

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 294**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61P 3/06** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2015 E 15174817 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2990050**

54 Título: **Un polipéptido de Mormodica Charantia para su uso en la regulación de genes relacionados con la inflamación y el metabolismo de lípidos y de glucosa**

30 Prioridad:

**25.08.2014 TW 103129210**

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

**28.02.2020**

73 Titular/es:

**CHINA MEDICAL UNIVERSITY (100.0%)  
No. 91, Hsueh-Shih Road  
Taichung, Taiwan 40402, TW**

72 Inventor/es:

**HO, TIN-YUN y  
HSIANG, CHIEN-YUN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 745 294 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

Un polipéptido de Mormodica Charantia para su uso en la regulación de genes relacionados con la inflamación y el metabolismo de lípidos y de glucosa

5

Campo técnico de la invención

La presente invención divulga el uso de un polipéptido en un medicamento para la regulación de múltiples órganos, múltiples genes y múltiples dianas. El polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 y/o una secuencia de aminoácidos homóloga modificada mediante sustitución, delección o inserción de uno o varios aminoácidos, en donde dicha secuencia de aminoácidos homóloga incluye más del 90 % de identidad con respecto a la secuencia de la SEQ ID No. 1.

10

Antecedentes de la invención

15

A raíz del avance de la tecnología biomédica, muchas investigaciones han revelado los efectos de varios genes, factores de crecimiento, rutas de transducción de señales y dianas en la aparición y progresión de enfermedades. Por lo tanto, el desarrollo de fármacos para la terapia dirigida se puede lograr partiendo de la base del conocimiento de la relación entre dianas y enfermedades. Hasta el momento, la mayoría de los fármacos desarrollados para la terapia dirigida se aplican a la terapia contra el cáncer al suprimir directamente la expresión del oncogén que es la causa principal de la progresión del cáncer. Por ejemplo, el tratamiento de fármacos de terapia dirigida, incluidos Iressa y Tarceva, en pacientes con cáncer de pulmón que portan mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) ofrece el mejor resultado terapéutico y efectos secundarios más leves que la terapia tradicional.

20

Además, el Pemetrexed, desarrollado por Eli Lilly and Company, es la siguiente generación de fármacos contra el cáncer que se enfoca en el metabolismo al afectar a múltiples dianas. El Pemetrexed es capaz de inhibir varias enzimas críticas de la ruta del metabolismo del folato que se requiere para la replicación del ADN y la progresión del cáncer al afectar varias enzimas críticas en el metabolismo del folato. Prácticamente, los ensayos clínicos habían sugerido que el Pemetrexed manifiesta un efecto de supresión significativo en la progresión del cáncer. En el presente documento, los tratamientos con Pemetrexed manifestaron un efecto terapéutico en múltiples tipos de cáncer. Recientemente, el Pemetrexed fue aprobado sucesivamente por la FDA para las terapias del mesotelioma maligno pleural y del cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa avanzada. Además, un ensayo internacional multicentro de fase III a gran escala reveló que el tratamiento de Pemetrexed en combinación con cisplatino mejoraba la eficacia y prolongaba la esperanza de vida de pacientes con mesotelioma maligno pleural que no se podía tratar con un procedimiento quirúrgico. Además, otro ensayo de fase III a gran escala indicó que el tratamiento de Pemetrexed en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estado avanzado con fracaso de la quimioterapia de primera línea. Los resultados mostraron una mejor eficacia y efectos secundarios más leves de Pemetrexed que de Docetaxel, que es la elección habitual como fármaco de segunda línea. Además, los tratamientos de Pemetrexed en varios tipos de tumores malignos, incluyendo el cáncer gástrico, el cáncer de mama y el cáncer de páncreas también revelaron su eficacia evidente. Recientemente, El Pemetrexed manifestó una aplicación más amplia en pacientes con cáncer de pulmón y pacientes con mesotelioma.

