

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 556**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2017 PCT/KR2017/002884**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017 WO17179824**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2017 E 17782579 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3444266**

54 Título: **Péptido con eficacia antiobesidad y antidiabética y uso del mismo**

30 Prioridad:

15.04.2016 KR 20160046097

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

13.04.2021

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:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 818 556 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 con eficacia antiobesidad y antidiabética y uso del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un péptido que tiene actividades antiobesidad y/o antidiabética y que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la obesidad y/o la diabetes, comprendiendo la composición farmacéutica, como principio activo, al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en los péptidos, y un uso de los péptidos.

Antecedentes de la técnica

Recientemente en Corea, la ingesta de alimentos con componentes lipídicos ha aumentado debido al crecimiento económico y la vida alimentaria occidentalizada, y las enfermedades metabólicas, tales como obesidad, diabetes, hiperlipidemia, hipertensión, arteriosclerosis e hígado graso, están aumentando debido a la falta de ejercicio o similares. La obesidad puede dañar la apariencia de los tipos de cuerpos delgados que les gustan a los jóvenes, y la obesidad persistente puede causar una variedad de enfermedades.

Los fármacos actuales para tratar la obesidad se pueden dividir en gran medida en medicamentos que actúan sobre el sistema nervioso central para influir en el apetito y medicamentos que actúan sobre el tracto gastrointestinal para inhibir la absorción. Los medicamentos que actúan sobre el sistema nervioso central incluyen, dependiendo del mecanismo de cada medicamento, los que inhiben la serotonina (5-HT) en el sistema nervioso central, tal como fenfluramina y dexfenfluramina, los que actúan sobre la noradrenalina en el sistema nervioso, tal como efedrina y cafeína, y los que actúan tanto sobre la serotonina como sobre la noradrenalina en el sistema nervioso central para inhibir la obesidad, tal como sibutramina. Los medicamentos mencionados anteriormente están disponibles en el mercado.

Además, un ejemplo representativo de los medicamentos que actúan sobre el tracto gastrointestinal para inhibir la obesidad es el orlistat, que reduce la absorción de lípidos al inhibir la lipasa en el tracto gastrointestinal y está aprobado como medicamento para la obesidad. Sin embargo, entre los medicamentos existentes, la fenfluramina y similares se retiraron recientemente del mercado debido a sus efectos secundarios, tales como hipertensión pulmonar o enfermedad de las válvulas cardíacas, y otros medicamentos no se pueden aplicar en pacientes con enfermedades renales o insuficiencia cardíaca debido a la aparición de reducción de la presión arterial, acidosis láctica y similares.

La diabetes es un tipo de enfermedad metabólica en la que se produce una alteración de la secreción de insulina o una ausencia de funciones normales (DeFronzo, 1988), y se caracteriza por hiperglucemia, por ejemplo, aumento de los niveles de glucosa en sangre. La hiperglucemia causa varios síntomas y signos y da como resultado la descarga de glucosa en la orina. En los últimos años, la incidencia de diabetes es una tendencia de crecimiento vertiginoso debido al aumento de las tasas de obesidad, especialmente al aumento de la obesidad abdominal.

En el año 2000 se calculó que el número de pacientes diabéticos era de 170 millones en todo el mundo y se espera que alcance los 370 millones en 2030, pero de acuerdo con un informe de análisis reciente, en 2008 el número de pacientes diabéticos ya había alcanzado aproximadamente 350 millones en todo el mundo (Danaei *et al.*, 2011), lo que es mucho peor de lo esperado. Se informa que aproximadamente un 80 % o más de los pacientes diabéticos de tipo 2 son obesos, mientras que menos de un 10 % de los pacientes obesos tienen diabetes (Harris *et al.* 1987). Tal correlación entre diabetes y obesidad se debe al hecho de que las adipoquinas y los ácidos grasos libres se secretan de manera irregular para inducir la acumulación de ácidos grasos en los tejidos sensibles a la insulina, tales como células beta, riñones, hígado y corazón, dando como resultado lipotoxicidad. Si se deja sin el tratamiento adecuado, la hiperglucemia crónica va acompañada de diversos síntomas patológicos en el organismo, y los síntomas representativos incluyen retinopatía, disfunción renal, neuropatía y trastorno vascular. Para prevenir tales complicaciones es indispensable un control eficaz de la glucosa en sangre. En la actualidad, el control de la glucosa en sangre se consigue mediante la corrección del estilo de vida (terapia dietética o terapia física) y terapia farmacológica. Sin embargo, la terapia dietética o la terapia física es difícil de gestionar y practicar estrictamente, con limitaciones de los efectos de la misma. Por lo tanto, el control de la glucosa en sangre de la mayoría de los pacientes con diabetes depende de medicamentos, tales como insulina, secretagogos de insulina, sensibilizadores a la insulina y agentes hipoglucemiantes, así como de la corrección del estilo de vida.

La insulina que se produce usando un método recombinante se usa como fármaco indispensable para los pacientes diabéticos de tipo 1 y para los pacientes diabéticos de tipo 2 que fracasan en el control de la glucosa en sangre. Tal insulina es ventajosa para el control de la glucosa en sangre, pero tiene las desventajas de aversión a las agujas de las jeringas, dificultad de administración, riesgo de hipoglucemia y aumento de peso.

Las meglitinidas, que son un tipo de secretágo de insulina, son agentes de acción rápida y se toman antes de las comidas, y ejemplos de las mismas incluyen NovoNorm (repaglinida), Fastic (nateglinida) y Glufast (mitiglinida). Los

sensibilizadores a la insulina se caracterizan por hacer que casi no aparezca hiperglucemia cuando se toman solos, y como ejemplo se puede hablar de fármacos de biguanida, como metformina, y fármacos de tiazolidindiona, como Avanida (rosiglitazona) y Actos (pioglitazona).

5 Recientemente, se han desarrollado agonistas de GLP-1 que usan 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 la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), que inhiben la acción de la DPP, una enzima responsable de la inactivación rápida de GLP-1, son fármacos de reciente desarrollo y como ejemplo representativo se puede hablar de Januvia (nombre del ingrediente: sitagliptina).

10 Sin embargo, se informa que estos medicamentos tienen efectos secundarios de hepatotoxicidad, trastornos gastrointestinales, trastornos cardiovasculares y carcinogenicidad, y tales medicamentos causan altos costes de tratamiento anuales, dando como resultado una barrera para el tratamiento de la diabetes. De hecho, en 2007 los costes de atención médica de la diabetes previa y de la diabetes se aproximaron a unos 200 trillones en Estados Unidos (Dall *et al.*, 2010), y en 2008 los costes de atención médica de la obesidad también están cerca de los 150 trillones solo en Estados Unidos (Finkelstein *et al.*, 2009). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar un fármaco que pueda reducir de manera eficaz los niveles de glucosa en sangre y que se pueda aplicar tanto a la diabetes como a la diabetes inducida por obesidad, con pocos efectos secundarios.

20 Sobre todo, los presentes inventores han prestado atención recientemente a los mecanismos de regulación 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 proteínas que influyen en la acumulación de lípidos después de la ingesta de dietas con alto contenido de grasa en seres humanos, con la premisa de que el compuesto que se va a desarrollar debería tener una seguridad más elevada (menor toxicidad). Aunque la investigación sobre señales para suprimir la expresión de proteínas responsables de la acumulación de lípidos y de la degradación de lípidos acumulados y sobre proteínas implicadas en la señalización, los presentes inventores desarrollaron péptidos que estimulan la lipólisis. Además, los péptidos de la presente invención muestran una eficacia terapéutica sobresaliente en la diabetes y la diabetes inducida por obesidad. La acumulación de lípidos inducida por dietas con alto contenido de grasa, la supresión de la señalización de insulina atribuida a la acumulación de lípidos en el hígado o el músculo y la tolerancia a la insulina resultante son causas de diabetes.

Descripción detallada de la invención

Problema Técnico

35 Los presentes inventores intentaron desarrollar una pluralidad de péptidos excelentes con actividad biológicamente eficaz y, como resultado, establecieron que un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 suprime la acumulación de lípidos inducida por una dieta con alto contenido de grasa y degrada el lípido ya acumulado, mostrando de ese modo un efecto antiobesidad así como un efecto hipoglucemiante excelente, y por lo tanto los presentes inventores completaron la presente invención.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y que tiene actividades antiobesidad y/o antidiabética.

45 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar la obesidad, comprendiendo la composición farmacéutica al menos un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

50 Además otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar la diabetes, comprendiendo la composición farmacéutica al menos un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

Solución Técnica

55 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que tiene actividades antiobesidad y/o antidiabética y que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

60 Los presentes inventores intentaron desarrollar una pluralidad de péptidos excelentes con actividad biológicamente eficaz y, como resultado, establecieron que un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 suprime la acumulación de lípidos inducida por una dieta con alto contenido de grasa y degrada el lípido ya acumulado, mostrando de ese modo un efecto antiobesidad así como un efecto hipoglucemiante excelente.

65 El péptido de la presente invención puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y por ejemplo, puede estar constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Los péptidos muestran un efecto antiobesidad excelente al suprimir la acumulación de lípidos, disminuir el tamaño de los adipocitos, y aumentar las expresiones de los factores de lipólisis pHSL, AMPK- α 1, y CGI-58 para degradar los lípidos ya acumulados.

5 Como se usa en el presente documento, el término "obesidad" se refiere a una acumulación excesiva de grasa corporal en el organismo.

Los péptidos reducen la acumulación de lípidos en los adipocitos y degradan la diferenciación en los adipocitos.

10 Los péptidos aumentan la lipólisis. El efecto lipolítico de los péptidos de la presente invención se consigue aumentando las expresiones de la enzima lipolítica, lipasa sensible a hormonas fosforilada (pHSL), y la identificación génica comparativa 58 (CGI-58) del factor de la lipólisis.

15 Los péptidos presentan actividad antiobesidad al regular la expresión del gen de HSL para degradar los triglicéridos almacenados en ácidos grasos y glicerol.

20 Como se muestra a continuación en los ejemplos, los triglicéridos almacenados en los adipocitos se hidrolizan en ácidos grasos libres y glicerol, que a continuación se liberan, cuando los adipocitos se tratan con los péptidos. Estos resultados indican que los péptidos de la presente invención hidrolizan los triglicéridos, que se almacenan en los adipocitos, en ácidos grasos libres y glicerol para liberar los ácidos grasos libres y glicerol de las células.

Además, el tratamiento con los péptidos redujo el contenido de triglicéridos en los adipocitos y aumentó la secreción de glicerol, que son productos de la descomposición de los triglicéridos, de los adipocitos.

25 Además, la expresión génica de HSL, que descompone los triglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol en tejidos adiposos, aumentó con el tratamiento con los péptidos. Por lo tanto, estos resultados indican que los péptidos de la presente invención muestran un efecto antiobesidad por la lipólisis mediante el aumento de la expresión del gen de HSL en tejidos adiposos.

30 El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 tiene un efecto antidiabético excelente porque disminuye eficazmente la glucosa en sangre, aumenta la expresión de la adiponectina y de AMPK, que indican la mejora de la resistencia a la insulina, aumenta la expresión del transportador de glucosa GLUT4 y aumenta la expresión de IRS-1, que es una proteína de señalización del receptor insulínico.

35 Como se usa en el presente documento, el término "diabetes" se refiere a una enfermedad crónica caracterizada por una escasez relativa o absoluta de insulina, que causa intolerancia a la glucosa. En la presente invención la diabetes es preferentemente la diabetes de tipo 2. La diabetes de tipo 2 es la diabetes independiente de la insulina y está causada por una secreción insuficiente de insulina después de la ingesta de alimento o por resistencia a la insulina.

40 Los péptidos aumentan la expresión de la adiponectina en condiciones de resistencia a la insulina. La adiponectina en la sangre disminuye en presencia de resistencia a la insulina, y la adiponectina aumenta cuando la resistencia a la insulina mejora mediante la administración de un medicamento que aumenta la sensibilidad a la insulina (Characteristics of blood adiponectin in newly diagnosed type 2 diabetic patients, 2007, Diabetes Vol. 31, 6). Es decir, los péptidos de la presente invención, que aumentan la adiponectina en condiciones de resistencia a la insulina, muestran un efecto de mejora de la resistencia a la insulina y, por lo tanto, muestran una eficacia preventiva o terapéutica para la diabetes.

