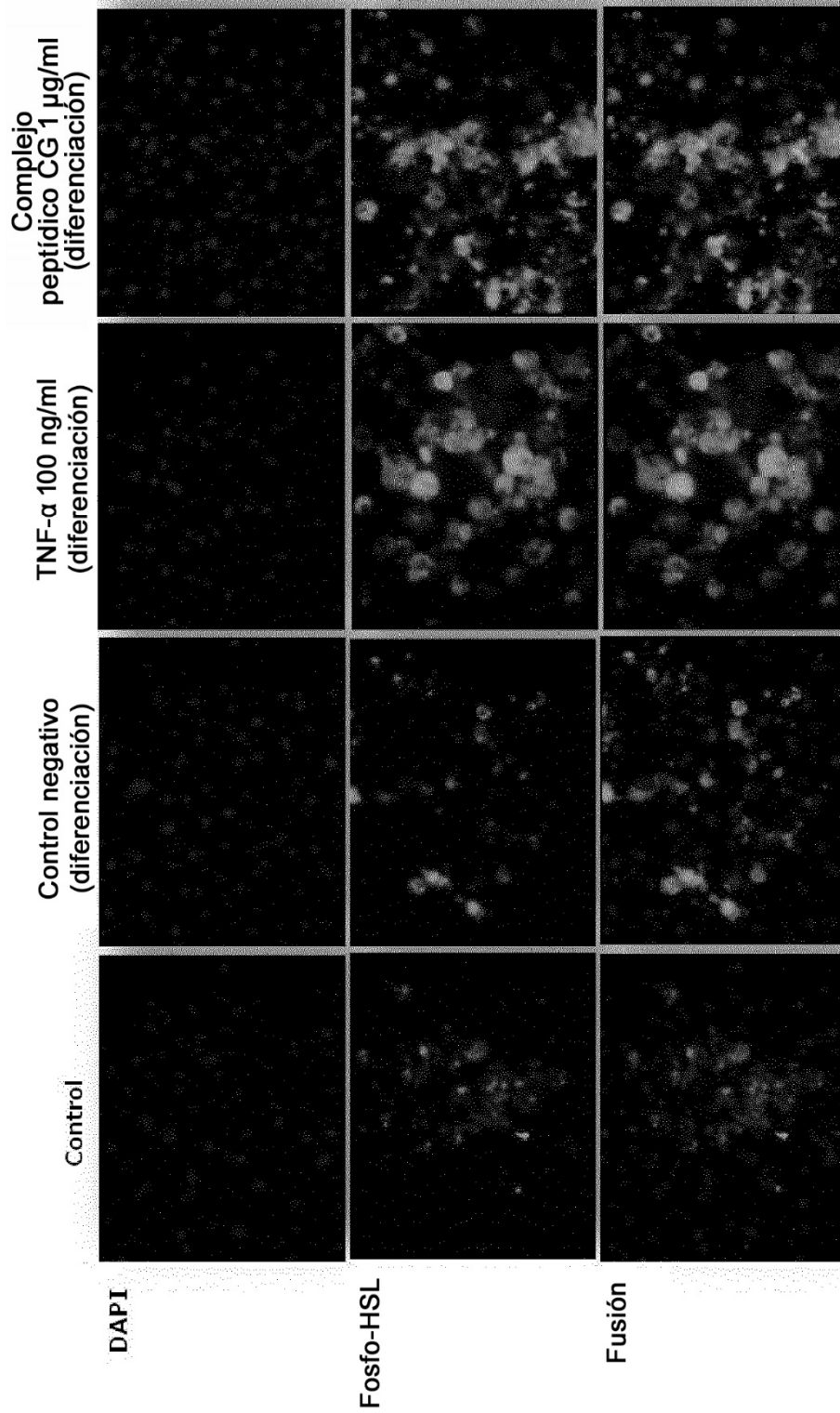


FIG. 8C

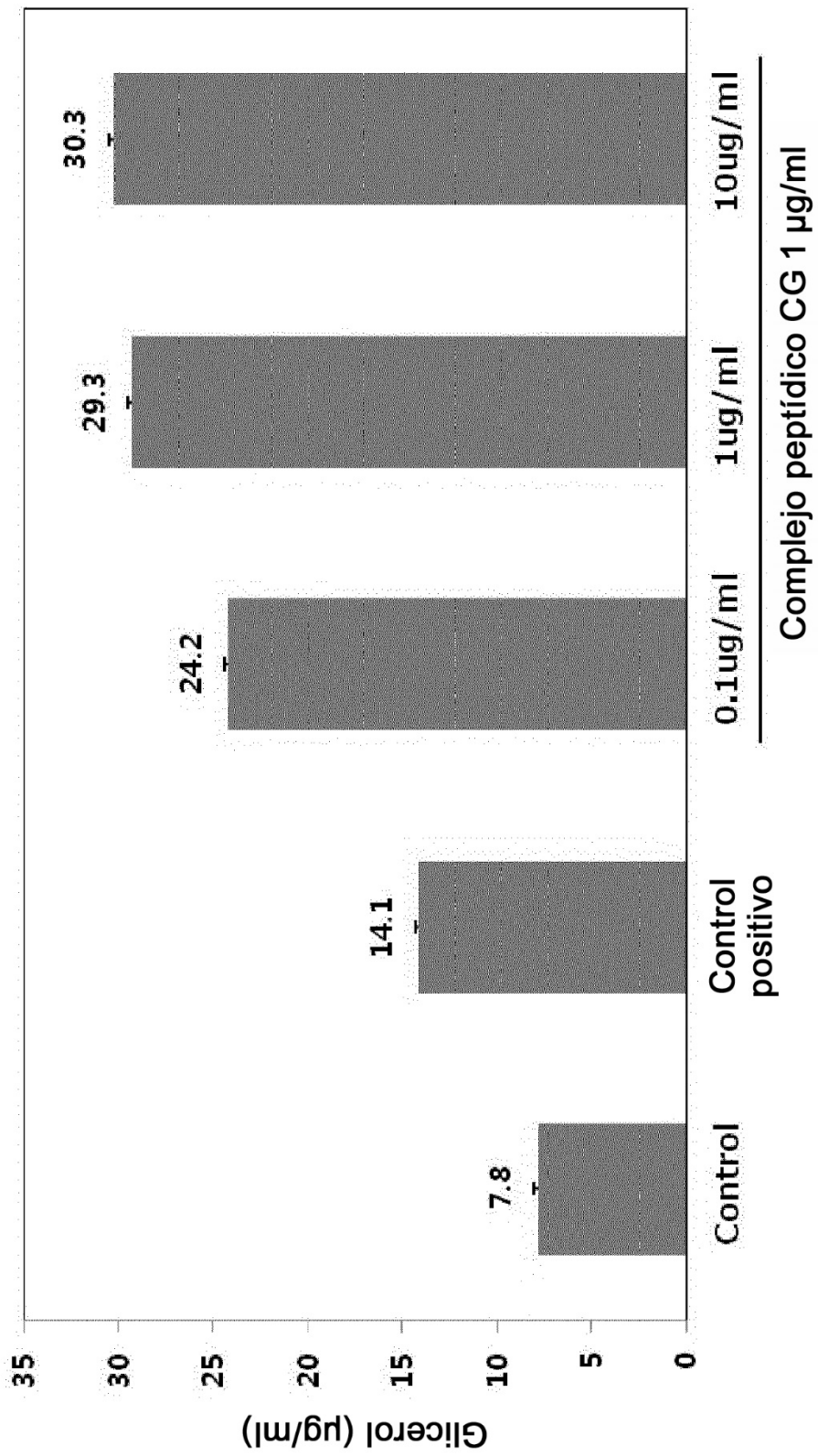


FIG. 9

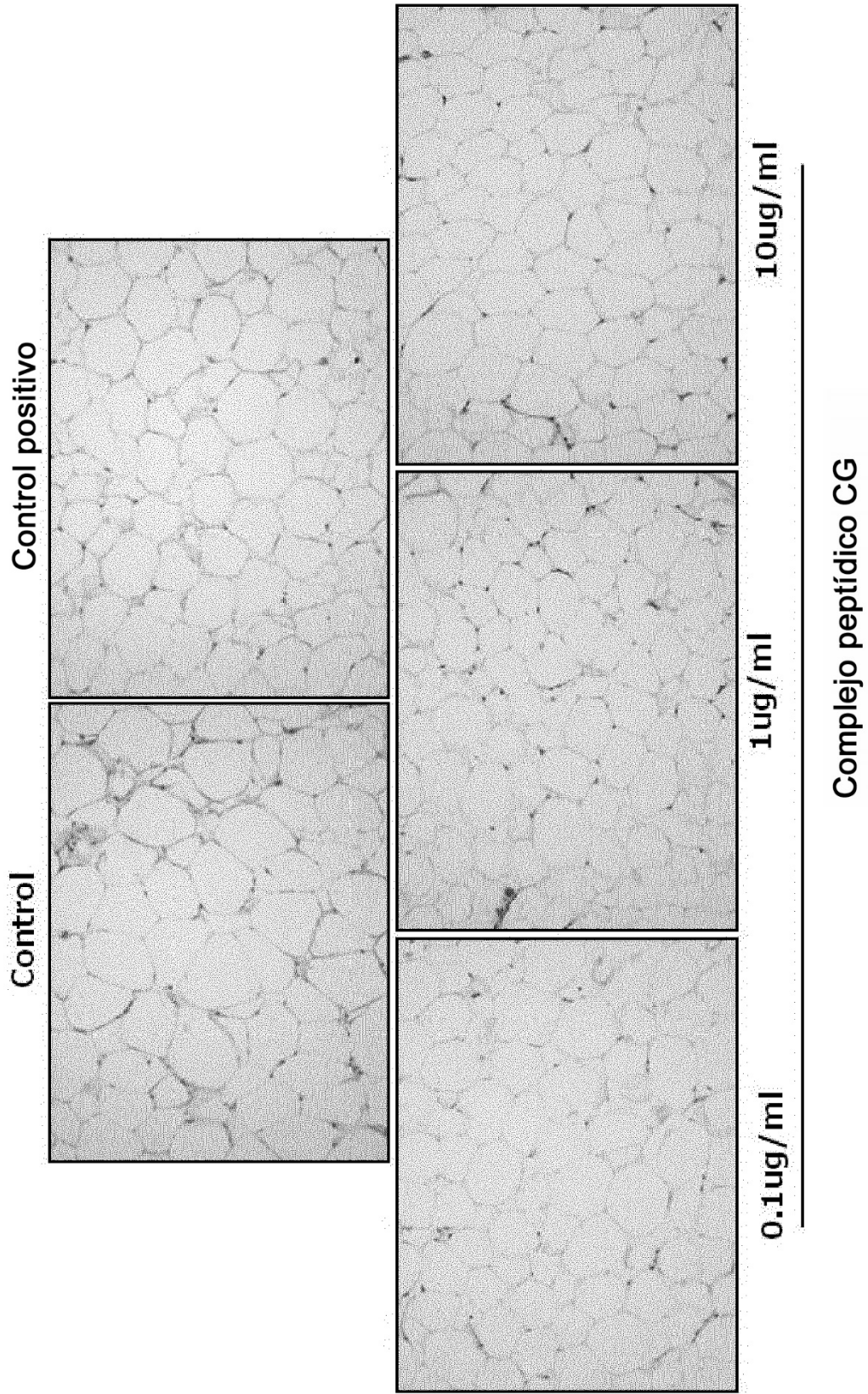


FIG. 10A

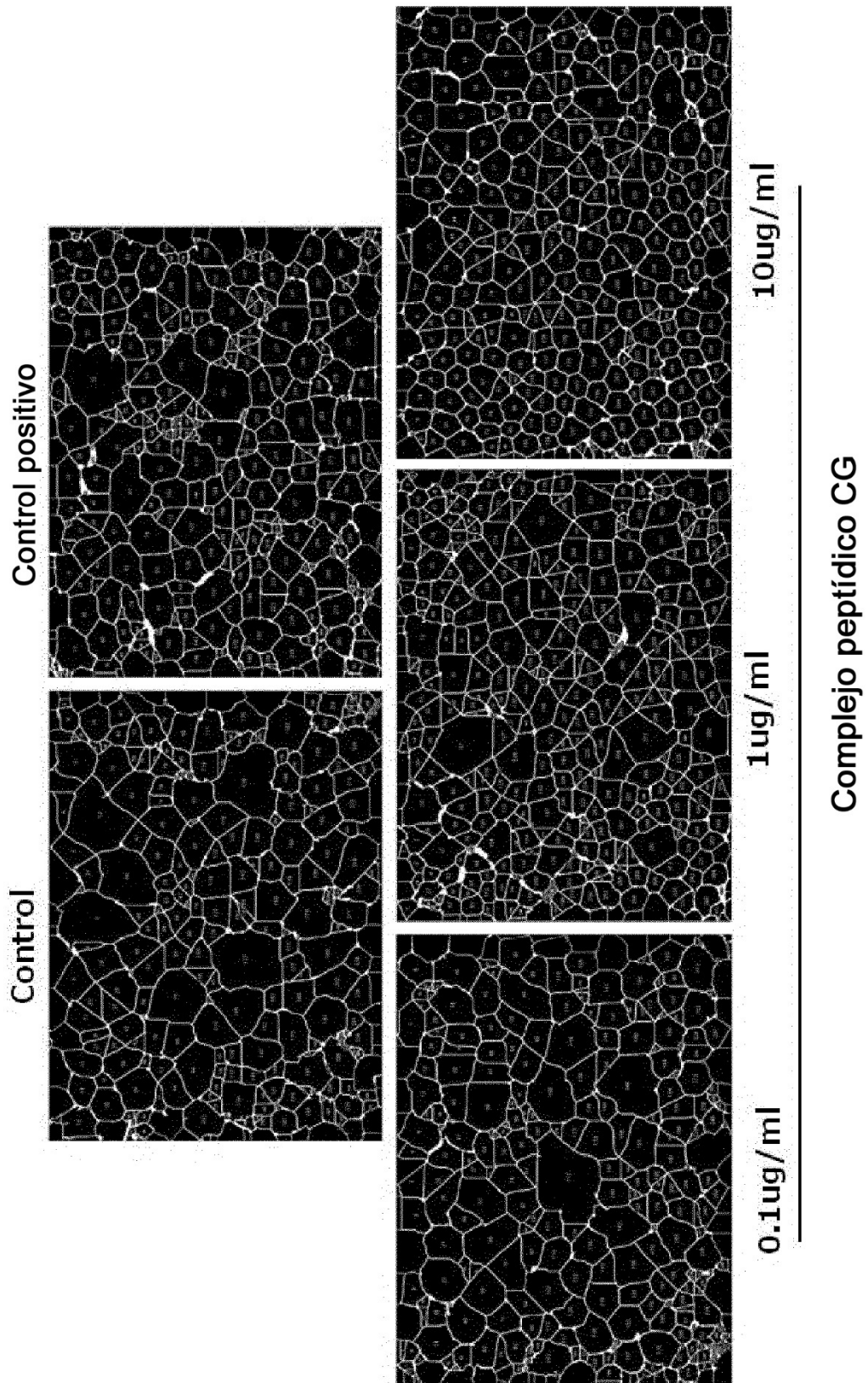