25

30

35

40

Los otros estudios indicaron que el CDA-II, una preparación urinaria, también manifestaba el potencial de regular la expresión de múltiples genes. En concreto, el CDA-II es capaz de prevenir la capacidad de proliferación ilimitada de células cancerosas al reparar la anormalidad de los DNMT. Además, el tratamiento de CDA-II también logra el propósito de la terapia contra el cáncer al inducir la apoptosis y la diferenciación terminal. Los resultados del experimento celular sugerían que el CDA-II es capaz de inducir la apoptosis de las líneas celulares de leucemia promielocítica (células HL-60 y células NB4) y de la línea celular de hepatoma (Hep3B). El CDA-II también es capaz de suprimir la actividad de la caspasa 3. De acuerdo con lo observado en experimentos con animales, la reducción del tumor injertado sugería que el tratamiento de CDA-II en los ratones es capaz de regular la expresión de genes relacionados con la proliferación, incluyendo TGF-2, PCNA, c-myc, c-jun, c-fos, y N-ras. Además, el CDA-II arrestó a las células cancerosas en la fase G1 (arresto G1) al regular positivamente la expresión de inhibidores de quinasas dependientes de ciclina como P16, p21 y P27. En cambio, la expresión de citoquinas como la ciclina D1 se regulaba negativamente con el tratamiento de CDA-II.

45

50

55

Además, el CDA-II es capaz de suprimir la angiogénesis y modular la resistencia a fármacos al inhibir las expresiones del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), del factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y del factor de resistencia a fármacos como Her-2/neu. Además, el CDA-2 suprime la metástasis de las células cancerosas al regular negativamente la expresión de proteínas relacionadas con metástasis como MMP-9 e Integrina  $\beta$ 1 (IL- $\beta$ 1). El CDA-II también suprime la progresión del cáncer al inhibir la expresión del receptor activado por proliferador de peroxisomas y (PPAR)<sup>α</sup> para desencadenar la muerte de las células cancerosas.

60

En conjunto, el tratamiento de CDA-II muestra evidencias más generales en comparación con los fármacos tradicionales debido a su capacidad para afectar a múltiples dianas. Suprime el crecimiento y la metástasis del cáncer con efectos secundarios más leves para lograr los propósitos que incluyen una mayor eficacia en la terapia contra el cáncer, mayor esperanza de vida y mejor calidad de vida de los pacientes. Conjuntamente, aunque la composición

65

farmacéutica puede funcionar en una diana diferente o la diana sobre la que funciona la composición farmacéutica puede regular o afectar la progresión de diferentes enfermedades, esta puede tratar diferentes enfermedades mediante la administración de la composición farmacéutica a la diana específica.

5 Los fármacos de terapia dirigida no solo se aplican en la terapia contra el cáncer, sino que también se utilizan para las terapias de otras enfermedades. En otras palabras, las dianas de los fármacos de terapia dirigida no están restringidas a genes y/o proteínas relacionadas con el cáncer. Prácticamente, la composición farmacéutica divulgada en el certificado de patente de Taiwán n.º I360576 se aplica para suprimir la expresión de genes de características propias de una célula madre y genes de resistencia a fármacos para mejorar la eficacia de la radioterapia mediante la inhibición de la expresión de *Sirt1*. La proteína *Sirt1* desencadena la lipólisis en adipocitos maduros para reducir la grasa almacenada en el cuerpo. En el músculo esquelético, los activadores de *Sirt1*, como el resveratrol, pueden activar la expresión del gen *Sirt1* para desacetilar y activar a PGC-1 $\alpha$ . Por lo tanto, el tratamiento de los activadores de *Sirt1* activa los genes que intervienen en la biogénesis mitocondrial y regula los genes en el metabolismo energético.

15 El gen *Sirt1* se encuentra en el cromosoma 10 humano. Los transcritos de *Sirt1* de baja fidelidad en el núcleo y el citoplasma codificarán la proteína *Sirt1* con un peso molecular predictivo de aproximadamente 81,7 kDa. La proteína *Sirt1* es un miembro de la desacetilasa dependiente de NDA de clase III. Dicha proteína controla la modificación epigenética de las proteínas para promover la reparación celular, suprimir la inflamación, proteger las neuronas y la anti-apoptosis para mejorar la salud y prolongar la esperanza de vida.