45 Además, los péptidos aumentan la expresión de GLUT4 en condiciones de resistencia a la insulina. GLUT4 es un transportador de insulina y, bajo la estimulación por la insulina, GLUT4 en la célula migra hacia la membrana plasmática para favorecer el transporte de glucosa. Por lo tanto, GLUT4 reduce la glucosa en sangre al facilitar la entrada de glucosa en sangre a las células. Es decir, el efecto antidiabético aumenta a medida que aumenta la activación y expresión de GLUT4 implicado en el transporte de glucosa.

50 Además, los péptidos aumentan la expresión de IRS-1 en condiciones de resistencia a la insulina. El sustrato del receptor insulínico 1, 2 (IRS-1, 2) es una proteína de sustrato de insulina, y cuando p85 se une al receptor insulínico 1, 2, la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) se transmite por una sustancia intermedia, como Akt, e induce el transporte de glucosa.

60 Además, los péptidos aumentan la expresión de AMPK- α 1 en condiciones de resistencia a la insulina.

65 AMPK es una enzima que actúa como sensor de la homeostasis energética en las células, y cuando la energía intracelular se reduce por el estrés metabólico o el ejercicio, la AMPK se activa para suprimir un procedimiento de consumo de ATP (por ejemplo, síntesis de ácidos grasos y síntesis de colesterol) y estimular un procedimiento de producción de ATP (por ejemplo, oxidación de ácidos grasos y glucólisis (Hardie DG: AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. Nat Rev Mol Cell Biol 8:774-785, 2007)).

El efecto de la activación de AMPK está implicado en órganos diana (hígado, músculo, grasa, páncreas) estrechamente relacionados con la regulación del metabolismo energético (Zhang BB, Zhou G, Li C: AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 9:407-416, 2009).

La activación de AMPK suprime la síntesis de ácidos grasos y colesterolos y estimula la oxidación de ácidos grasos en el hígado. La activación de AMPK estimula la oxidación de ácidos grasos y la absorción de glucosas en los músculos esqueléticos y suprime la lipólisis y la lipogénesis en los adipocitos. Además, los aumentos de la activación y expresión de AMPK inducen la disminución de la glucosa mediante la supresión de la glucogénesis en el hígado (Foretz M, *et al.*, *Diabetes* 54:1331-1339, 2005, Lochhead PA, *et al.*, *Diabetes* 49:896-903, 2000).

Como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a una molécula lineal formada por restos de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos.

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar mediante 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 técnicas de síntesis en fase líquida (documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.516.891).

Los péptidos de la presente invención pueden tener una modificación inducida en el extremo N-terminal o C-terminal de los mismos con el fin de seleccionar una parte de una secuencia de aminoácidos y aumentar la actividad de los mismos.

Por ejemplo, la modificación en el extremo C-terminal puede ser una modificación del extremo C-terminal del péptido en un grupo hidroxilo (-OH), un grupo amino (-NH₂), un grupo azida (-NHNH₂), o similar, pero no se limita a los mismos.

Además, la modificación en el extremo N-terminal puede ser una unión de al menos un grupo protector seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenil metoxi carbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo, y polietilenglicol (PEG) al extremo N-terminal del péptido, pero no se limita a los mismos. El grupo protector protege al péptido de la presente invención de enzimas de escisión de proteínas *in vivo*.

La modificación en el extremo N-terminal y/o C-terminal de los péptidos mejora la estabilidad de los péptidos, y esta modificación permite que los péptidos de la presente invención tengan un aumento de la semivida en el momento de su administración *in vivo*, presentando de ese modo una semivida elevada.

La modificación de aminoácido mencionada anteriormente funciona aumentando significativamente la estabilidad de los péptidos de la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "estabilidad" se refiere a la estabilidad durante el almacenamiento (por ejemplo, estabilidad a temperatura ambiente) así como a la estabilidad *in vivo*. El grupo protector mencionado anteriormente actúa protegiendo los péptidos de la presente invención del ataque por enzimas de escisión de proteínas *in vivo*.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar la obesidad, comprendiendo la composición farmacéutica, como principio activo, al menos un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

Los péptidos tienen funciones excelentes como inhibir la lipogénesis y descomponer lípidos, y por lo tanto se pueden usar en la prevención y/o el tratamiento de la obesidad.

La composición farmacéutica puede ser una composición farmacéutica que comprende (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido o un compuesto del péptido; y/o (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para conseguir la eficacia o la actividad del péptido mencionado anteriormente.

El vehículo farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica normalmente se usa en el momento de la formulación, y los ejemplos del mismo pueden incluir, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, sirope, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, y/o aceite mineral.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener además un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante, y similares, además de los ingredientes mencionados anteriormente.

Los vehículos y agentes farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).

5 La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía oral o por vía parenteral, y preferentemente por vía parenteral. Los ejemplos de la administración parenteral pueden incluir inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal, administración tópica y administración transdérmica.

10 Una dosis apropiada de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo de diversos factores, tales como el método de formulación, la forma de administración, edad del paciente, peso corporal, género, morbilidad, y la dieta, el momento de la administración, la tasa de excreción, y la sensibilidad de respuesta. Mientras tanto, la dosis preferente de la composición farmacéutica de la presente invención es 0,0001-1000 μg al día.

15 La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en una forma farmacéutica unitaria o en un recipiente de múltiples dosis usando un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con el método realizado fácilmente por una persona con una experiencia habitual en la materia a la que pertenece la presente invención.

20 En el presente documento, la forma farmacéutica puede ser una solución en un medio oleoso o acuoso, una suspensión y/o una emulsión, un extracto, un polvo, gránulos, un comprimido y/o una cápsula, y además puede contener un dispersante y/o un estabilizante, pero no se limita a los mismos.

25 Además de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar la diabetes, comprendiendo la composición farmacéutica, como principio activo, al menos un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

30 Los péptidos de la presente invención disminuyen de manera eficaz el aumento de glucosa en sangre y muestran eficacia en la mejora de la resistencia a la insulina, y por lo tanto se pueden usar en la prevención o tratamiento de la diabetes.

Efectos Ventajosos

35 La presente invención se refiere a un péptido que tiene actividades antiobesidad y/o antidiabética y que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y a una composición farmacéutica, que comprende, como principio activo, al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en los péptidos, para prevenir y/o tratar la obesidad y/o la diabetes. Los péptidos no solo tienen un efecto antiobesidad excelente al suprimir la acumulación de lípidos, disminuir el tamaño de los adipocitos y aumentar la expresión de los factores de lipólisis pHL, AMPK- α 1 y CGI-58 para descomponer los lípidos ya acumulados, sino también un efecto excelente en la diabetes al reducir eficazmente la glucosa en sangre, aumentar las expresiones de la adiponectina y de AMPK, que indican la mejora de la resistencia a la insulina, aumentar la expresión del transportador de glucosa GLUT4 y aumentar las expresiones de IRS-1, que es una proteína de señalización del receptor insulínico. Por lo tanto, los péptidos se pueden usar favorablemente en la prevención o el tratamiento de la obesidad y/o la diabetes.

45 **Breve descripción de los dibujos**

50 FIG. 1a muestra fotografías que confirman, mediante tinción con aceite rojo O, los lípidos acumulados cuando las células se trataron con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

FIG. 1b es un gráfico que confirma, mediante tinción con aceite rojo O, los lípidos acumulados cuando las células se trataron con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

55 FIG. 1c muestra fotografías que confirman, mediante tinción con aceite rojo O, los lípidos acumulados cuando las células se trataron con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

FIG. 1d es un gráfico que confirma, mediante tinción con aceite rojo O, los lípidos acumulados cuando las células se trataron con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

60 FIG. 2a es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la cantidad de secreción de glicerol cuando las células se trataron con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

FIG. 2b es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la cantidad de secreción de glicerol cuando las células se trataron con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

65 FIG. 3a muestra los resultados de la medición del nivel de expresión de CGI-58, que es un gen implicado en el

procedimiento de descomposición de los lípidos acumulados, cuando las células se trataron con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

5 FIG. 3b muestra los resultados de la medición del nivel de expresión de CGI-58, que es un gen implicado en el procedimiento de descomposición de los lípidos acumulados, cuando las células se trataron con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

10 FIG. 4a muestra fotografías que muestran los resultados de la medición del número de adipocitos y el área de los mismos después de tratar los tejidos adiposos del ratón con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

FIG. 4b muestra gráficos que muestran los resultados de la medición del número de adipocitos y el área de los mismos después de tratar los tejidos adiposos del ratón con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

15 FIG. 5a muestra fotografías que muestran los resultados de la medición del nivel de expresión de proteína HSL fosforilada, que es una proteína importante en la síntesis de lípidos, cuando las células se trataron con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

20 FIG. 5b muestra fotografías que muestran los resultados de la medición del nivel de expresión de proteína HSL fosforilada, que es una proteína importante en la síntesis de lípidos, cuando las células se trataron con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

25 FIG. 6a es un gráfico que muestra los resultados de la medición del cambio de la glucosa en sangre cuando se extrajo sangre de ratones a los que se había suministrado una dieta con alto contenido de grasa y un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

FIG. 6b es un gráfico que muestra los resultados de la medición del cambio de la glucosa en sangre cuando se extrajo sangre de ratones a los que se había suministrado una dieta con alto contenido de grasa y un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

30 FIG. 7a muestra los cambios de expresión de adiponectina y GLUT5 después de tratar las células inducidas con resistencia a la insulina con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

35 FIG. 7b muestra los cambios de expresión de adiponectina y GLUT5 después de tratar las células inducidas con resistencia a la insulina con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

FIG. 8a muestra los resultados de la medición de los cambios de expresión de IRS-1 y AMPK- α 1 después de tratar las células inducidas con resistencia a la insulina con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

40 FIG. 8b muestra los resultados de la medición de los cambios de expresión de IRS-1 y AMPK- α 1 después de tratar las células inducidas con resistencia a la insulina con un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

Mejor modo de realización de la invención

45 La presente invención se refiere a un péptido que tiene actividad antiobesidad o antidiabética y que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Mejor modo de realización de la invención

50 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los ejemplos. Estos ejemplos son solo para ilustrar la presente invención más específicamente.

EJEMPLOS

55 Ejemplo de síntesis 1: Síntesis peptídica

Se colocaron 700 mg de resina de cloruro de clorotrilato (resina CTL, N.º de Cat. 01-64-0021 de Nova Biochem) en un recipiente de reacción, y se añadieron 10 ml de cloruro de metileno (MC), seguido por agitación durante 3 minutos.

60 Después de retirar la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF), seguido por agitación durante 3 minutos, y a continuación el disolvente se retiró de nuevo. A continuación se colocaron en el reactor 10 ml de una solución de diclorometano, y a esto se añadieron 200 mmoles de Fmoc-Ser(tBu)-OH (Bachem, Suiza) y 400 mmoles de diisopropiletilamina (DIEA), la mezcla se disolvió bien con agitación, seguido por reacción con agitación durante 1 hora. Después de la reacción, se realizó el lavado, y a continuación el metanol y DIEA (2:1) se disolvieron en diclorometano (DCM) para realizar la reacción durante 10 minutos, seguido de lavado con DCM/DMF (1:1) en

exceso.

Después de retirar la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF), seguido por agitación durante 3 minutos, y a continuación el disolvente se retiró de nuevo. Se colocaron 10 ml de una solución de desprotección (piperidina al 20 %/DMF) en el recipiente de reacción, seguido por agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos, y a continuación la solución se retiró.

Se añadió una cantidad igual de una solución de desprotección, y a continuación la reacción se mantuvo de nuevo durante 10 minutos, y a partir de ese momento, la solución se retiró, seguido de lavado dos veces con DMF, una vez con MC, y una vez con DMF, durante 3 minutos cada uno, preparando de ese modo Ser(tBu)-Resina CTL.

Se colocaron 10 ml de una solución de DMF en un reactor nuevo, y se añadieron 200 mmoles de Fmoc-Lys(Boc)-OH (Bachem, Suiza), 200 mmoles de HoBt, y 200 mmoles de Bop, y la mezcla se disolvió bien con agitación.