FIG. 10B

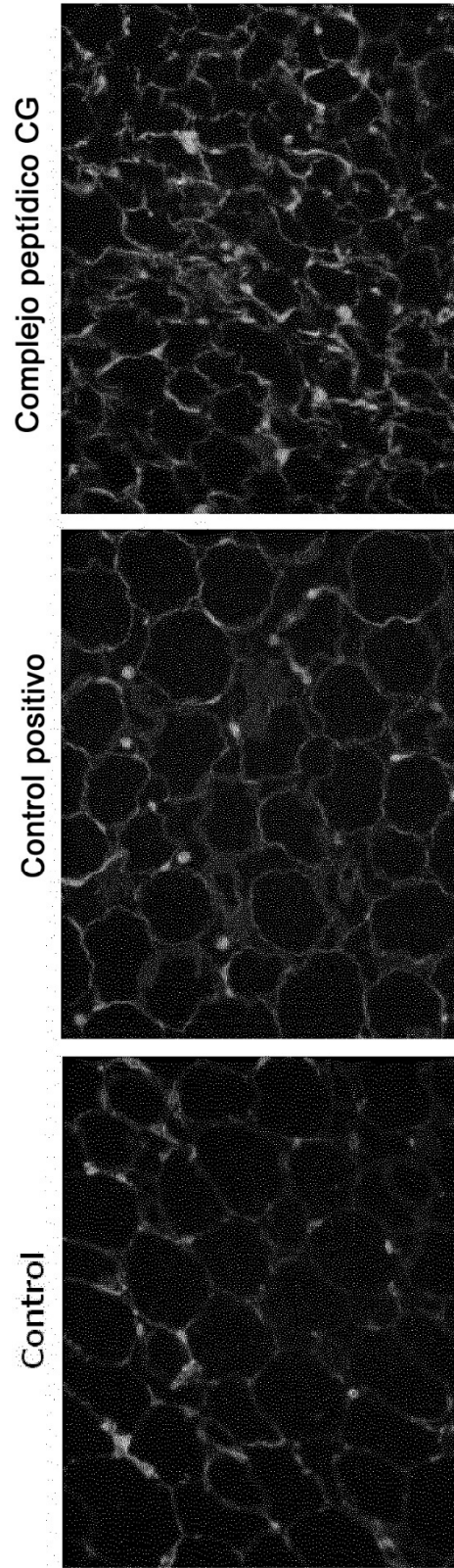


FIG. 11

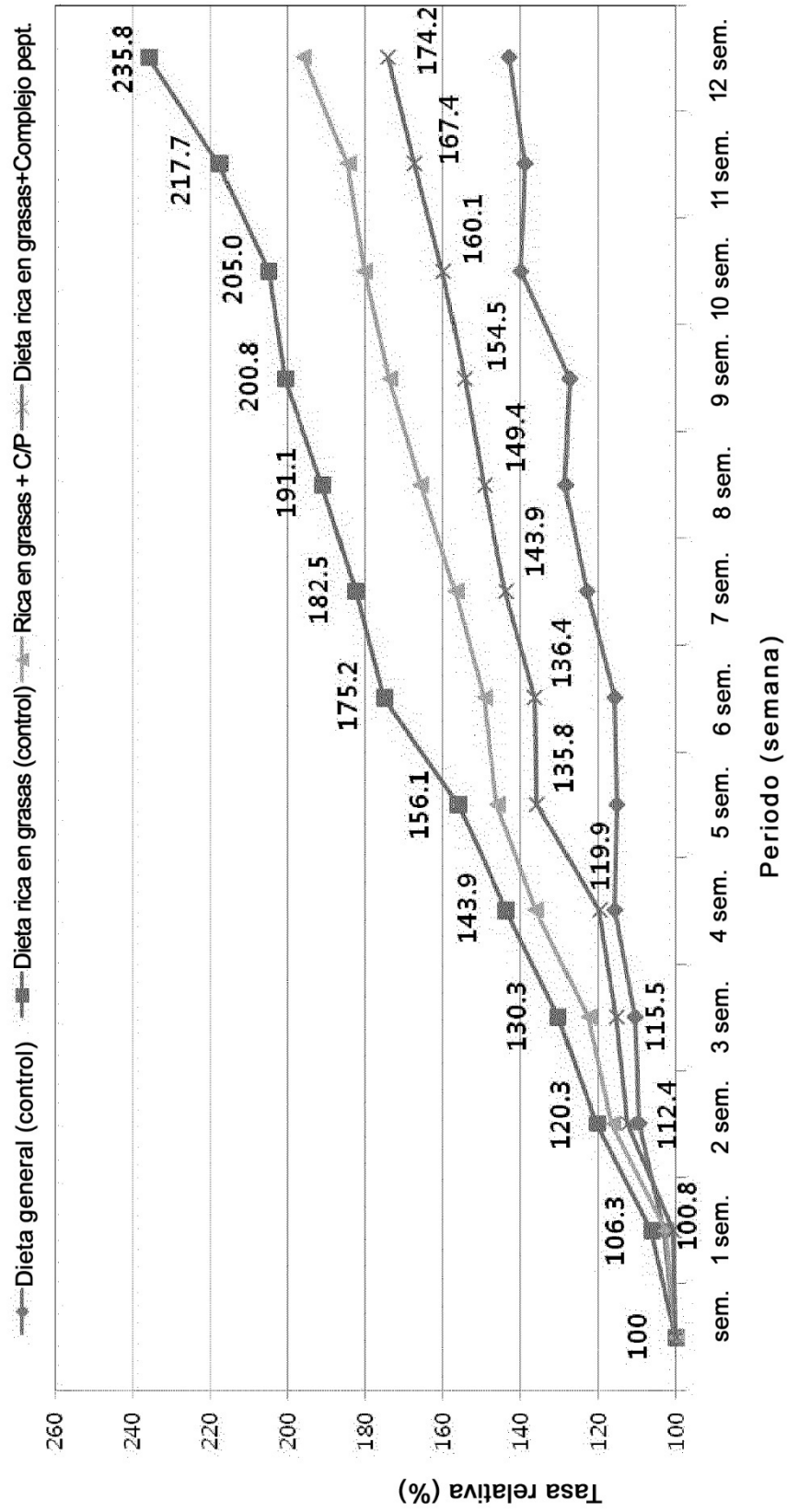


FIG. 12

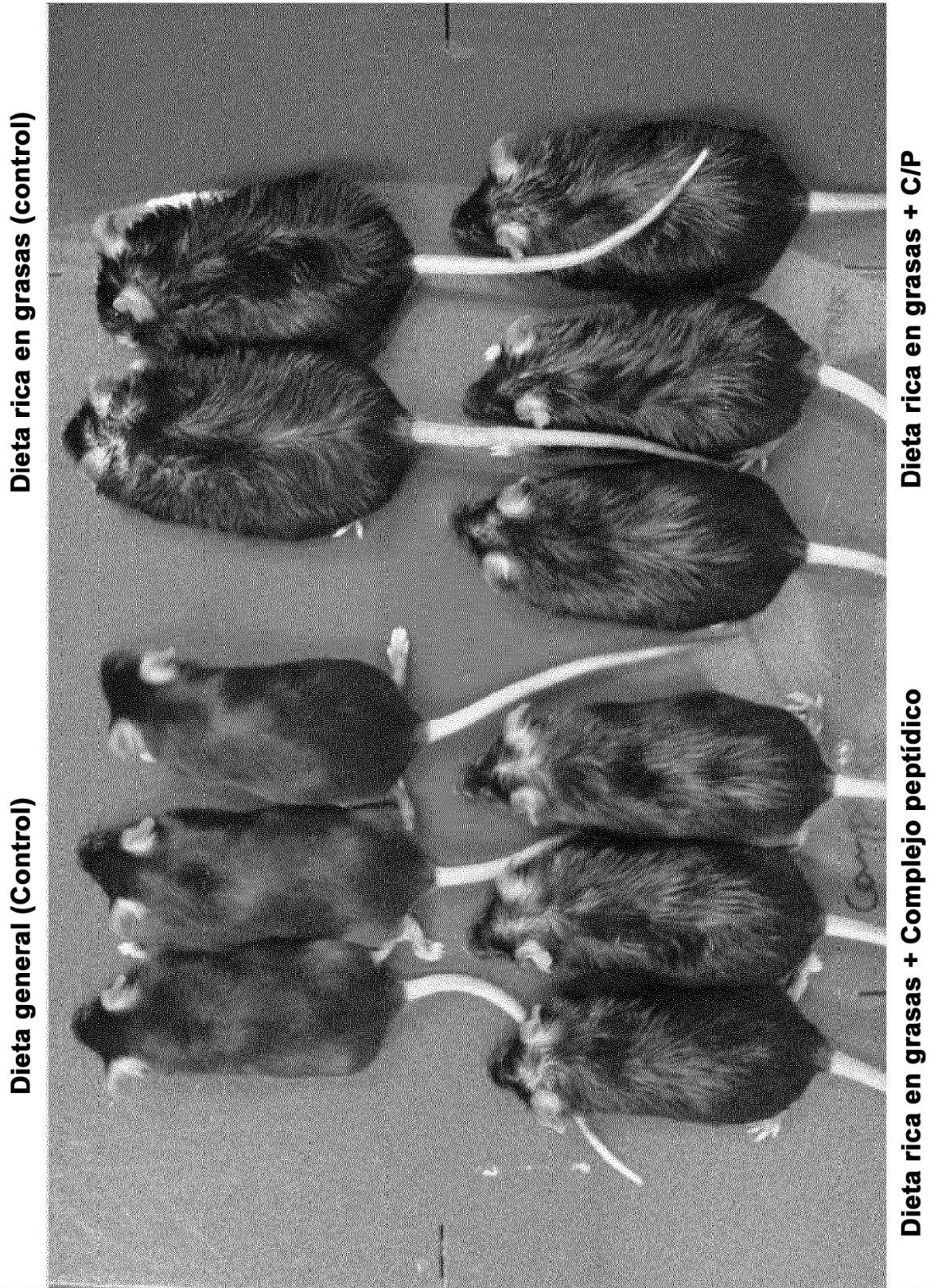


FIG. 13