20 De acuerdo con los estudios anteriores, la proteína *Sirt1* inhibe la expresión génica de UCP2 (proteína de desacoplamiento-2) al unirse a su región promotora para regular la secreción de insulina y el metabolismo de los glucolípidos. En hepatocitos cultivados, la proteína *Sirt1* mantiene la supervivencia celular al promover la glucogénesis hepática a través de la desacetilación de FOXO1. Además, la proteína *Sirt1* también regula a PGC-1 $\alpha$  (PPAR- $\gamma$  Coactivador 1- $\alpha$ ), que es un coactivador de PPAR- $\gamma$  (receptor activado por proliferador de peroxisoma  $\gamma$ ). En su fisiología normal, la proteína *Sirt1* activa a PGC-1 $\alpha$  a través de la interacción directa para elevar la expresión de genes gluconeogénicos hepáticos y promover la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético. Por lo tanto, *Sirt1* es una diana importante para muchos fármacos de terapia dirigida.

30 El certificado de patente de Taiwán n.º 1406668 indicó que la inflamación de la mucosa se suprime mediante la inhibición de NF- $\kappa$ B (factor nuclear-Kappa B) en células epiteliales gástricas infectadas con *Helicobacter pylori*. NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción nuclear y consta de dos subunidades, en donde las subunidades de NF- $\kappa$ B incluyen p50, p65, p52, RelB y c-Rel. De acuerdo con los estudios recientes, El NF- $\kappa$ B juega un papel crítico en la inflamación, apoptosis, necrosis y carcinogénesis. En células no estimuladas, una familia de inhibidores de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) en el citoplasma secuestra a NF- $\kappa$ B para mantenerlo en su forma inactiva. Con la presencia de estímulos, la fosforilación que se produce en I $\kappa$ B inactiva su función negativa y libera a NF- $\kappa$ B. Seguidamente, el NF- $\kappa$ B liberado entra en el núcleo para activar las dianas aguas abajo uniéndose a sus regiones promotoras. Por ejemplo, la inflamación obviamente disminuyó mientras NF- $\kappa$ B se mantuvo en el citoplasma sin presencia de IKK (I $\kappa$ B quinasa) para inhibir la actividad de I $\kappa$ B en la rata knockout para IKK después del traumatismo de médula espinal. En cambio, la presencia de agentes xenobióticos tales como LPS (lipopolisacárido) o factores de secreción liberados por células estimuladas inhibiría la liberación de I $\kappa$ B y activaría NF- $\kappa$ B. El NF- $\kappa$ B activo se translocará al núcleo para activar la expresión de genes de respuesta inflamatoria.

45 Conjuntamente, varios genes, factores de crecimiento y rutas de transducción de señales tales como *Sirt1* y NF- $\kappa$ B, podrían utilizarse como dianas en el desarrollo de un fármaco de terapia dirigida. Sin embargo, las técnicas anteriormente descritas en estas patentes expuestas anteriormente están desarrolladas para la terapia de una sola enfermedad, pero no están diseñadas para múltiples aplicaciones. Para mejorar los defectos y reducir el coste del descubrimiento de fármacos, esta invención divulga el polipéptido para regular las condiciones fisiológicas en múltiples órganos, múltiples genes y de manera que afecta a múltiples dianas. Por ejemplo, la proteína *Sirt1* media la desacetilación en p65 y p62, las subunidades de NF- $\kappa$ B, para prevenir la activación de NF- $\kappa$ B que es capaz de unirse a las regiones reguladoras de los genes de respuesta inflamatoria. Por lo tanto, la proteína *Sirt1* suprime la inflamación al inhibir las expresiones de citoquinas inflamatorias tales como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . El desarrollo de la composición farmacéutica dirigida al intermediario crítico es capaz de mejorar y/o curar las enfermedades relacionadas. La composición farmacéutica con múltiples aplicaciones podría favorecer los intereses públicos y ahorrar costes en el descubrimiento de fármacos.