Después de añadir 400 mmoles de DIEA al reactor en dos porciones divididas, la agitación se realizó durante al menos 5 minutos hasta que todos los sólidos se disolvieron. La solución mixta de aminoácidos disueltos se añadió al recipiente de reacción que contenía la resina desprotegida en el mismo, y la reacción se realizó con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de retirar el líquido de reacción, la agitación se realizó usando una solución de DMF tres veces durante 5 minutos cada uno, seguido por extracción. Una pequeña cantidad de la resina de reacción se tomó para comprobar el alcance de la reacción usando el ensayo de Kaiser (ensayo de ninhidrina).

La reacción de desprotección se realizó dos veces usando una solución de desprotección de la misma manera que se describió anteriormente, preparando de ese modo Lys(Boc)-Ser(tBu)-Resina CTL. Después de un lavado suficiente con DMF y MC, el ensayo de Kaiser se realizó de nuevo, y a continuación el siguiente ensayo de unión de aminoácidos se realizó de la misma manera que se describió anteriormente.

Una reacción en cadena se realizó en el orden de Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, y Fmoc-Lys(Boc)-OH de acuerdo con la secuencia de aminoácidos seleccionada. El grupo protector Fmoc se retiró por reacción con la solución de desprotección dos veces durante 10 minutos para cada una y a continuación se lavó bien. Después de añadir anhídrido acético, DIEA, y HoBt para realizar la acetilación durante 1 hora, la resina de peptidilo preparada se lavó con DMF, MC, y metanol tres veces cada uno, se secó bajo un flujo lento de gas nitrógeno, y se secó completamente mediante descompresión a vacío en P205. A partir de ese momento, se añadieron 30 ml de una solución de salida [ácido trifluoroacético al 95 % (TFA), agua destilada al 2,5 %, y tianisol al 2,5 %], y la reacción se mantuvo durante 2 horas a la vez que la mezcla se agitaba intermitentemente a temperatura ambiente.

La resina se obtuvo mediante filtración, se lavó con una pequeña cantidad de una solución de TFA, y a continuación se mezcló con la solución de reserva.

Después de realizar la destilación a presión reducida para reducir el volumen total a la mitad, se añadieron 50 ml de éter frío para inducir la precipitación, y a continuación los precipitados se recogieron por centrifugación, seguido de lavado dos veces con éter frío.

La solución de reserva se retiró, seguido por secado suficiente en atmósfera de nitrógeno, sintetizando de ese modo 0,77 g de péptido 1, Lys-Glu-Arg-Lys-Ser, antes de su purificación (rendimiento: 89,2 %). El peso molecular del mismo se determinó como 646,7 (valor teórico: 646,7) usando un sistema de análisis de peso molecular.

Con el método que se ha descrito anteriormente también se sintetizó otro péptido de SEQ ID NO: 2.

[Tabla 1]

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos	Valor del análisis (Espectrómetro de masas)	
		Valor analítico	Valor teórico
1	Lys-Glu-Arg-Lys-Ser	646,7	646,7
2	His-Glu-Thr-Phe-Glu	661,6	661,7

50

Ejemplo 1: Tinción con aceite rojo O

Para medir el efecto inhibitorio de la acumulación de lípidos por los péptidos de la presente invención, las células 3T3-L1 se sembraron en placas de 24 pocillos a 2×10^4 células/pocillo, seguido de cultivo, y a continuación el medio se intercambió por medio de diferenciación que contenía 10 ug/ml de insulina, dexametasona 0,1 uM, e IBMX 0,5 uM, seguido por tratamiento con los péptidos que tenían diferentes concentraciones.

A partir de ese momento, el medio se intercambió por un medio que contenía 10 ug/ml de insulina cada dos días, y el día 9 de la inducción de diferenciación, se realizó un ensayo de tinción con aceite rojo O.

Las células se lavaron con PBS, se inmovilizaron mediante el tratamiento con paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos, se lavaron con agua destilada, y a continuación se cultivaron en isopropanol al 60 % durante 5-10 minutos. Las células inmovilizadas se tiñeron con una solución de aceite rojo [el aceite rojo al 1 % en isopropanol se diluyó en dH₂O en una relación de 6:4 (vol/vol)] durante 30 minutos, y a continuación se lavó de nuevo con PBS. Las células teñidas se observaron mediante un microscopio óptico, seguido de lavado con agua destilada, y a esto se le añadió 1 ml de isopropanol al 100 %, seguido por agitación a 4 °C. Al día siguiente, la cuantificación se realizó a 510 nm.

Como se puede observar a partir de las FIGS. 1a a 1d, mediante la tinción con aceite rojo O se pudo confirmar que el grado de acumulación de lípidos en las células se redujo cuando las células se trataban con los péptidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 2: Ensayo de glicerol (inducción de lipólisis)

Los adipocitos almacenan energía extra en forma de triglicéridos en gotitas lipídicas, y cuando se necesita energía, los triglicéridos son degradados en ácidos grasos y gliceroles por enzimas tales como lipasa adipocítica de triglicéridos, HSL, y lipasa de monoglicéridos, para producir energía, o los triglicéridos se usan en la señalización celular o en la síntesis lipídica. La medición de la liberación de glicerol libre es para evaluar el efecto lítico de los glicéridos acumulados en células de grasa.

Para medir el efecto lipolítico por los péptidos de la presente invención, el tejido adiposo de ratón se extrajo y se cultivó en placa de 100 mm (DMEM) durante un día. A partir de ese momento, el tejido adiposo se cortó en trozos del mismo peso, se transfirió a una placa de 24 pocillos, se trató con los péptidos, y se cultivó durante 48-72 horas. Cada 100 ul del medio se recogieron de acuerdo con el periodo de tratamiento, y se sometieron al ensayo de glicerol. Los resultados se muestran en las FIGS. 2a y 2b.

Como se puede observar a partir de la FIG. 2a, la secreción de glicerol en el tejido aumentó mediante el tratamiento con el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Como también se puede confirmar a partir de la FIG. 2b, la secreción de glicerol aumentó mediante el tratamiento con el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 dependiendo de la concentración del péptido, en comparación con un grupo de control NC. La secreción de glicerol aumentó en un 22 % mediante el tratamiento con péptido a concentración elevada.

Ejemplo 3: RT-PCR para CGI-58

El ARN total se extrajo usando el kit RNeasy de Qiagen. Para la síntesis del ADN monocatenario a partir de ARN, se añadieron 3 mg de ARN, 2 mg de hexámero aleatorio, y agua tratada con DEPC, seguido de reacción durante 5 minutos a 65 °C. El tampón de la primera hebra 5x, DTT 0,1 M, 10 mM de dNTP, y transcriptasa inversa se añadieron para alcanzar un volumen total de 20 ml, seguido de reacción a 42 °C durante 1 hora. Después de calentar a 95 °C durante 5 minutos de nuevo, se añadieron 10 ml de agua destilada para preparar un volumen final, 40 ml, de ADNc.

La PCR se realizó mezclando 3 ml de ADNc, 10 pmoles de cebador específico del gen CGI 58, tampón marcador 10x, dNTP 10 mM, y ADN sintetasa de etiqueta i. Las condiciones de la PCR fueron: 94 °C durante 30 segundos, 55-56 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 30 segundos. Los genes del número de ciclos se analizaron en las condiciones en las que los resultados de la PCR se podían amplificar exponencialmente. Se obtuvieron 5 ml de producto de PCR, tratado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y se tiñó con bromuro de etidio. Los resultados se muestran en las FIGS. 3a a 3c.

[Tabla 2]

SEQ ID NO	Cebador	Secuencia (5'-3')
3	CGI 58_F	TGTGCAGGACTCTTACTTGGCAGT
4	CGI 58_R	GTTTCTTTGGGCAGACCGGTTTCT

Como se puede confirmar a partir de las FIGS. 3a a 3c, como resultado de la confirmación del grado de expresión de CGI 58 intracelular mediante RT-PCR, la expresión del factor de lipólisis CGI-58 aumentó mediante el tratamiento con el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 4: Análisis histológico (inducción de lipólisis)

Se tomó el tejido adiposo del ratón y se cultivó en una placa de 100 mm (DMEM) durante un día. A partir de ese momento, el tejido adiposo se cortó en trozos del mismo peso, se transfirió a una placa de 24 pocillos, se trató con los péptidos y se cultivó durante 48-72 horas. Cada corte de tejido se sometió a tinción con H y E. Los archivos de

fotografías obtenidos a partir de la fotografía microscópica se dividieron en compartimentos mediante Image J y se analizaron usando un programa que puede comparar los tamaños de cada compartimento. Mediante éste, se puede obtener el área del número total de células, y también se puede obtener el área promedio obtenida dividiendo el área entre el número total de células. Los resultados se pueden expresar de manera diferente según el grado de tinción. Sin embargo, la corrección se puede hacer ajustando el valor de umbral al principio, y los resultados se obtuvieron después de eliminar las células con áreas relativamente pequeñas a partir de la comparación con el archivo original.

Como se puede confirmar a partir de las FIGS. 4a y 4b, el número de adipocitos aumentó y el área lipídica se reducía a medida que aumentaba la concentración del péptido de SEQ ID NO: 1.

Un aumento del número de adipocitos por unidad de área puede indicar que el tamaño de los adipocitos, es decir, la acumulación de lípidos en los adipocitos disminuyó.

Ejemplo 5: Tinción inmunohistoquímica (inducción de lipólisis)

Con el fin de investigar un mecanismo por el cual los péptidos de la presente invención estimulan la lisis de triglicéridos para suprimir la acumulación de lípidos en los adipocitos, se examinó el efecto de los péptidos de la presente invención sobre la expresión génica de HSL. La enzima HSL se conoce como una enzima lipolítica que descompone los triglicéridos en ácidos grasos libres y gliceroles cuando la enzima HSL descompone los lípidos en el tejido adiposo. El tejido adiposo del ratón se tomó y se cultivó en una placa de 100 mm (DMEM) durante un día. A partir de ese momento, el tejido adiposo se cortó en trozos del mismo peso, se transfirió a una placa de 24 pocillos, se trató con los péptidos y se cultivó durante 48-72 horas. Cada corte de tejido se sometió a tinción inmunohistoquímica usando anticuerpo anti-pHSL y se fotografió con un microscopio fluorescente. Los resultados Se muestran en las FIGS. 5a y 5b.

Como se puede confirmar a partir de las FIGS. 5a y 5b, la expresión de la lipasa sensible a hormonas (pHSL), que es un factor lipolítico, fue aumentada por el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 6: Evaluación de la eficacia antidiabética (in vivo)

En Central Lab Animal Inc. (Seúl, Corea) se adquirieron ratones C57BL/6J de 6 semanas de edad como animales experimentales y a continuación se usaron para experimentos después de la aclimatación con una dieta normal durante 1 semana. Se usó un alimento rico en grasas de Research Diets, inc. (N.º de producto D12492).

Los animales experimentales se dividieron en un total de cuatro grupos y se criaron tres ratones para cada grupo durante 12 semanas. Como se muestra en la Tabla 3, los grupos experimentales son un grupo normal (grupo sin) alimentado con una dieta normal, un grupo alimentado con una dieta con alto contenido de grasa (grupo NC), un grupo alimentado con una dieta con alto contenido de grasa y un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (administración oral), y un grupo alimentado con una dieta con alto contenido de grasa y comprimido de Januvia (administración oral).

[Tabla 3]

Ratones obesos (macho)		
Grupos experimentales	Dosis	Número de animales
Sin (grupo con dieta normal)	-	3
NC (grupo con dieta grasa al 60 %)	Oral (300 ul)	3
Péptido de SEQ ID NO: 1 (2 mg/ml) (grupo con dieta grasa al 60 %)	Oral (300 ul)	3
Comprimido de Januvia (grupo con dieta grasa al 60 %)	Oral (300 ul)	3
Número total de animales		12

Además, los animales experimentales se dividieron en un total de cinco grupos y se criaron tres ratones para cada grupo durante 12 semanas. Como se muestra en la Tabla 4, los grupos experimentales son un grupo normal (grupo sin) alimentado con una dieta normal, un grupo alimentado con una dieta con alto contenido de grasa (grupo NC), un grupo alimentado con una dieta con alto contenido de grasa y un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (administración oral), un grupo alimentado con una dieta con alto contenido de grasa y un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (administración intraperitoneal), y un grupo alimentado con una dieta con alto contenido de grasa y comprimido de Januvia (administración oral).