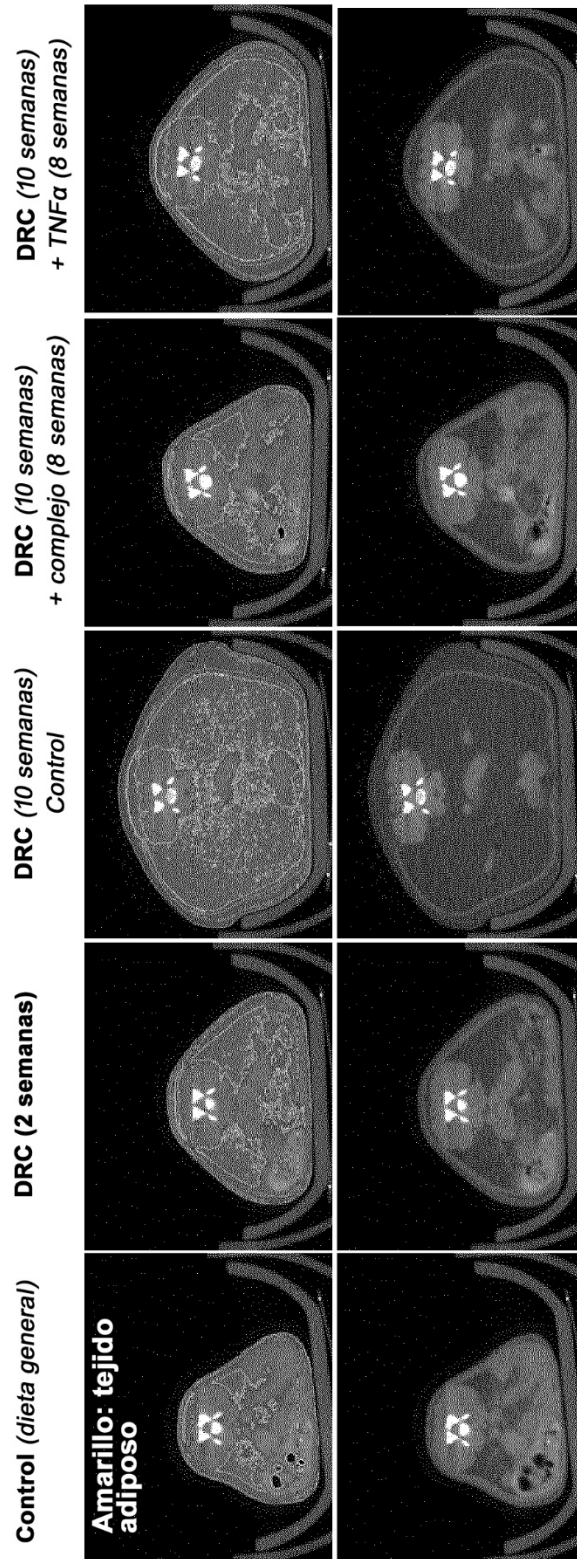
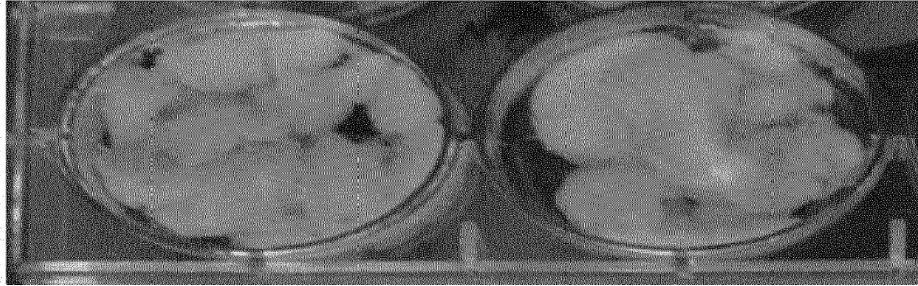


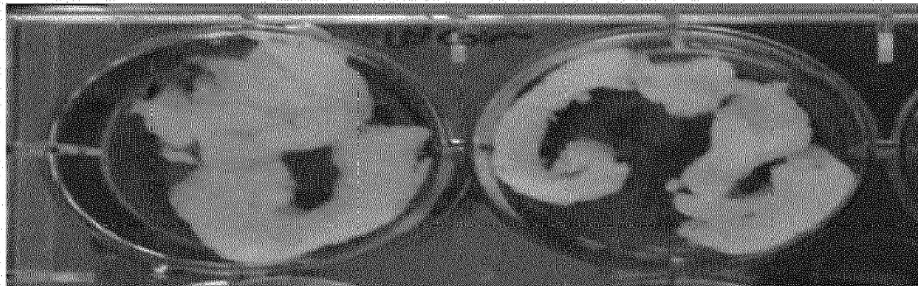
FIG. 14



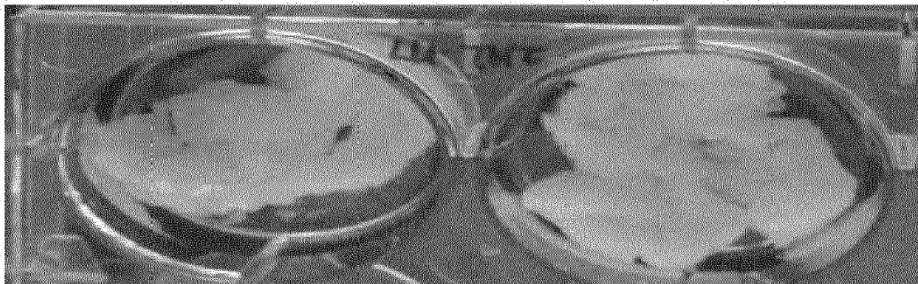
Dieta general (control)