#### Sumario de la invención

60 La presente invención describe el uso de un polipéptido en un medicamento para la regulación de múltiples órganos, múltiples genes y múltiples dianas, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 o una secuencia de aminoácidos homóloga de la misma obtenida por sustitución, delección o inserción de uno o varios aminoácidos, en donde dicho polipéptido homólogo comprende una secuencia de aminoácidos que incluye más del 90 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID No. 1.

65 La composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del polipéptido para regular múltiples órganos, múltiples genes y múltiples dianas, puede administrarse a un sujeto para prevenir o tratar al sujeto que tiene al menos

una enfermedad seleccionada de un grupo que comprende inflamación y reacciones inflamatorias, síndrome metabólico y obesidad.

5 Con el fin de lograr los objetivos, la presente invención divulga un uso de un polipéptido en un medicamento para la regulación de múltiples órganos, múltiples genes y múltiples dianas, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 o es un polipéptido homólogo obtenido por sustitución, delección o inserción de uno o varios aminoácidos, en donde dicho polipéptido homólogo comprende una secuencia de aminoácidos que incluye más del 90 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID No. 1. Al administrar la composición farmacéutica a un sujeto, se puede prevenir o tratar una enfermedad seleccionada de un grupo que comprende inflamación y reacciones inflamatorias, síndrome metabólico y obesidad a través de la regulación transcripcional de múltiples genes y la expresión de múltiples dianas.

En una realización representativa, la secuencia de aminoácidos del polipéptido es la SEQ ID No. 1.

15 En una realización representativa, el polipéptido es un intermediario para la regulación de la expresión de múltiples genes. Por ejemplo, dichos múltiples genes incluyen al menos un factor de transcripción tal como PPAR- $\gamma$ , NF- $\kappa$ B, *Sirt1* o cualquier forma recombinante de al menos genes de los mismos.

20 En una realización representativa, el factor transcripcional se selecciona del grupo que consiste en los factores de transcripción inflamatorios tales como PPAR- $\gamma$ , NF- $\kappa$ B y *Sirt1*, en donde la enfermedad a prevenir o tratar es el resultado de expresiones anormales de estos factores de transcripción inflamatorios.

#### Leyendas de las figuras

25 La Figura 1 muestra los polipéptidos homólogos extraídos de varias plantas cucurbitáceas con capacidad de regulación glucémica mediante SDS-PAGE.

La Figura 2 muestra el resultado del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 en esta invención, sintetizada con un sintetizador de péptidos automatizado.

30 La Figura 3 muestra el polipéptido recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 en esta invención mediante SDS-PAGE.

La Figura 4A muestra la actividad de luciferasa en los ratones de cada grupo mediante un sistema de imagenología *in vivo*.

La Figura 4B muestra el resultado estadístico del valor de luciferina cuantificado en los ratones de cada grupo.

35 La Figura 5 muestra el valor cuantificado de luciferina detectado en los órganos indicados de los ratones de cada grupo.

La Figura 6 muestra los resultados de la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos frente a p65, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en el órgano de los ratones de cada grupo.

La Figura 7A muestra los resultados de los tejidos hepáticos en los ratones de cada grupo mediante tinción con H&E.

40 La Figura 7B muestra los resultados de la acumulación de grasa hepática en los ratones de cada grupo mediante tinción con Oil-Red.

La Figura 8A muestra los resultados de la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos frente a 4-hidroxiacetona que se realiza en los tejidos hepáticos de los ratones de cada grupo.

45 La Figura 8B muestra los resultados de la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos frente a malondialdehído que se realiza en los tejidos hepáticos de los ratones de cada grupo.

La Figura 9 muestra las vistas dorsales de los ratones experimentales y de los ratones de control.

La Figura 10 muestra la vista general de las bolsas de grasa recolectadas de los ratones experimentales y de los ratones de control.