[Tabla 4]

Ratones obesos (macho)

Grupos experimentales	Grupos experimentales	Número de animales
Sin (grupo con dieta normal)	-	3
NC (grupo con dieta grasa al 60 %)	Oral (300 ul)	3
Péptido de SEQ ID NO: 2 (2 mg/ml) (grupo con dieta grasa al 60 %)	Oral (300 ul)	3
Péptido de SEQ ID NO: 2 (2 mg/ml) (grupo con dieta grasa al 60 %)	Intraperitoneal (300 ul)	3
Comprimido de Januvia (grupo con dieta grasa al 60 %)	Oral (300 ul)	3
Número total de animales		12

Después del tratamiento previo con un péptido durante 30 minutos, la glucosa (60 mg/300 ul de agua destilada) se administró por vía oral, y a continuación se examinó el efecto de disminución de la glucosa en sangre a lo largo del tiempo. Los resultados se muestran en las FIGS. 6a a 6b y en las tablas 5 y 6.

5

[Tabla 5]

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
SIN	123,00	128,00	119,00	87,00	94,00
	141,00	142,00	126,00	99,00	97,00
Media	132,00	135,00	123,00	93,00	96,00
NC	177,00	187,00	178,00	158,00	140,00
	136,00	163,00	159,00	146,00	133,00
Media	150,33	184,33	165,00	175,33	136,00
SEQ ID NO: 1 (oral)	145,00	203,00	162,00	170,00	130,00
	165,00	190,00	195,00	158,00	115,00
Media	134,67	163,67	142,00	142,67	125,67

[Tabla 6]

	0 min	10 min	40 min	80 min	140 min	200 min
SIN	126,00	123,00	128,00	119,00	87,00	94,00
	150,00	141,00	142,00	126,00	99,00	97,00
Media	138,00	132,00	135,00	123,00	93,00	96,00
NC	177,00	187,00	178,00	158,00	140,00	145,00
	136,00	163,00	159,00	146,00	133,00	148,00
Media	157,00	175,00	169,00	152,00	137,00	147,00
SEQ ID NO: 2 (IP)	145,00	203,00	162,00	170,00	130,00	129,00
	165,00	190,00	195,00	158,00	115,00	94,00
Media	155,00	197,00	179,00	164,00	123,00	112,00
SEQ ID NO: 2 (oral)	159,00	188,00	164,00	163,00	122,00	118,00
	165,00	193,00	157,00	147,00	135,00	126,00
Media	162	191	161	155	129	122

10 Como se puede confirmar a partir de las FIGS. 6a y 6b, el aumento de la glucosa en sangre por la glucosa se redujo en el grupo tratado con el péptido incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en comparación con el grupo NC.

Ejemplo 7: Evaluación de la eficacia antidiabética (Adiponectina y RT-PCR para GLUT4)

15

Después de configurar las condiciones de resistencia a la insulina mediante el tratamiento con TNF- α , el tratamiento con péptido se realizó durante 16 horas, seguido por recogida y a continuación el producto resultante se recogió y los cambios de los respectivos factores se examinaron mediante RT-PCR. Los resultados se muestran en las FIGS. 7a y 7b. Las condiciones de la RT-PCR son las mismas que en el ejemplo 3.

5

[Tabla 7]

SEQ ID NO	Cebador	Secuencia (5'-3')
5	Adiponectina_F	GCCAATCTTCATCCAGTTGC
6	Adiponectina_R	CATCGTGAAGAAGGCATAGG
7	GLUT4_F	AAGATGGCCACGGAGAGAG
8	GLUT4_R	GTGGGTTGTGGCAGTGAGTC

Como se puede observar a partir de las FIGS. 7a y 7b, la expresión de la adiponectina, que se había reducido mediante el tratamiento con TNF- α , aumentó de nuevo mediante el tratamiento con el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Además, la expresión del transportador de glucosa GLUT4, que se había reducido mediante el tratamiento con TNF- α , aumentó de nuevo mediante el tratamiento con el péptido.

10

Ejemplo 8: Evaluación de la eficacia antidiabética (IRS-1 y RT-PCR para AMPK- α 1)

15

Después de configurar las condiciones de resistencia a la insulina mediante el tratamiento con TNF- α , el tratamiento con el péptido se realizó durante 16 horas, seguido por recogida y a continuación el producto resultante se recogió y los cambios de los respectivos factores se examinaron mediante RT-PCR. Los resultados se muestran en las FIGS. 8a y 8b. Las condiciones de la RT-PCR son las mismas que en el ejemplo 3.

20

[Tabla 8]

SEQ ID NO	Cebador	Secuencia (5'-3')
5	IRS-1_F	GCCAATCTTCATCCAGTTGC
6	IRS-1_R	CATCGTGAAGAAGGCATAGG
7	AMPK- α 1_F	TGACCGGACATAAAGTGGCTGTGA
8	AMPK- α 1_R	TGATGATGTGAGGGTGCCTGAACA

Como se puede observar a partir de las FIGS. 8a y 8b, las expresiones de AMPK- α 1 y de la proteína de señalización del receptor insulínico IRS-1, que se habían reducido mediante el tratamiento con TNF- α , aumentaron de nuevo mediante el tratamiento con el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Además, la expresión de AMPK- α 1, que se había reducido mediante el tratamiento con TNF- α , aumentó de nuevo mediante el tratamiento con el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

25

Aplicabilidad industrial

30

La presente invención se refiere a un péptido que tiene actividades antiobesidad y/o antidiabética y que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la obesidad y/o la diabetes, la composición farmacéutica que contiene, como principio activo, al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en los péptidos, y un uso de los péptidos.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CAREGEN CO., LTD.

40

<120> PÉPTIDO CON EFICACIA ANTI OBESIDAD Y ANTIDIABÉTICA Y USO DEL MISMO

<130> ZENCX/P67308EP

45

<150> KR 10-2016-0046097

<151> 15-04-2016

<160> 12

<170> BiSSAP 1.3.6

ES 2 818 556 T3

5 <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido 1
10 <400> 1

Lys Glu Arg Lys Ser
1 5

15 <210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido 2
20 <400>2

His Glu Thr Phe Glu
1 5

25 <210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
30

<220>
<223> Cebador Directo de CGI 58

<400> 3
35 tgtgcaggac tcttacttgg cagt 24

<210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
40

<220>
<223> Cebador Inverso de CGI 58

<400> 4
45 gtttcttgg gcagaccggt ttct 24

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
50

<220>
<223> Cebador Directo de Adiponectina
55

<400> 5
gccaatcttc atccagttgc 20

<210> 6
<211> 20
60

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador Inverso de Adiponectina

 <400> 6
 catcgtgaag aaggcatagg 20

 10 <210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador Directo de GLUT4

 <400> 7
 aagatggcca cggagagag 19
 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador Inverso de GLUT4

 <400> 8
 30 gtgggtgtg gcagtgagtc 20

 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador Directo de IRS-1

 <400> 9
 40 gccaatcttc atccagttgc 20

 <210> 10
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador Inverso de IRS-1
 50
 <400> 10
 catcgtgaag aaggcatagg 20

 <210> 11
 55 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> Cebador Directo de AMPK-alfa 1

 <400> 11
 tgaccggaca taaagtggtc gtga 24

 65 <210> 12
 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Cebador Inverso de AMPK-alfa 1

<400> 12

tgatgatgtg agggcgcctg aaca 24

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 5 2. Un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, teniendo el péptido actividad antiobesidad o actividad antidiabética.
3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido reduce la acumulación de lípidos en adipocitos.
- 10 4. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido aumenta la lipólisis.
5. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido aumenta la expresión de lipasa sensible a hormonas fosforilada (pHSL) o identificación génica comparativa 58 (CGI-58).
- 15 6. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido disminuye el tamaño de adipocitos.
7. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido disminuye la glucosa en sangre.
- 20 8. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido aumenta la expresión de adiponectina, transportador de glucosa de tipo 4 (GLUT4), sustrato 1 del receptor insulínico (IRS-1), o proteína quinasa activada por AMP (AMPK)-al.
9. Una composición farmacéutica que comprende un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 25 10. Un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en medicina.
11. Un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en la prevención o tratamiento de obesidad.
- 30 12. Un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en la prevención o tratamiento de diabetes.
13. Una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 9 para su uso en la prevención o tratamiento de obesidad.
- 35 14. Una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 9 para su uso en la prevención o tratamiento de diabetes.

Fig. 1a

Tinción con aceite rojo O

Siembra del cultivo : 8×10^3 células/placa de 96 pocillos (P7)
Condiciones de cultivo : medio MDI (IBMX 0,5 mM, dexametasona 0,25 μ M,
1 μ g/ml de insulina)
Periodo de tratamiento : MDI durante 8 días, Péptido durante 8 días