Dieta rica en grasas (control)



Dieta rica en grasas + Complejo peptídico



Dieta rica en grasas + C/P

FIG. 15

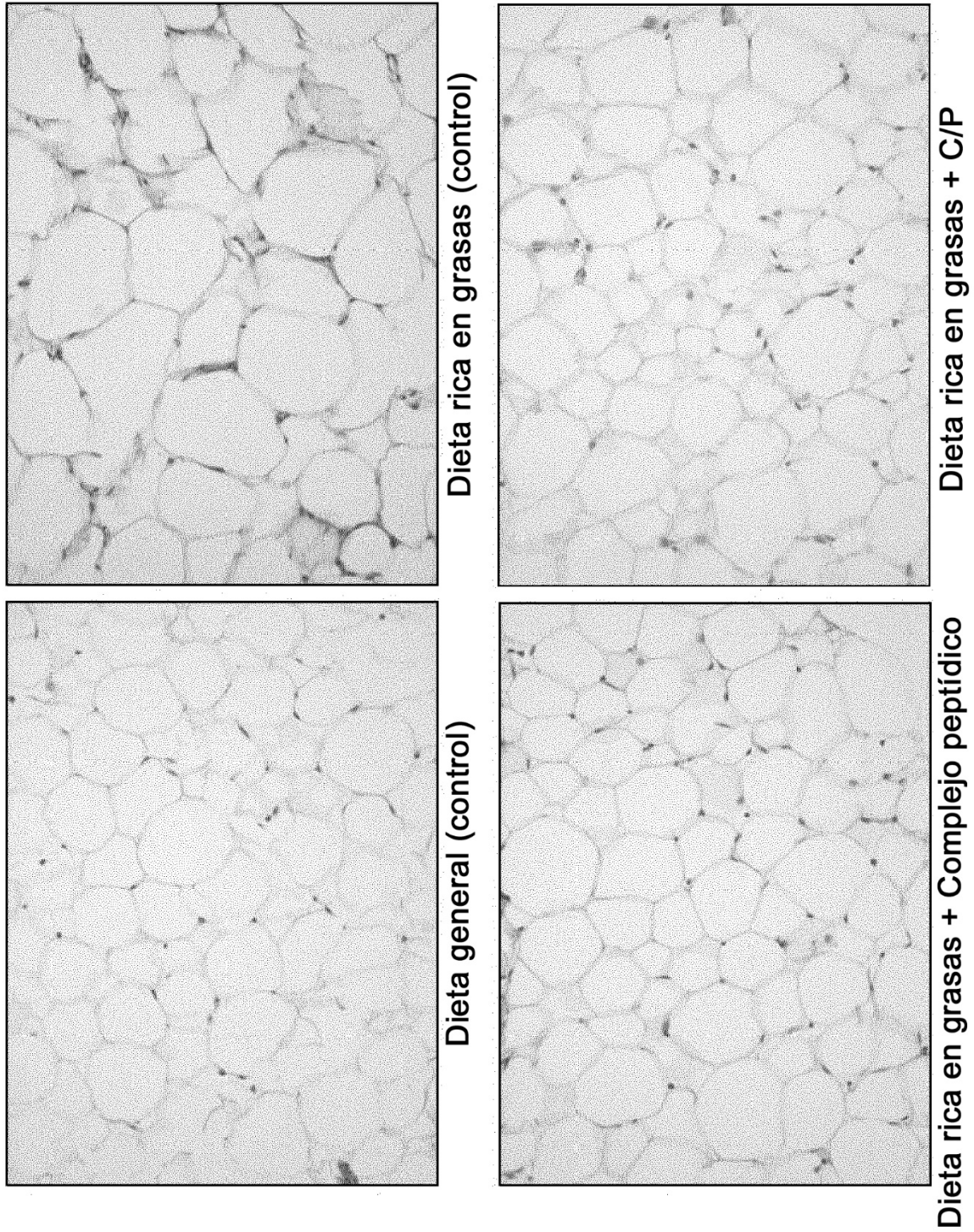
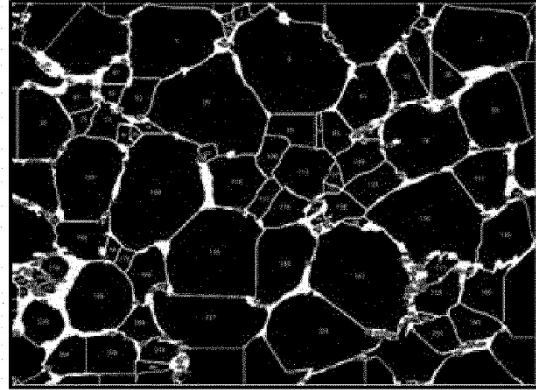
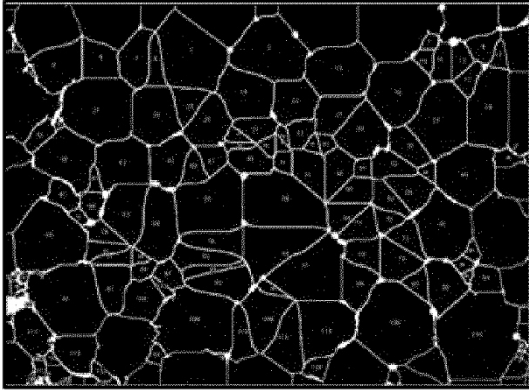


FIG. 16A

Dieta general (control)

**Dieta rica en grasas
(control)**



**Dieta rica en grasas +
Complejo peptídico**

**Dieta rica en grasas
+ C/P**

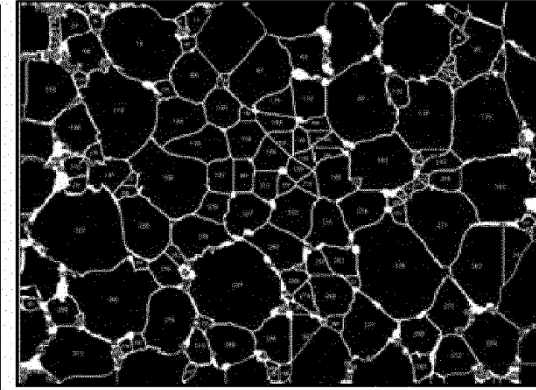
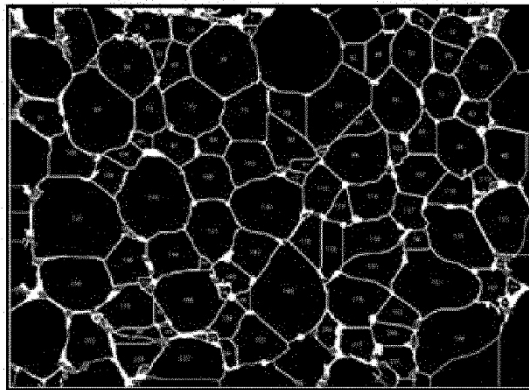