50 La Figura 11 muestra los resultados de los tejidos adiposos en los ratones experimentales y los ratones de control mediante tinción con H&E.

La Figura 12 muestra los resultados de los tejidos musculares en los ratones experimentales y los ratones de control mediante tinción con H&E.

#### Descripción detallada

55 Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 o una secuencia de aminoácidos homóloga que incluye más del 90 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID No. 1 manifestó potencia para regular las expresiones de múltiples genes y múltiples dianas. En otras palabras, el polipéptido de la SEQ ID No. 1 y/o sus polipéptidos homólogos con más del 90 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID No. 1 tienen las aplicaciones que incluyen:

- 65
- (1) el polipéptido afecta a la expresión de múltiples genes en múltiples órganos;
  - (2) el polipéptido se puede suministrar en la terapia para inflamación y reacciones inflamatorias;
  - (3) el polipéptido puede suprimir la acumulación de lípidos hepáticos;
  - (4) el polipéptido puede inhibir la acumulación de grasa;

Por lo tanto, es posible mejorar o tratar las enfermedades asociadas a múltiples genes o las enfermedades asociadas a múltiples dianas mediante la administración a un sujeto de una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del polipéptido de la SEQ ID No. 1 o sus polipéptidos homólogos, que tienen más del 90 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID No. 1, en donde las enfermedades son el resultado de las disfunciones del metabolismo de lípidos, miogénesis y reacción inflamatoria. Por ejemplo, la enfermedad puede ser inflamación y reacciones inflamatorias, síndrome metabólico y obesidad.

Además, el polipéptido de la SEQ ID No. 1 o sus polipéptidos homólogos, que incluyen más del 90 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID No. 1, podrían obtenerse mediante tecnología de extracción, síntesis artificial o expresarse mediante un modelo de organismo recombinante.

Tal como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado al mismo como se describe a continuación.

La expresión polipéptido homólogo significa el polipéptido derivado que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido con una sustitución, delección o inserción de uno o varios aminoácidos.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente.

La expresión tecnología de extracción significa que la sustancia extraída se aísla del organismo indicado, tal como materiales vegetales gracias a la diferencia de solubilidad en diferentes solventes. En el presente documento, las tecnologías para el aislamiento y la purificación en esta invención son bien conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, el SDS-PAGE se utiliza para separar el polipéptido según el peso molecular predictivo. Además, la cromatografía líquida también se usa para separar los polipéptidos a partir de diferentes filtros de membrana. De acuerdo con los estudios anteriores, varios polipéptidos obtenidos de la extracción líquida de plantas cucurbitáceas manifiestan la función de control glucémico, en donde los polipéptidos para el control glucémico incluyen el polipéptido de la presente invención que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 y sus polipéptidos homólogos. Los materiales vegetales cucurbitáceos incluyen, pero sin limitación, *M. charantia*, *M. charantia* Linn., *C. moschata*, *C. lanatus*, *C. sativus*, *L. siceraria* y *T. Radix*. Además, el resultado del SDS-PAGE en la Fig. 1 revela que los polipéptidos con capacidad de regulación glucémica en la extracción líquida de plantas cucurbitáceas son homólogos. Además, el polipéptido descrito en la presente invención que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 o sus polipéptidos homólogos que incluyen más del 90 % de identidad con la secuencia de SEQ ID No. 1 también podrían extraerse de materiales vegetales no cucurbitáceos. Por ejemplo, las plantas no cucurbitáceas incluyen *Z. elegans*, *M. truncatula*, *C. X paradisi*, *V. vinifera*, *S. nigra*, *O. sativa*, *A. thaliana* y/o cualquier forma recombinante que comprenda al menos dos de sus materiales. Conjuntamente, esto sugiere que la fuente de material para extraer el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 o sus polipéptidos homólogos no está restringida a plantas cucurbitáceas.