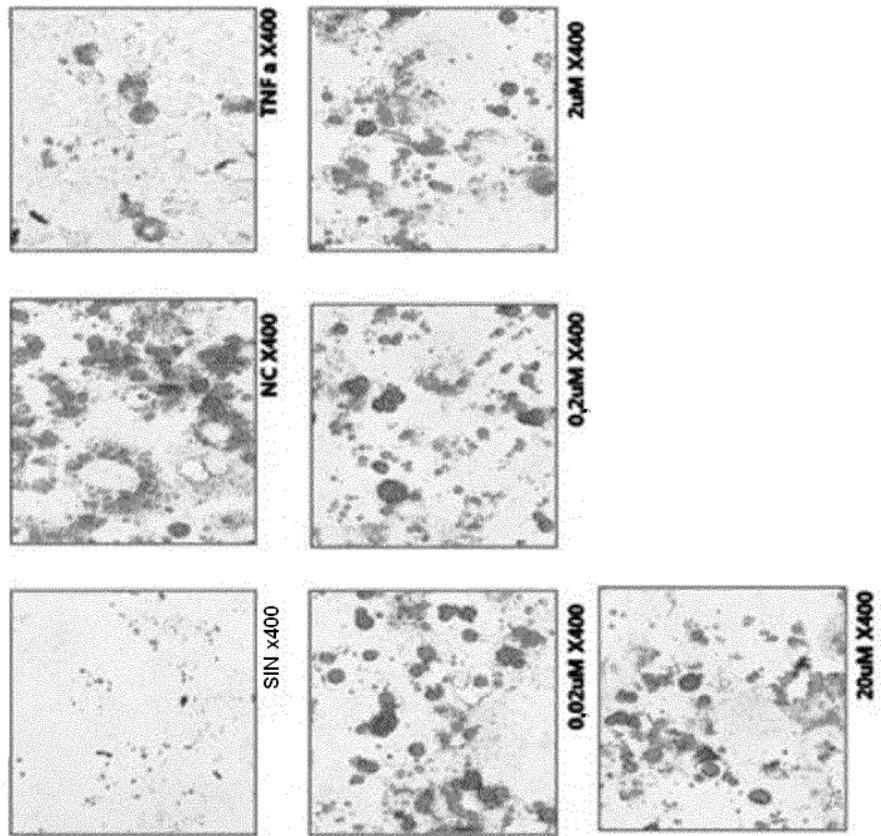


Fig. 1b

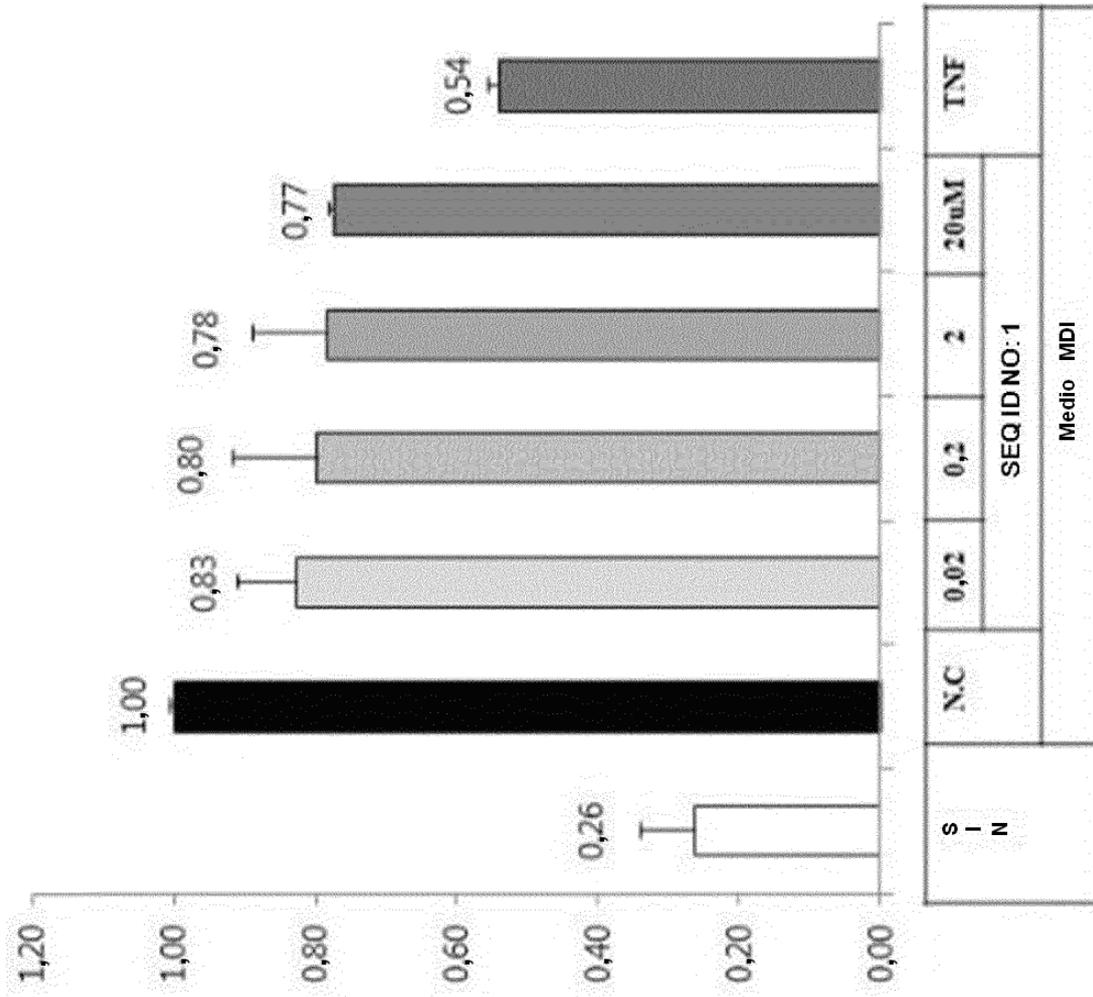


Fig. 1c

Tinción con aceite rojo O

Siembra del cultivo : $3T3-L1$ 8×10^3 células/placa de 96 pocillos (P7)
 Condiciones de cultivo : medio MDI (IBMX 0,5 mM, dexametasona 0,25 μ M,
 1 μ g/ml de insulina)
 Periodo de tratamiento : MDI durante 8 días, Péptido durante 8 días

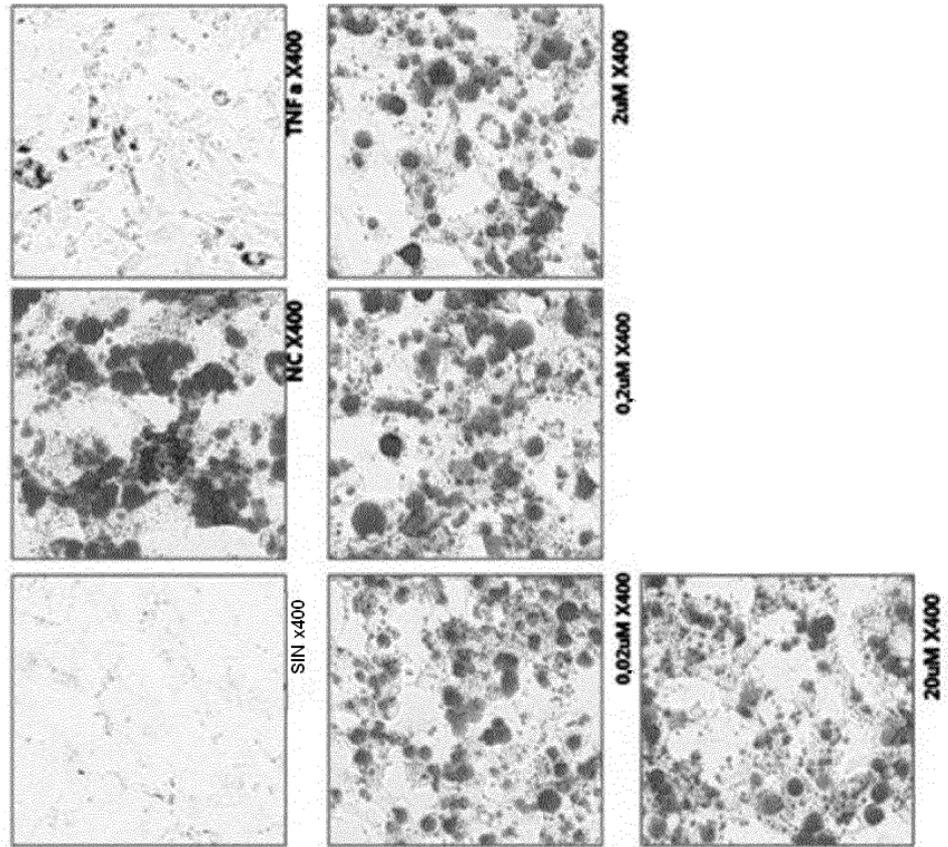


Fig. 1d

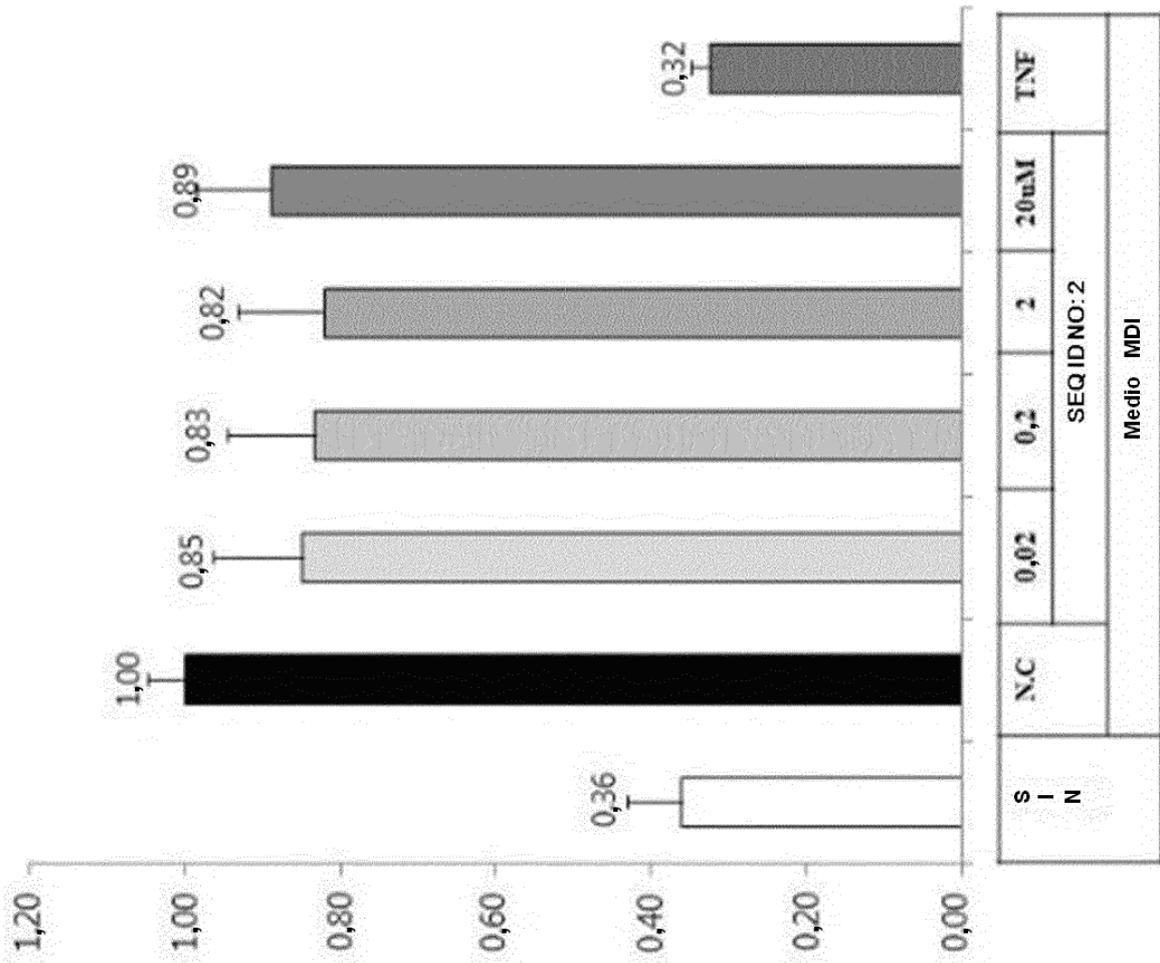


Fig. 2a

Ensayo de glicerol

Condiciones de cultivo: ensayo ex vivo - 140 mg de tejido
(en tampón Ringer de Krebs)