FIG. 16B

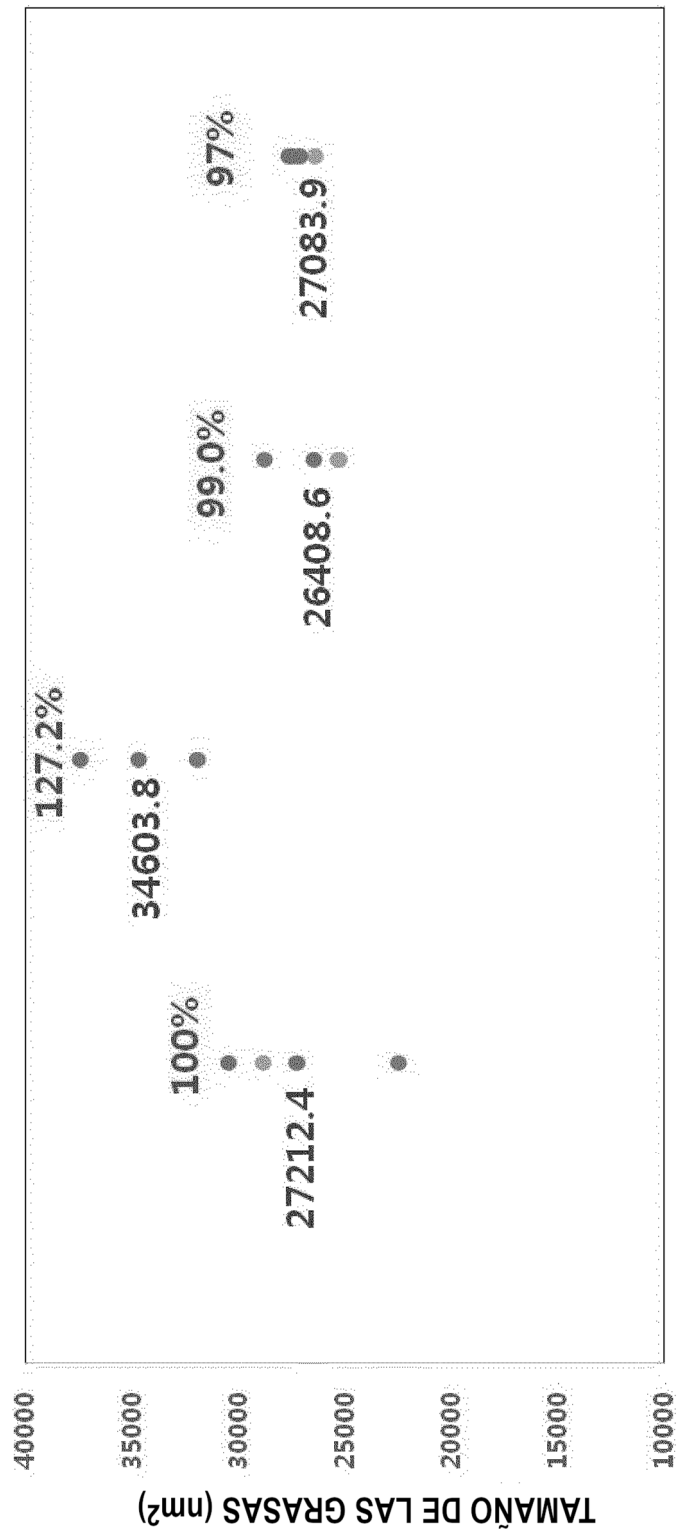


FIG. 16C

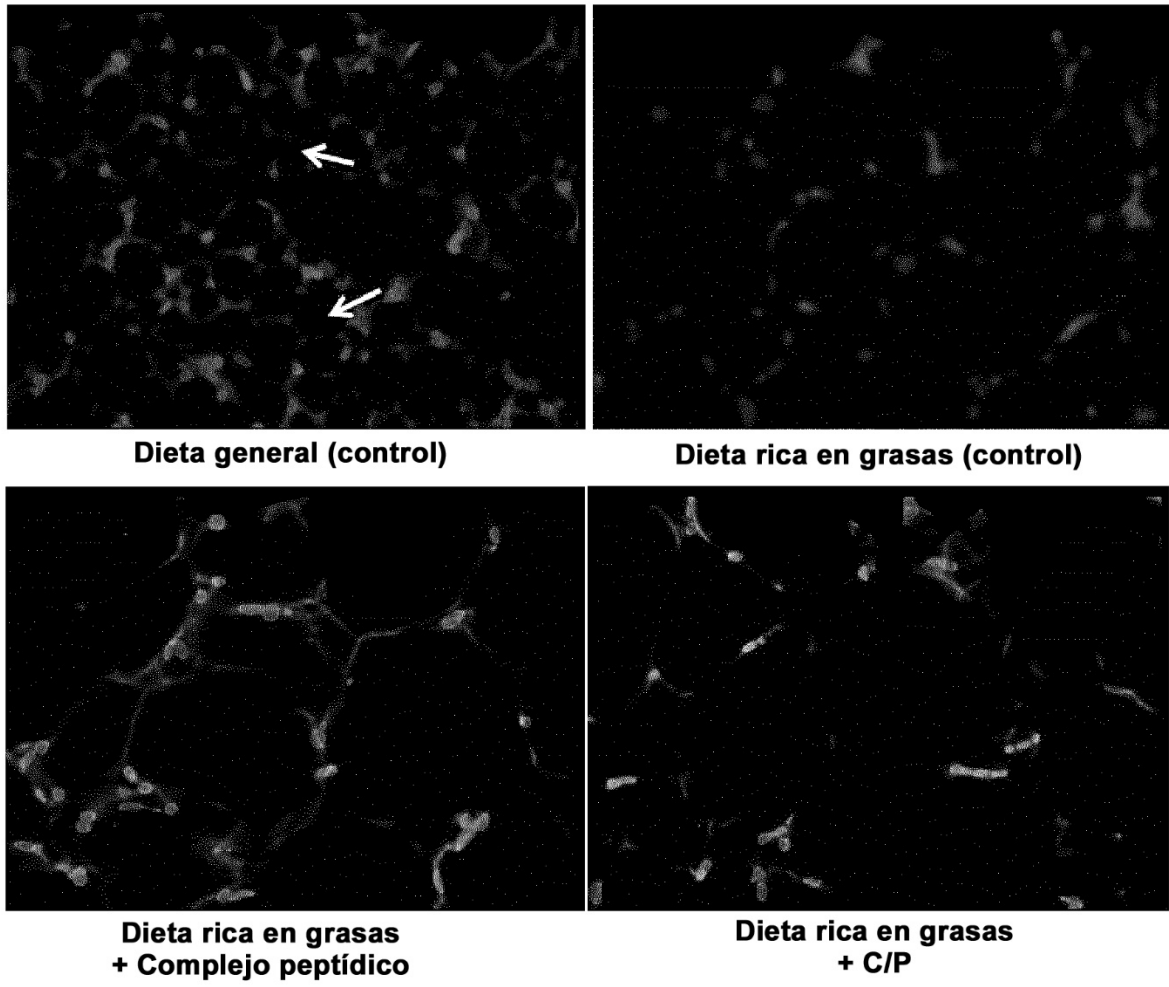


FIG. 17

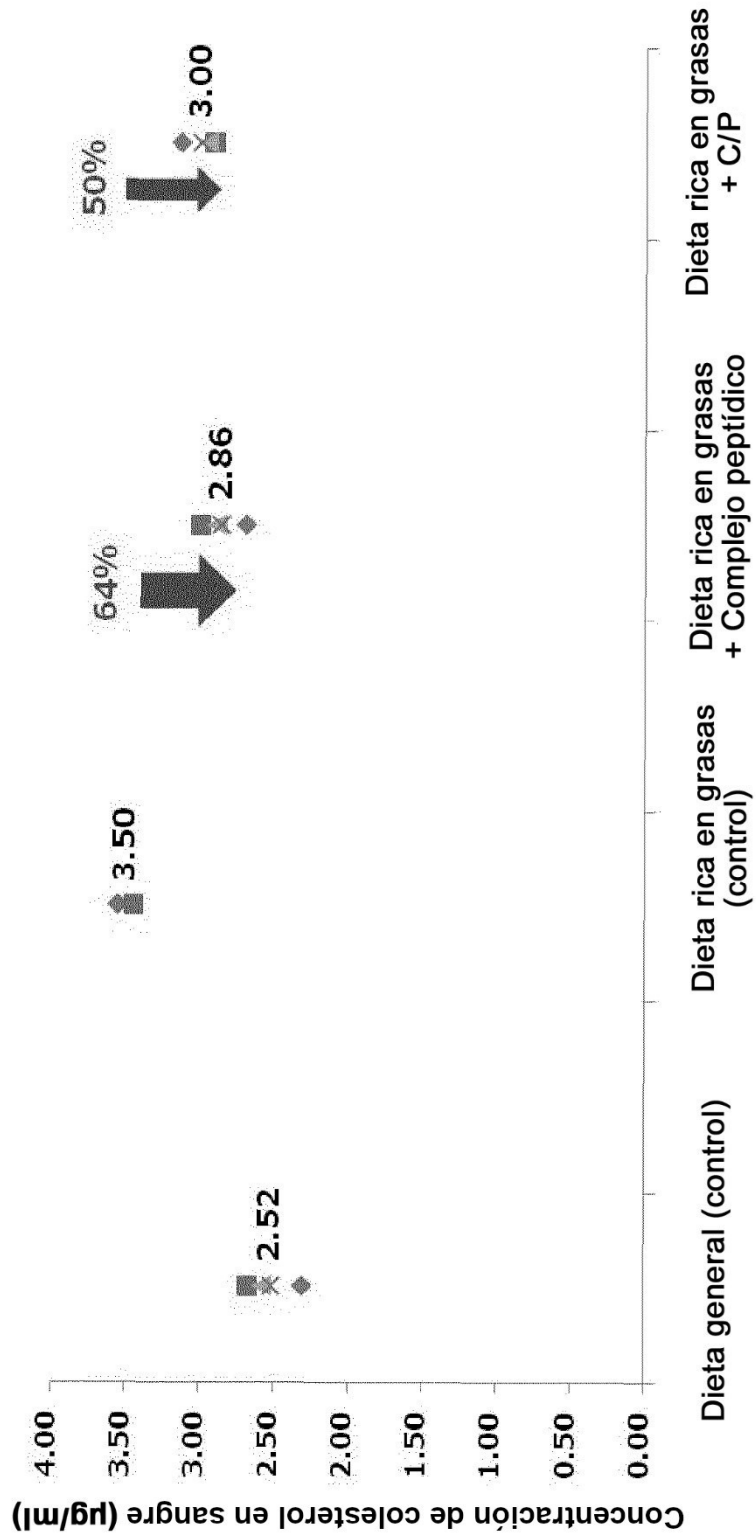