La expresión síntesis artificial es conocida por el experto en la materia. Es más, la síntesis artificial es unir de forma secuencial aminoácidos en un polipéptido, en donde los métodos de síntesis artificial incluyen síntesis química de péptidos y sintetizador de péptidos. La síntesis artificial tiene las siguientes ventajas que incluyen la alteración de la estructura primaria del polipéptido durante los procesos de síntesis, la adición de aminoácidos específicos y la modificación del terminal del polipéptido. En general, la síntesis química de péptidos incluye la síntesis de péptidos en fase sólida y la síntesis de péptidos en fase líquida. En el presente documento, se requiere un proceso de purificación de los intermediarios peptídicos sintetizados cuando cada aminoácido se une al péptido en crecimiento en la síntesis de péptidos líquidos. Sin embargo, los intermedios peptídicos purificados suelen ser mezclas que requieren procesos de purificación adicionales mediante cromatografía. Por lo tanto, en la síntesis de péptidos en fase líquida se requieren complicados procesos de aislamiento y purificación para obtener el producto final con alta pureza. La síntesis de péptidos en fase sólida se logra mediante la polimerización de la cadena peptídica que se inmoviliza en pequeñas microesferas porosas (o partículas sólidas) en el disolvente. En la síntesis de péptidos en fase sólida, el extremo amino terminal se conjuga covalentemente en las pequeñas microesferas porosas y se une de forma secuencial con los aminoácidos específicos para sintetizar el polipéptido. Debido a que las microesferas no se disuelven en el disolvente, las microesferas se pueden separar de los reactivos y productos secundarios mediante lavado y filtración. Por lo tanto, la síntesis de péptidos en fase sólida muestra ventajas como una mejor productividad y un menor tiempo de reacción sin la complicada purificación para purificar los intermediarios de péptidos durante el proceso de síntesis en comparación con la síntesis de péptidos en fase líquida.

La expresión modelo de organismo recombinante se refiere a cualquier organismo que haya sido modificado genéticamente o modificado mediante ingeniería genética. El organismo recombinante de la presente invención expresa ADN exógeno que codifica el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 y/o una secuencia homóloga de la misma, en donde el organismo recombinante puede ser tal como *E. coli*, levadura, *Lactobacillus*, etcétera.

La expresión ADN exógeno se refiere al material genético nativo de un organismo que se ha depositado dentro de un organismo hospedador por diversos medios.

Los términos codificación y codificante se refieren al proceso por el cual un gen, a través de los mecanismos de transcripción y traducción, produce una secuencia de aminoácidos. Se entiende que el proceso de codificación de una secuencia de aminoácidos específica incluye secuencias de ADN que pueden conllevar cambios de base que no causan un cambio en el aminoácido codificado, o que conlleven cambios de base que puedan alterar uno o más aminoácidos, pero no afectan a las propiedades funcionales de la proteína codificada por la secuencia de ADN. Por lo tanto, se entiende que la invención abarca más que las secuencias ejemplares específicas. También se contemplan modificaciones de la secuencia, tales como delecciones, inserciones o sustituciones en la secuencia, que producen cambios silenciosos que no afectan sustancialmente a las propiedades funcionales de la molécula proteica resultante. Los términos expresión y expresar se refieren a la transcripción y traducción al producto génico desde un gen que codifica la secuencia del producto génico.

La expresión dosis efectiva se refiere al porcentaje en peso de los compuestos o constituyentes activos en la composición para lograr los efectos previstos. De acuerdo con el buen conocimiento en este campo, la dosis efectiva es diferente debido a diferentes formas de administración para diferentes efectos potenciales. En general, el porcentaje en peso de compuestos o principios activos en la composición es del 1 % al 100 %, en el presente documento, la mejor dosis efectiva es del 30 % al 100 %.

La expresión composición farmacéutica incluye un principio activo farmacéutico dentro de al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica podría formularse en un comprimido, polvo o medicina inyectable para diferente efectividad potencial. Además, el vehículo de la composición farmacéutica podría ser sólido, semisólido o líquido. Por ejemplo, los vectores incluyen, pero sin limitación, gelatina, emulsionante, compuestos de hidrocarburos, agua, glicerol, solución salina, PBS, lanolina, cera de parafina, cera de abeja, aceite de dimetil-silicio y etanol.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos. Estos ejemplos pretenden ser representativos de la invención y no limitar a la misma, sus aplicaciones o sus usos.