Periodo de tratamiento: Péptido durante 72 h

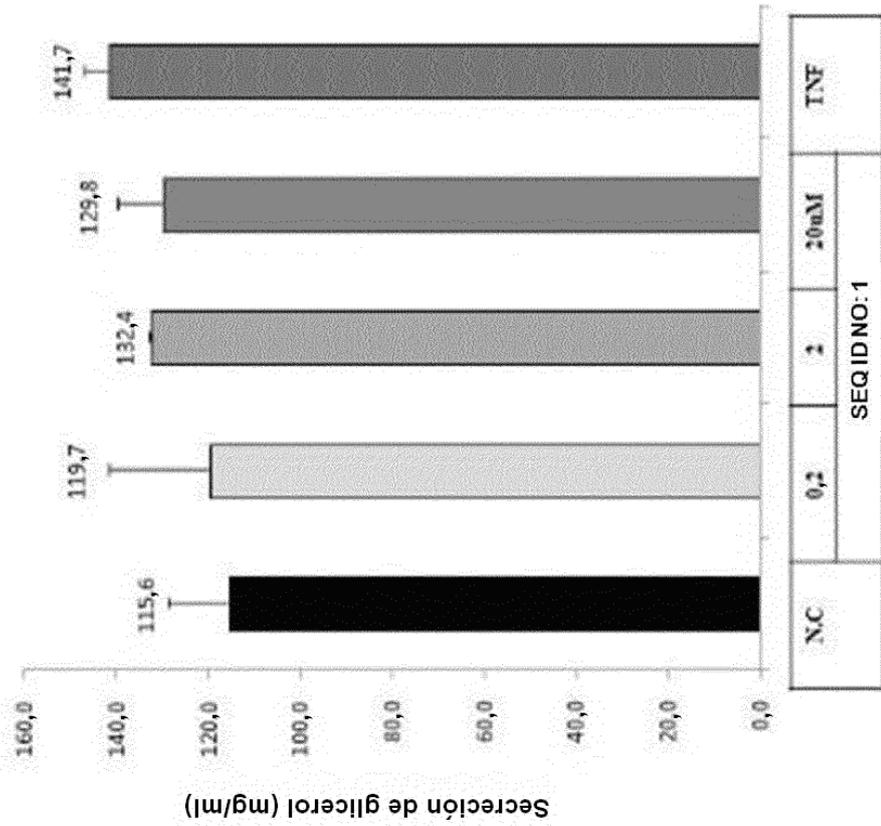


Fig. 2b

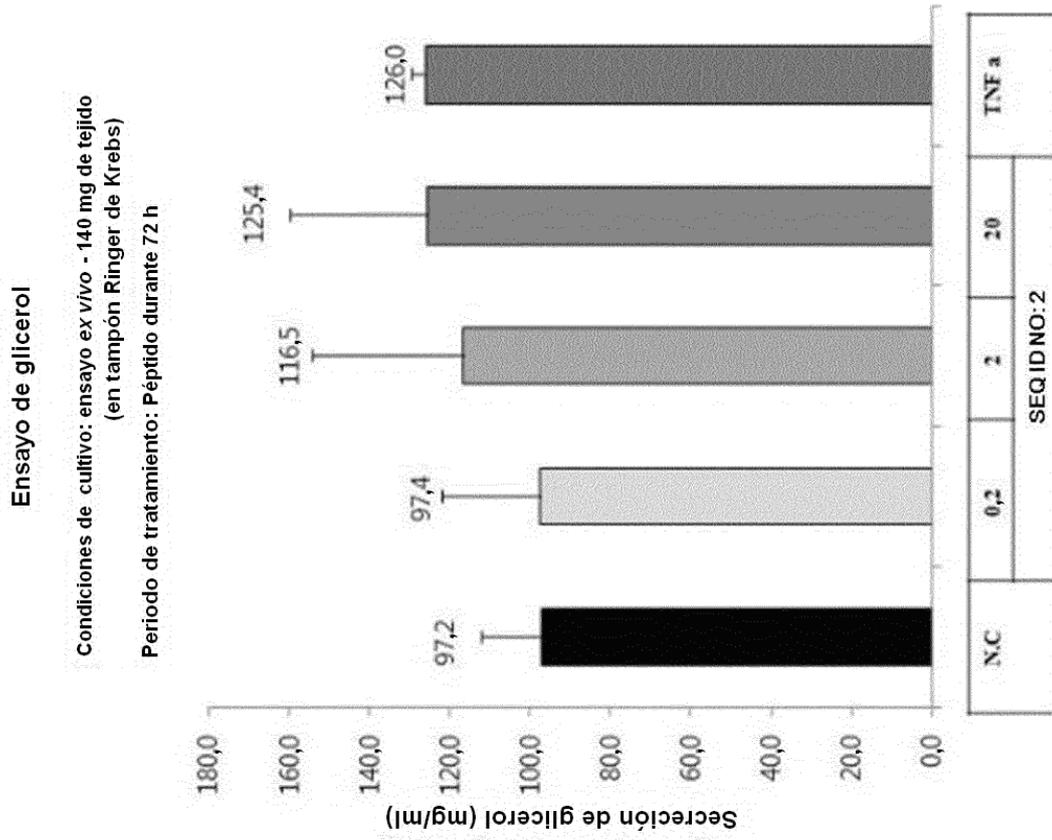


Fig. 3a

RT-PCR

Siembra del cultivo : 1×10^4 5 células/placa de 6 pocillos (P7)
 Condiciones de cultivo : medio MDI (IBMX 0.5 mM, dexametasona 0.25 μ M, 1 μ g/ml de insulina)
 Periodo de tratamiento : MDI durante 3 días, Péptido durante 3 días

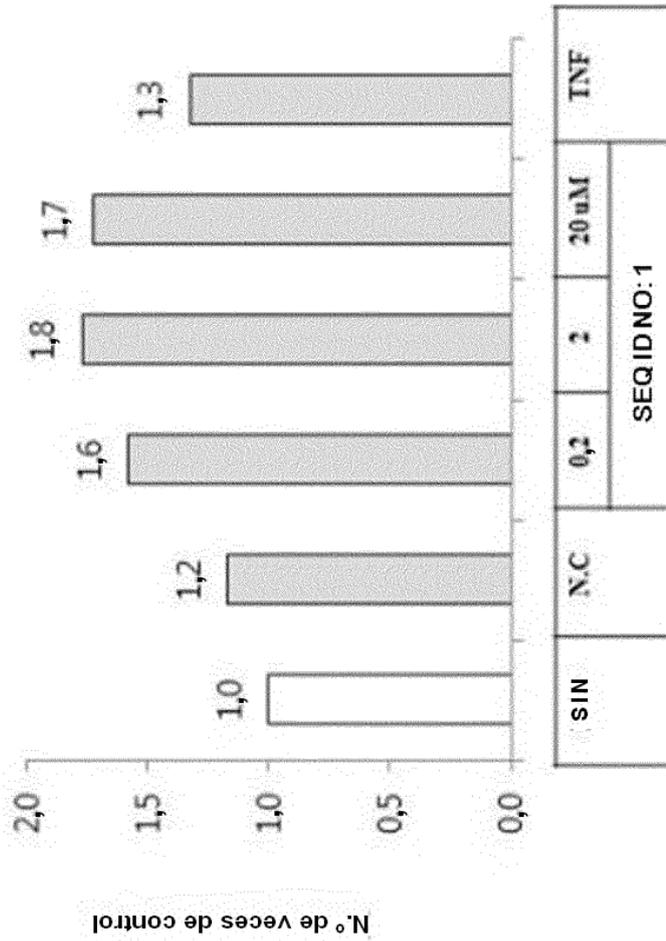
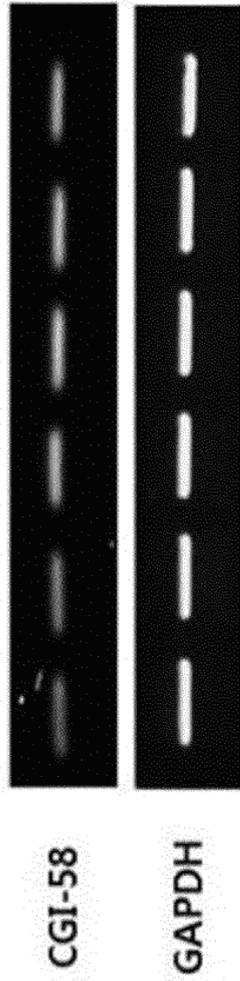


Fig. 3b

RT-PCR

Siembrado del cultivo : 1×10^5 células/placa de 6 pocillos (P7)
 Condiciones de cultivo : medio MDI (IBMX 0,5 mM, dexametasona 0,25 μ M, 1 μ g/ml de insulina)
 Período de tratamiento : MDI durante 3 días, Péptido durante 3 días

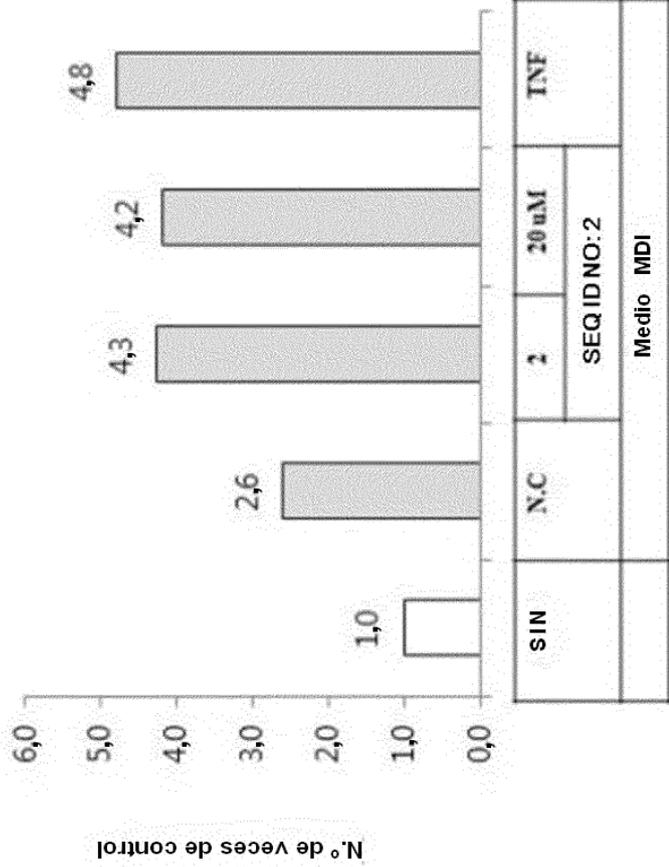
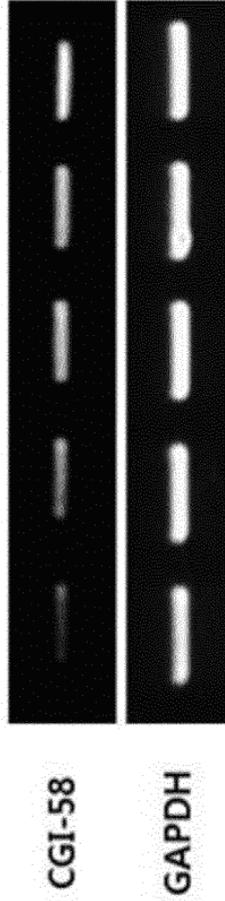


Fig. 4a

Tinción con H y E

Condiciones de cultivo: ensayo *ex vivo* - 140 mg de tejido
(en tampón Ringer de Krebs)