FIG. 18

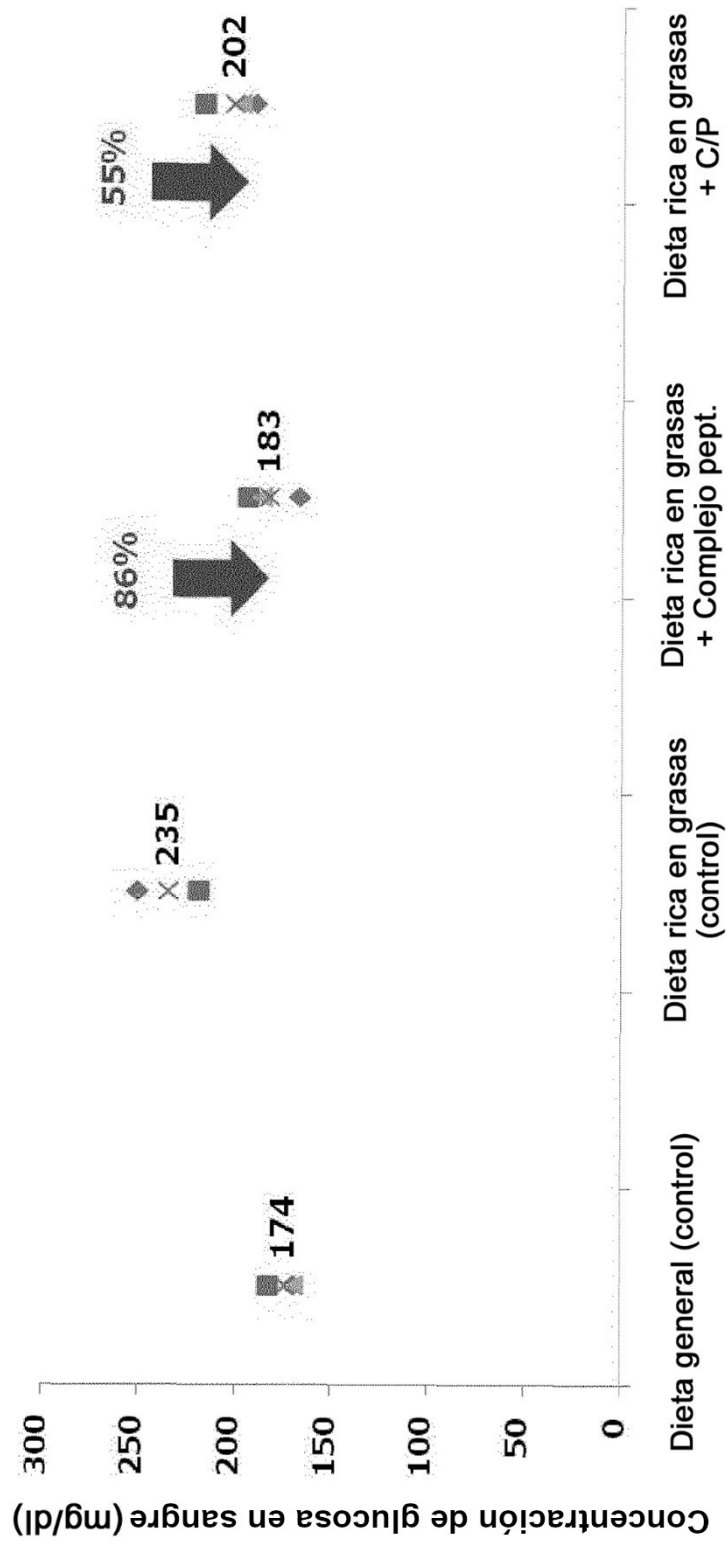


FIG. 19

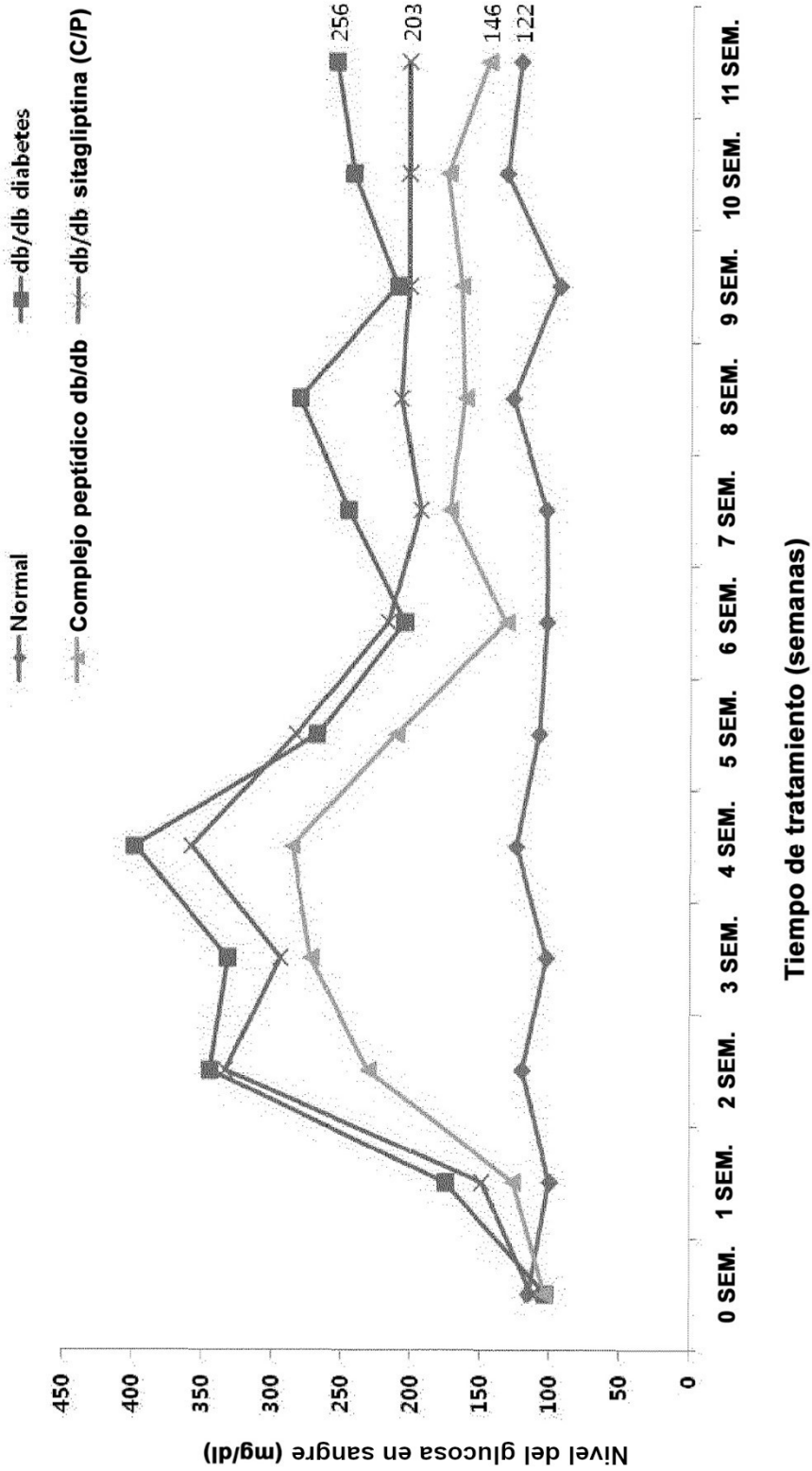


FIG. 20

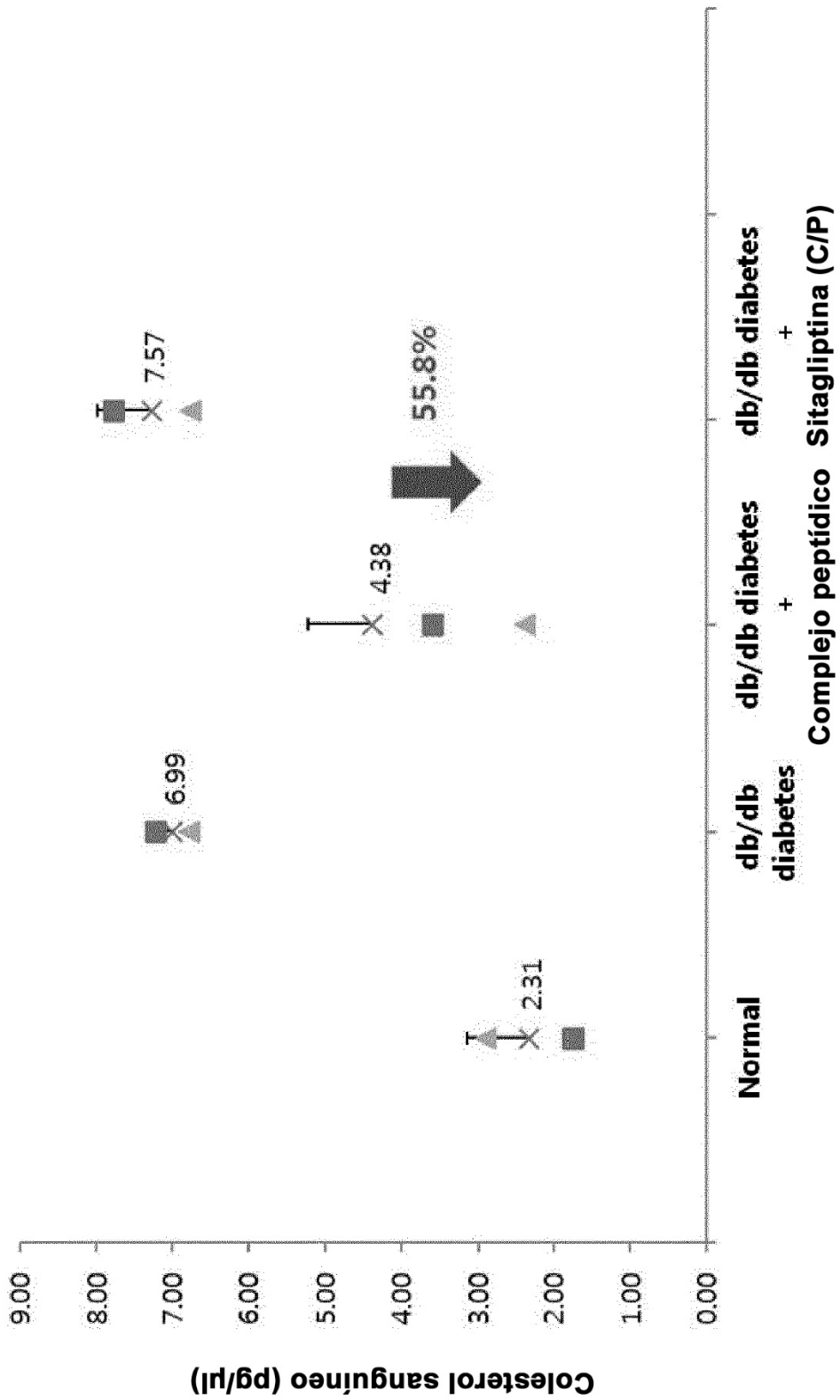