Además, el protocolo de uso de ratones que se indica a continuación ha sido revisado y aprobado por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales (IACUC) en la Universidad de Medicina de China.

Ejemplo 1. Preparación del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1

El presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 se prepara mediante síntesis de péptidos en fase sólida, modelo de organismo recombinante o extracción de material vegetal, en donde el presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 mostrada en la figura 2 podría sintetizarse mediante un equipo comercial tal como un sintetizador de péptidos en fase sólida, un sintetizador de péptidos en fase líquida y/o un sintetizador de péptidos por microondas.

Mediante el uso de un biorreactor, el plásmido que contiene ADNc de expresión que codifica el presente polipéptido se transforma en hospedador para expresar el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 mostrada en la figura 3. En el presente documento, los hospedadores para expresar el presente polipéptido en esta invención podrían ser las bacterias incluyendo *E. coli* y/o una levadura. Además, el plásmido se selecciona de los plásmidos comerciales, incluyendo pQStrep2, pQStrep4, pGEX-6p1 y/o pQTEV.

El procedimiento para aislar el presente polipéptido de material vegetal como *Momordica charantia* se muestra como ejemplo para el estudio. En este ejemplo, el presente polipéptido en esta invención se aísla del líquido de extracción de *M. charantia* usando tecnologías bien establecidas tales como SDS-PAGE y cromatografía. El polipéptido aislado se almacena a -80 °C y, si es necesario, se puede añadir un conservante tal como benzoato de sodio o ácido salicílico dependiendo de la situación.

Los procesos para adquirir el extracto de alcohol incluyen las siguientes etapas: Primero, se realizó la maceración de *M. charantia* para obtener la suspensión bruta con un disolvente tal como el PBS, solución tampón de citrato y/o agua. Además, podría utilizarse un homogeneizador y una trituradora para la maceración. A continuación, las partículas sólidas se separaron de la fase líquida mediante centrifugación con 12.000~15.000 revoluciones por minuto (rpm) y filtración a través de la membrana con poros de aproximadamente 0,1~0,5  $\mu\text{m}$  para obtener un sobrenadante. Después, el sobrenadante se pasa secuencialmente a través del filtro de 10 kDa y el filtro de 1 kDa para obtener el filtrado que incluye las aguas madre del extracto con el polipéptido de esta invención. Por ejemplo, los filtros pueden estar disponibles en Amicon o Millipore.

Ejemplo 2. Los experimentos *in vivo* muestran los efectos de múltiples posiciones y múltiples dianas del presente polipéptido.

## Materiales

Ratones: Los ratones FVB de tipo silvestre utilizados en el experimento *in vivo* se adquirieron en el National Laboratory Animal Center. Además, el protocolo de uso de ratones que se indica a continuación ha sido revisado y aprobado por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales (IACUC) en la Universidad de Medicina de China.

Polipéptido: el polipéptido dispuesto en el ejemplo 1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1.

## Métodos

Los ratones FVB de tipo silvestre se dividieron en el grupo de control y el grupo experimental, en donde se administraron diariamente a los ratones en el grupo experimental 20 µl de solución que contiene péptido que contiene 2,5 mmol/kg del péptido de la presente invención durante 7 días. Además, se administraron diariamente a los ratones en el grupo de control 20 µl de solución de PBS durante 7 días.