Periodo de tratamiento: Péptido durante 72 h

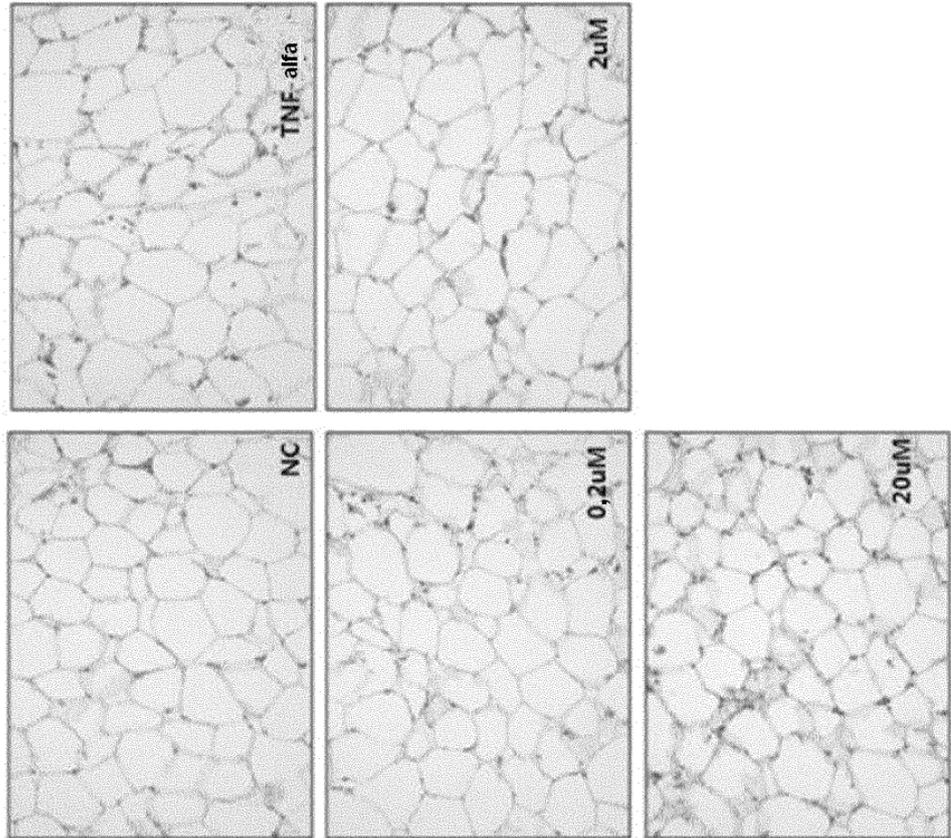


Fig. 4b

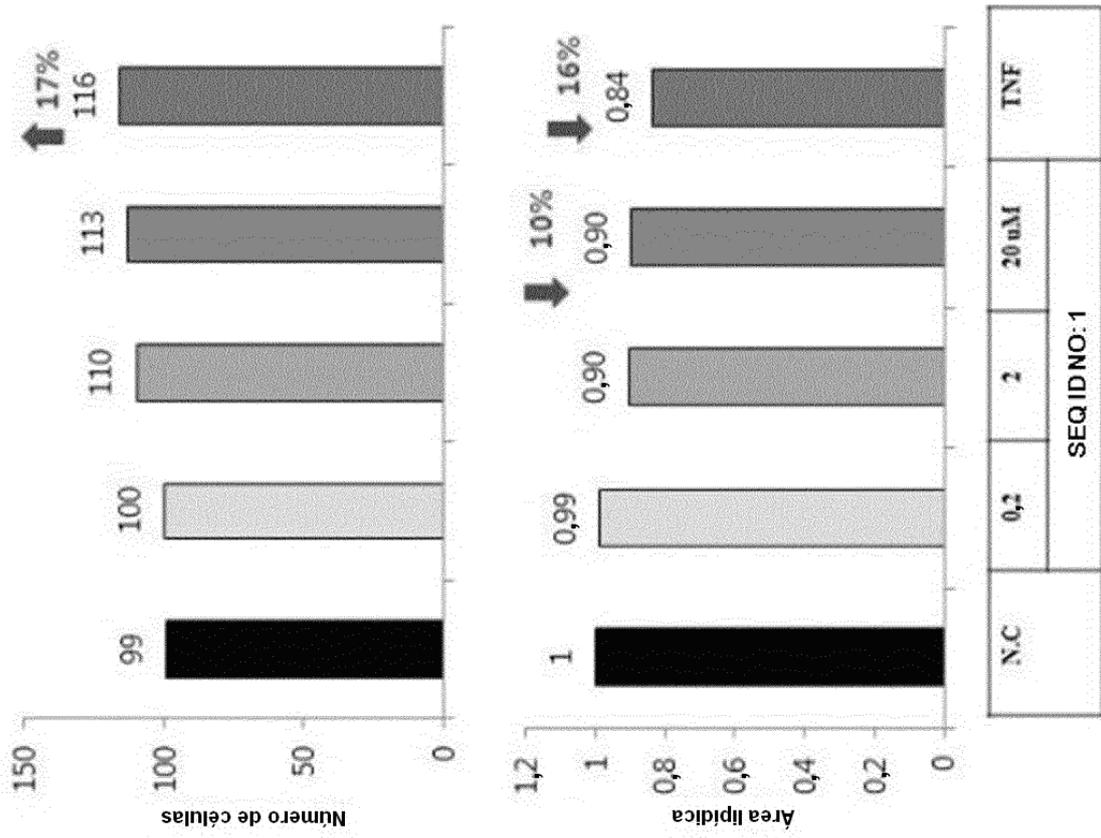


Fig. 5a

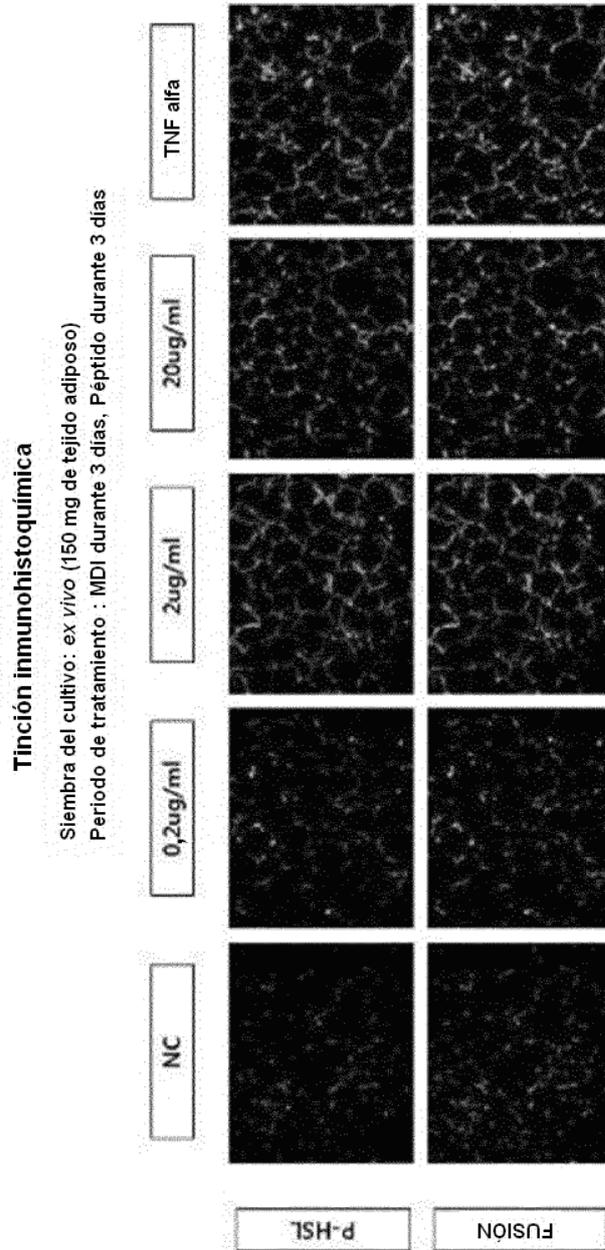


Fig. 5b

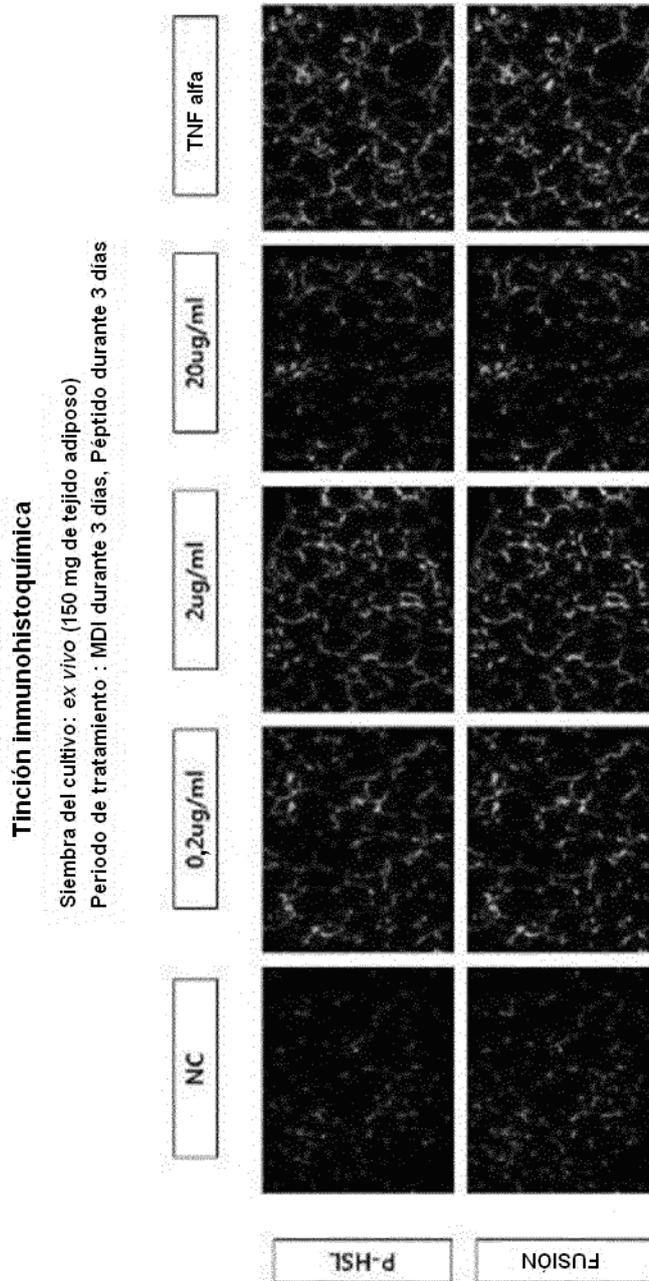


Fig. 6a

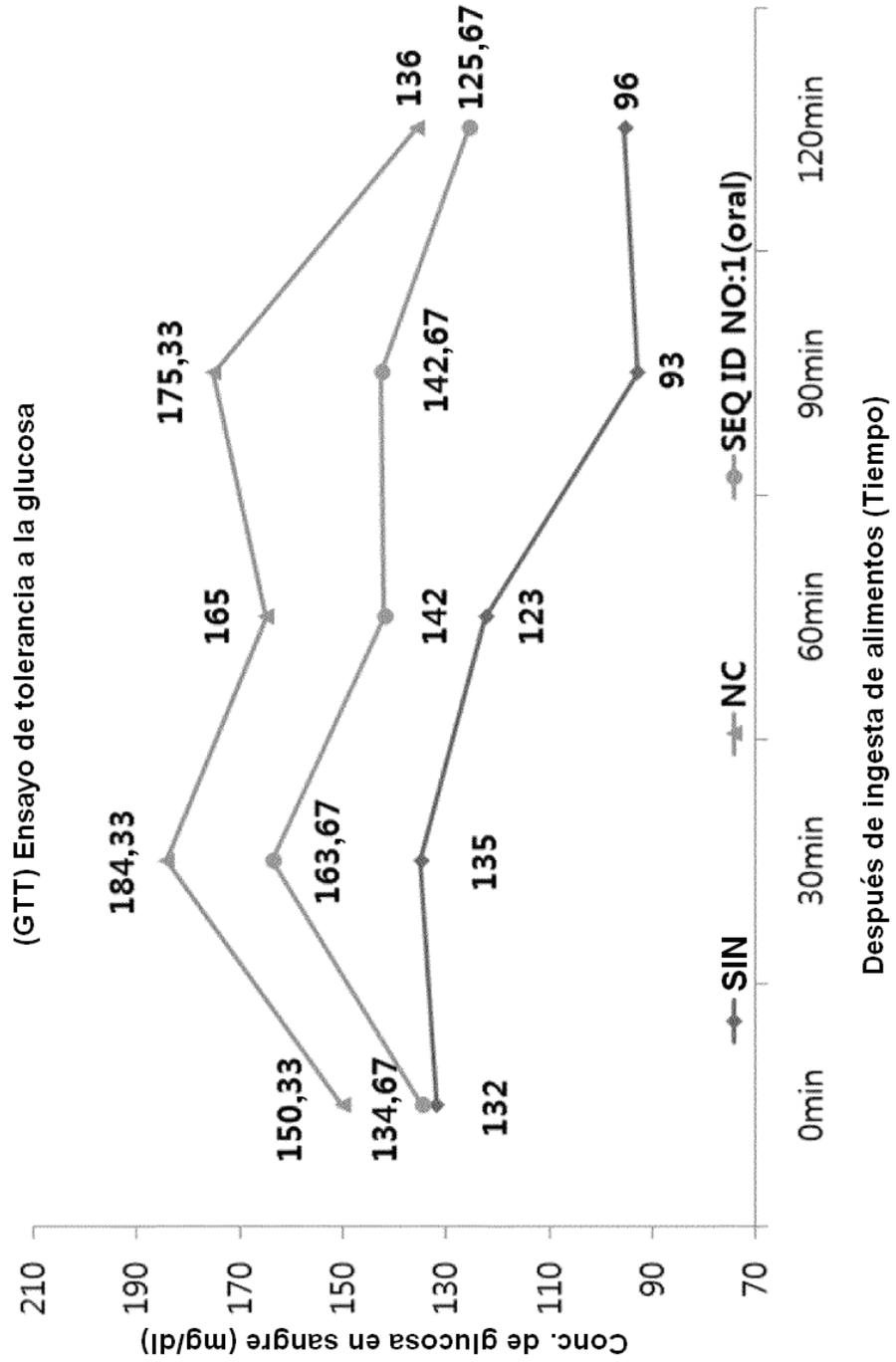


Fig. 6b

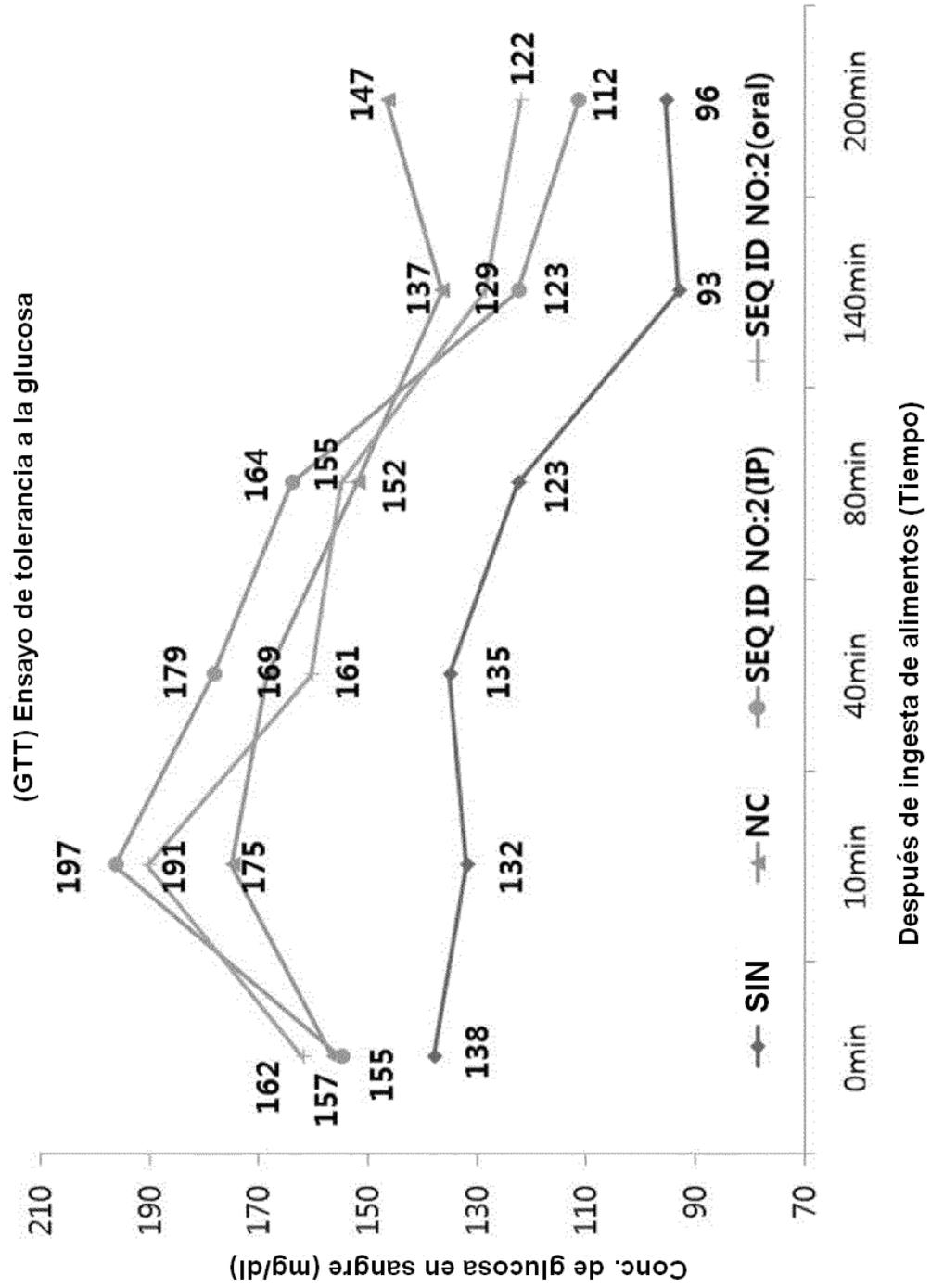


Fig. 7a

RT-PCR

Siembra del cultivo : 1×10^5 células/placa de 6 pocillos (P7)
 Condiciones de cultivo : medio MDI (BMX 0,5 mM, dexametasona 0,25 μ M, 1 μ g/ml de insulina)
 Periodo de tratamiento : MDI durante 3 días + TNF alfa (2 nM) \rightarrow Péptido durante 16 h
 Positivo : isoproterenol (30 μ M)