FIG. 21

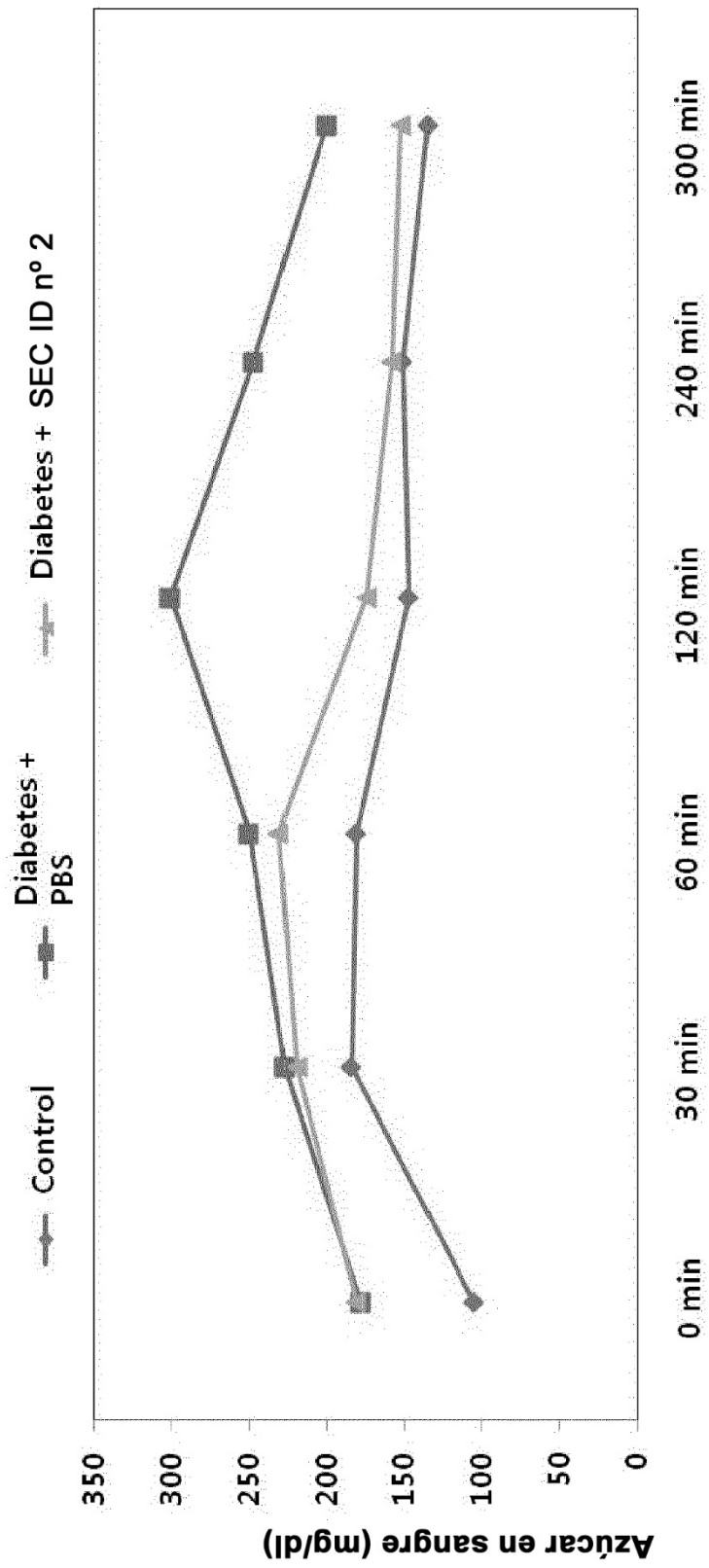


FIG. 22

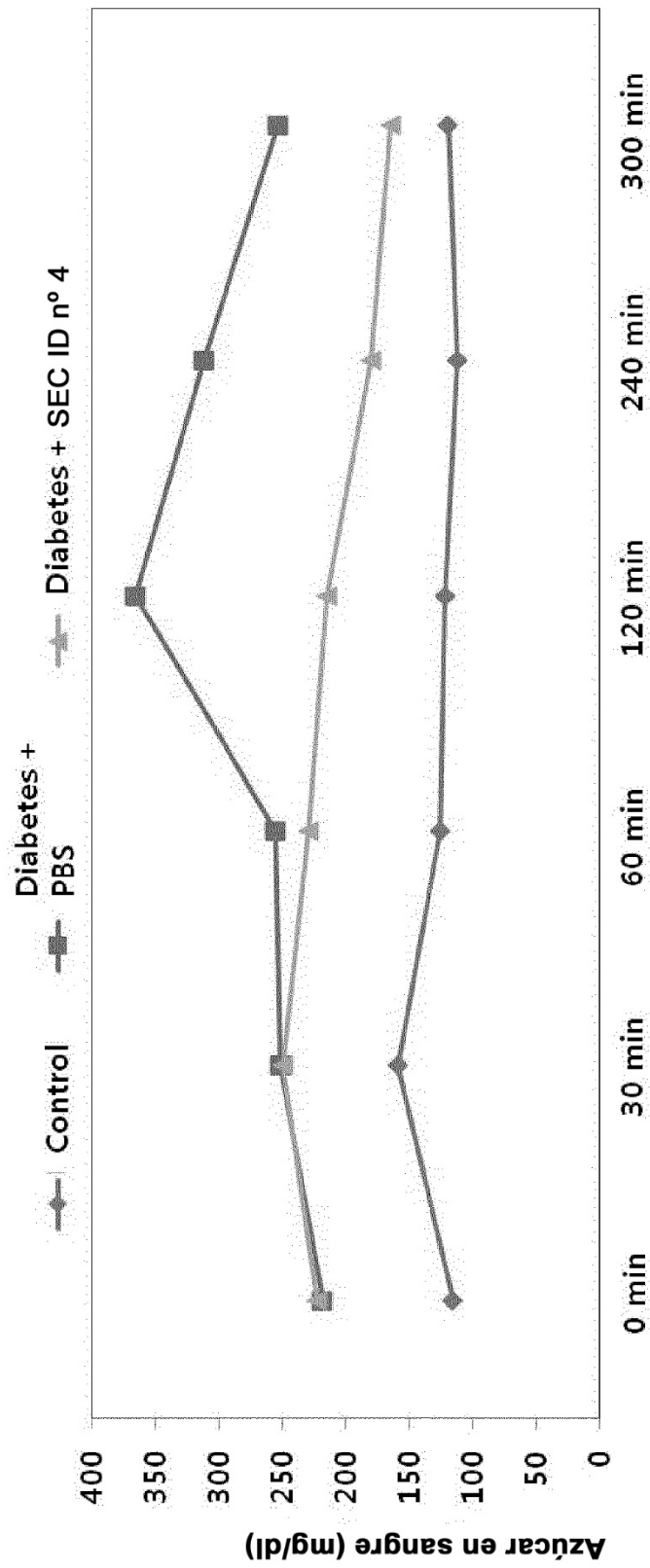


FIG. 23

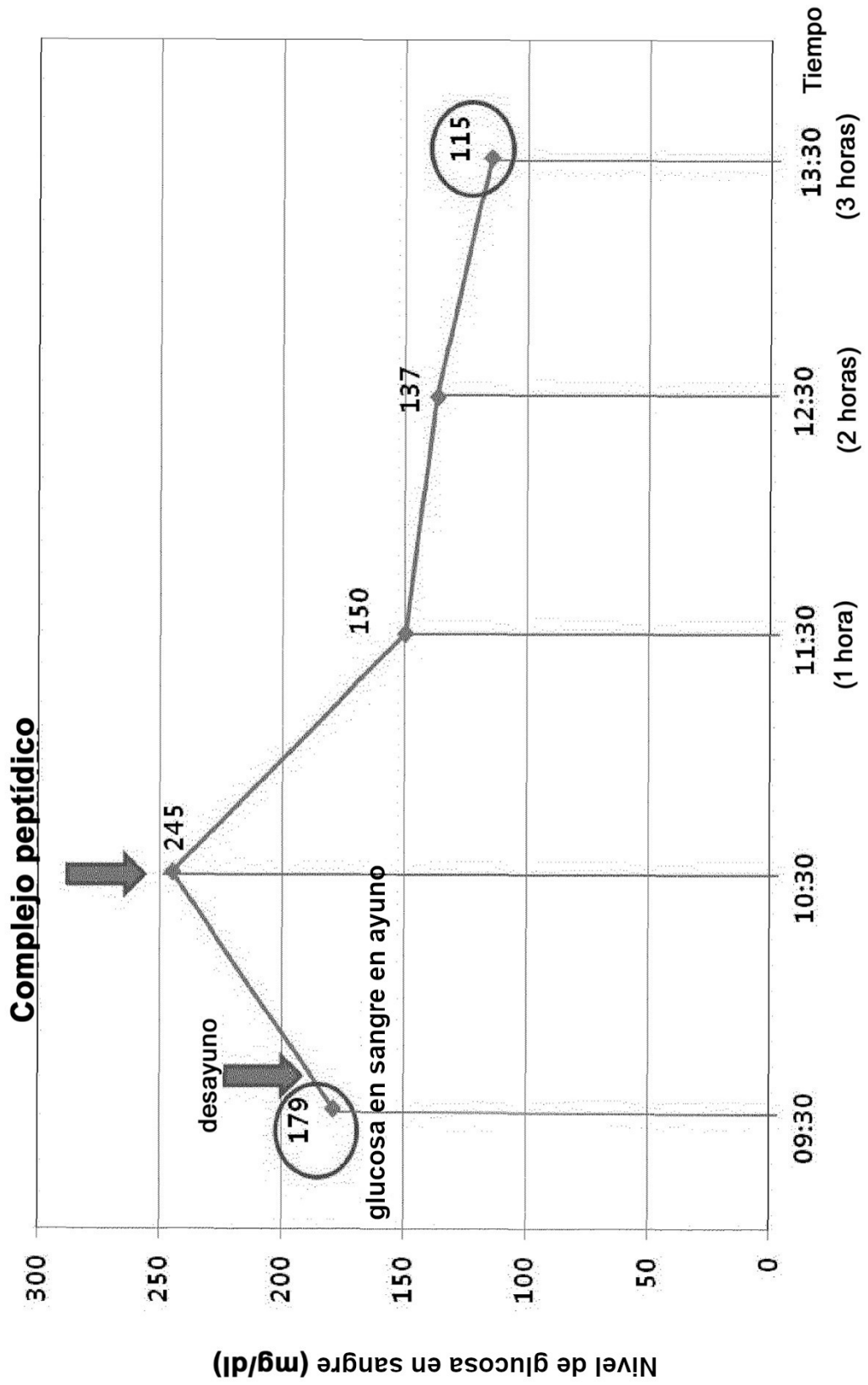


FIG. 24A