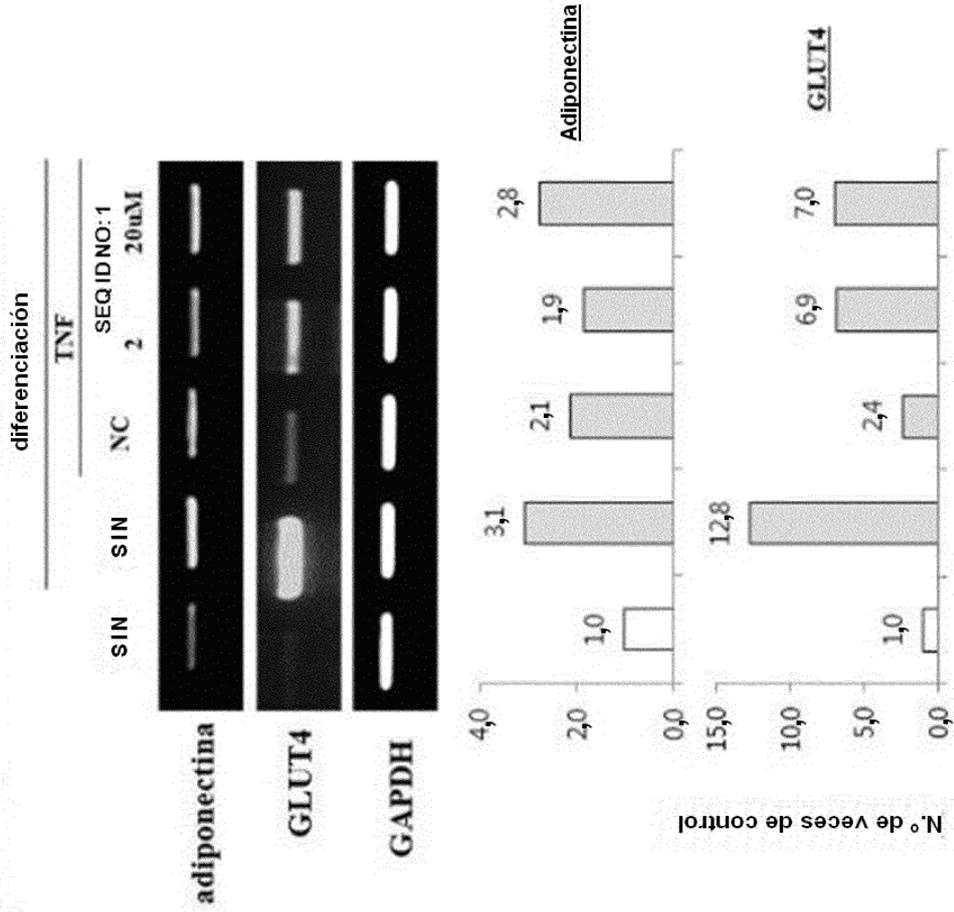


Fig. 7b

RT-PCR

Siembra del cultivo : 1×10^5 células/placa de 6 pocillos (P7)
 Condiciones de cultivo : medio MDI (BMX 0,5 mM, dexametasona 0,25 μ M, 1 μ g/ml de insulina)
 Periodo de tratamiento : MDI durante 3 días + TNF alfa (2 nM) \rightarrow Péptido durante 16 h
 Positivo : isoproterenol (30 μ M)

diferenciación

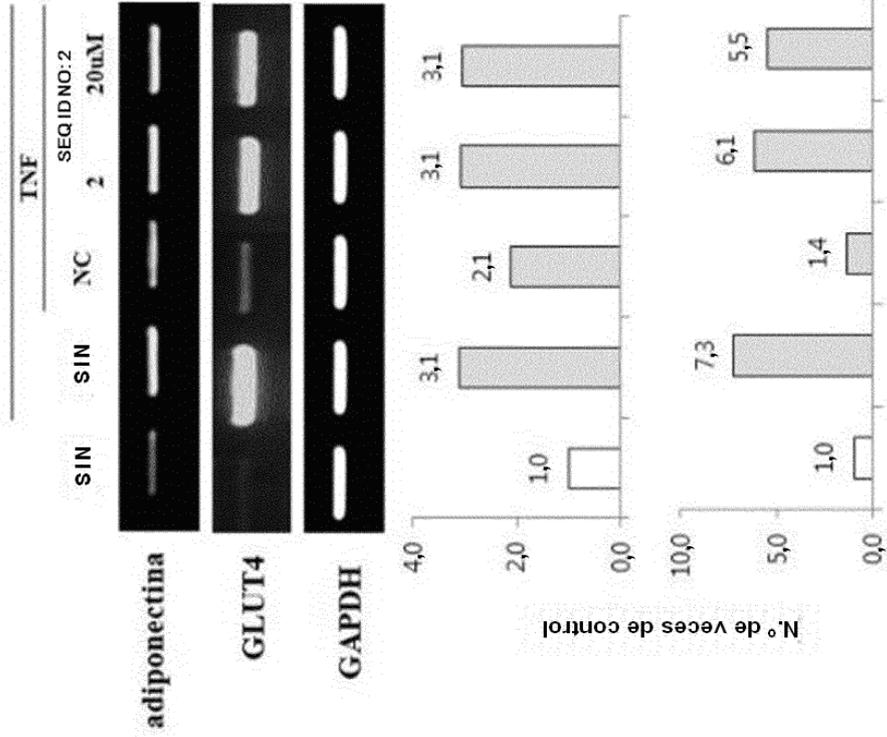


Fig. 8a

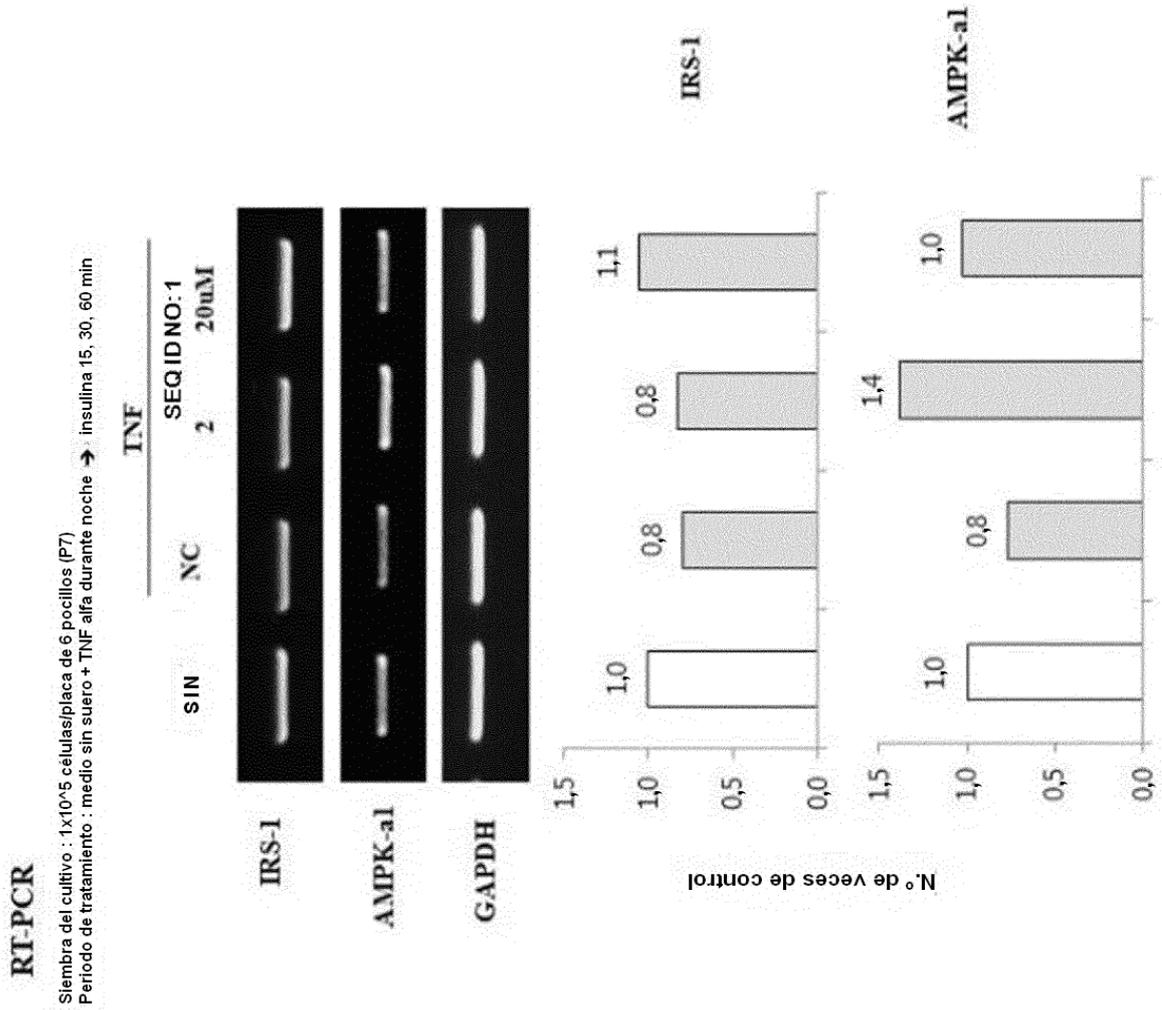


Fig. 8b

RT-PCR

Siembra del cultivo : 1×10^5 células/placa de 6 pocillos (P7)
 Periodo de tratamiento : medio sin suero + TNF alfa durante noche → insulina 15, 30, 60 min