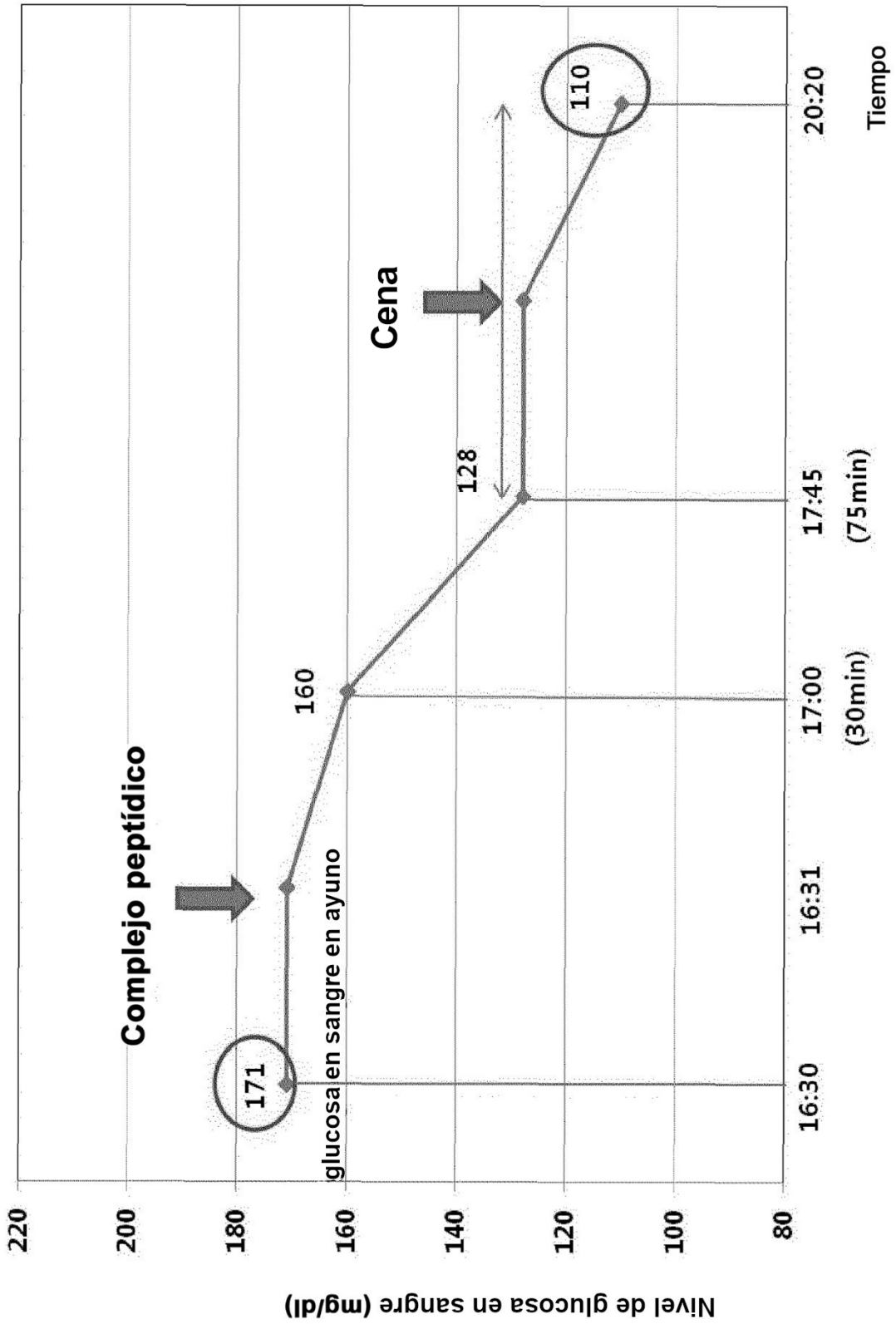


FIG. 24B

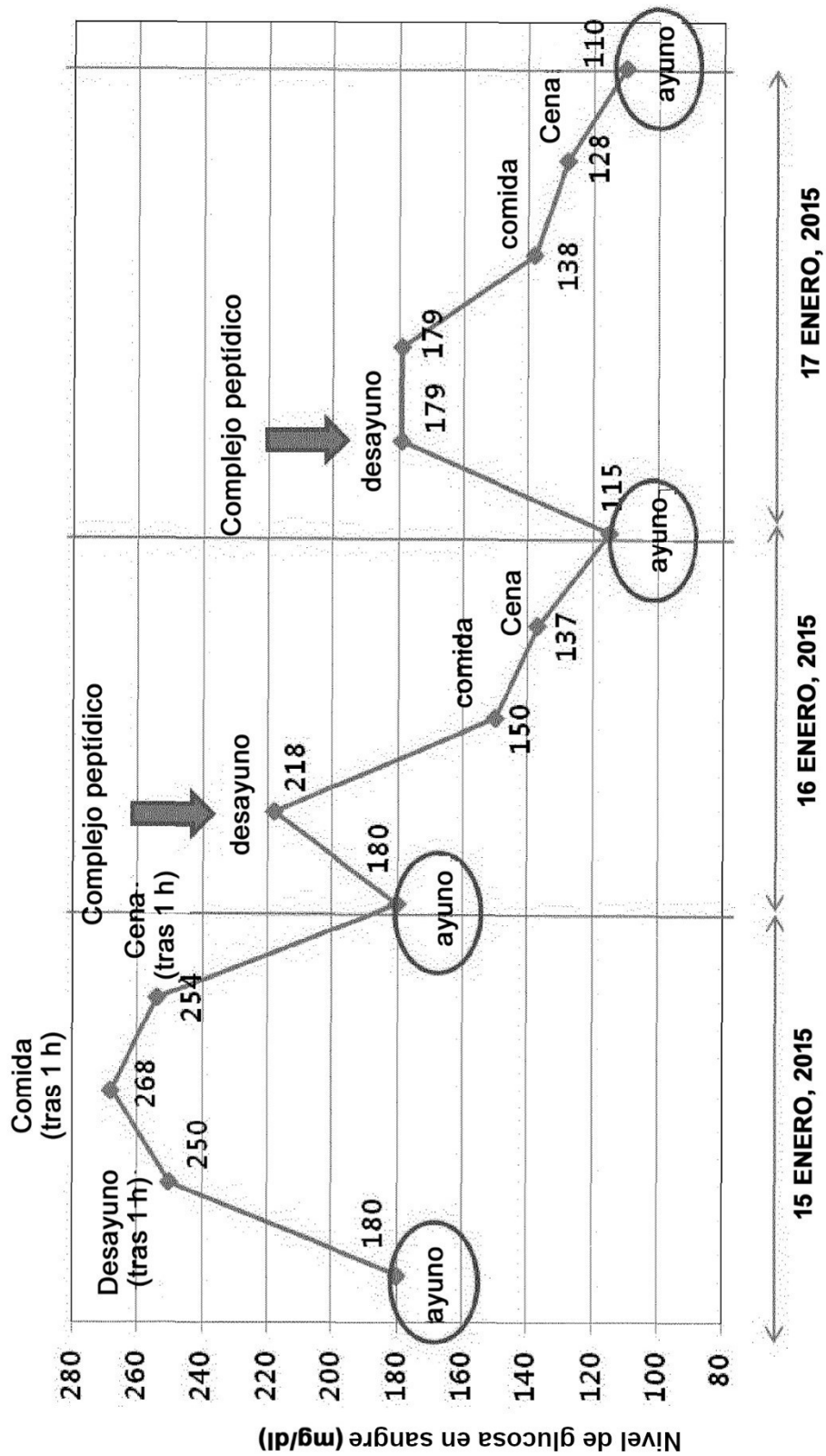


FIG. 24C

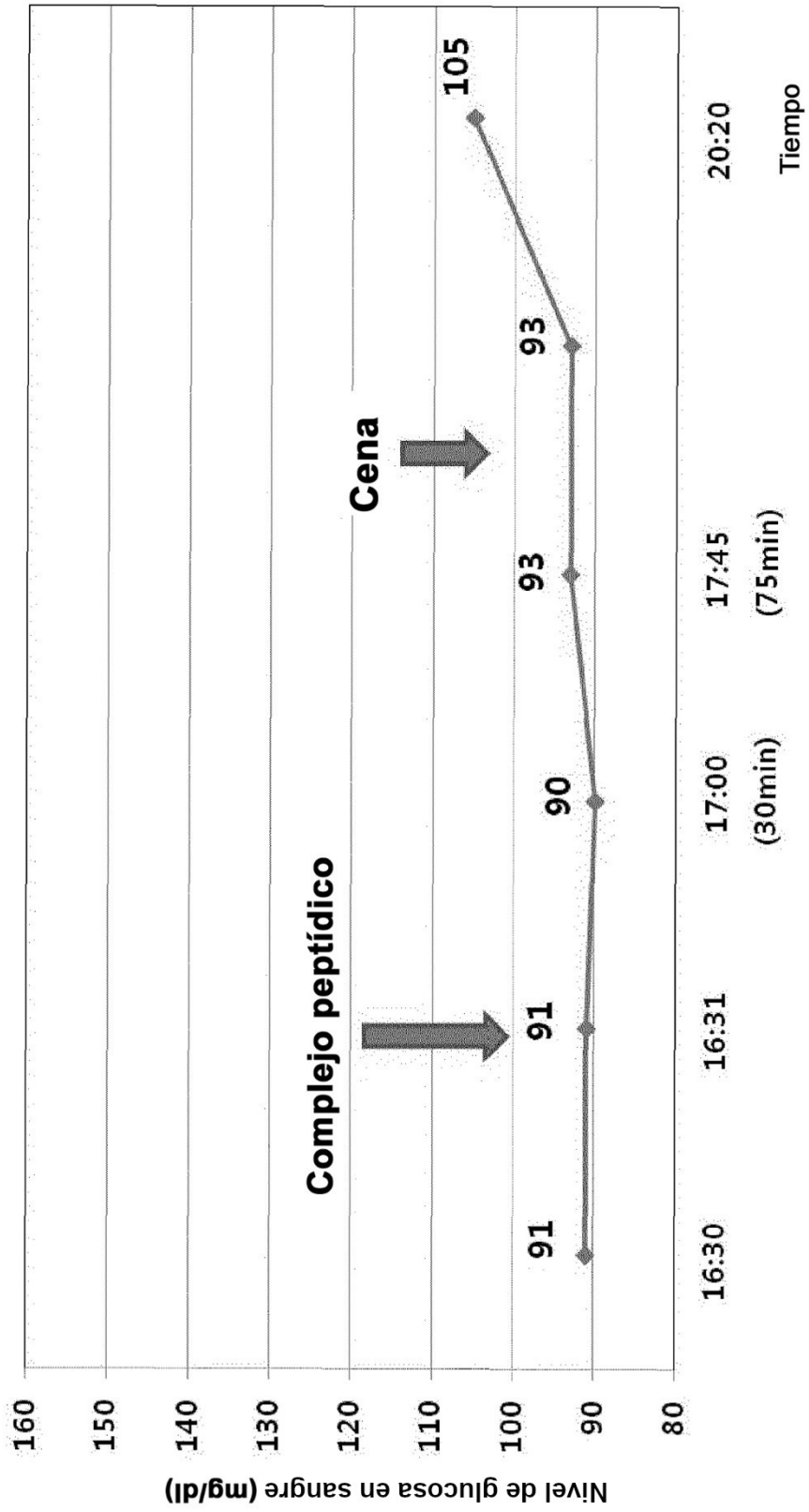


FIG. 24D