Después de la administración diaria, se recolectaron los tejidos de columna, músculo, bolsa de grasa, hígado y riñón para analizar la expresión de múltiples dianas mediante análisis de biología sistémica. En el presente documento, las expresiones alteradas de las dianas en el genoma se determinaron mediante el uso de una micromatriz de ADN, que es una herramienta bien establecida para el análisis biológico sistemático. Además, los resultados de la micromatriz de ADN se clasificaron y analizaron adicionalmente mediante análisis bioinformático para determinar el efecto y las rutas de señalización afectadas del presente polipéptido. Por lo tanto, dicho análisis puede determinar las dianas aguas abajo del presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 mediante la investigación del mecanismo a través del análisis de la micromatriz y el perfil de expresión génica. Las etapas detalladas incluyen:

(1) Preparación del ARN: El ARN total se extrajo del tejido utilizando el Mini Kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.). La cantidad de ARN total extraído se midió con un espectrofotómetro Beckman DU800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.). En la etapa siguiente, se evaluó de manera adicional la calidad de la muestra de ARN con una relación A260/A280 superior a 1,8 con un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Cuando el número de integridad del ARN de la muestra es más de 8,0, esta se analizaría mediante el siguiente análisis de micromatriz.

(2) Análisis de micromatriz de ADN: El procedimiento de análisis de micromatrices de ADN se realizó de acuerdo con la referencia (Cheng, 2007). En resumen, se amplificaron 5 µg del ARN total mediante transcripción *in vitro* utilizando el kit de ARN MessageAmp™ (Ambion). A continuación, se marcó químicamente el tinte de fluorescencia, Cy5, en el ARN amplificado (ARNa). Después del marcaje, el ARN marcado con fluorescencia se hibridó con Whole Genome OneArray™ en un tampón de hibridación (Phalanx Biotech Group, Taiwán) en el portaobjetos. Después de la reacción de hibridación a 50 °C durante una noche, se lavó la unión no específica en el chip mediante tres etapas de lavado. El chip lavado se secó por centrifugación y se escaneó con un escáner Axon 4000 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.) para medir las señales de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia de Cy5 en cada punto se analizó adicionalmente mediante genepix 4.1 (Molecular Devices). Primero, las señales de cada punto se ajustaron restando la intensidad del fondo. En la etapa siguiente, se eliminarían los puntos, incluidas las sondas de los controles internos o los puntos con una proporción señal/ruido inferior a 0. Los puntos calificados se normalizaron con el paquete limma que pertenecía a la consola R (Smyth, 2005).

(3). Análisis del mecanismo funcional y las rutas de señalización afectadas mediante el uso de programas bioinformáticos: Las dianas aguas abajo alteradas, mecanismos funcionales, rutas de señalización afectadas y relevancia de la enfermedad se investigaron mediante el uso de programas bioinformáticos como Medical Subject Headings (MeSH, <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>) y BiblioSphere Pathway Edition.

Los resultados del análisis bioinformático se muestran en la tabla 1. Los resultados sugerían que el presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 en esta invención realmente realizó sus funciones, que afectan a las rutas de señalización y a la aparición de enfermedades a través de múltiples órganos y de manera que afecta a múltiples dianas.

ES 2 745 294 T3

Tabla 1. El perfil de expresión alterado de las dianas que participan en diversas rutas de señalización en los órganos indicados.

Órganos	Señal	P	Genes representados		
			Genes	Descripción del gen	Cambio en veces
	ruta	valor			
	Ruta de señalización de IL-1 $\beta$	6,48E-03	Ccl2	Ligando 2 de quimioquina (motivo C-C)	1,71 veces regulados negativamente
Icam1			Molécula de adhesión intercelular 1	2,27 veces regulados negativamente	
Pecam1			Molécula 1 de adhesión a células endoteliales/plaquetarias	1,99 veces regulados negativamente	
Tnfrsf11b			Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 11b (también conocido como factor inhibidor de la osteoclastogénesis)	2,74 veces regulados negativamente	
Cdh2			Cadherina-2	1,73 veces regulados negativamente	
Columna	Ruta de señalización del TNF	5,21E-06	Bcl3	Linfoma de células B 3	1,72 veces regulados negativamente
			Mapk3	Proteína quinasa activada por mitógeno 3	2,32 veces regulados negativamente
			Tnfrsf11b	Superfamilia 11B del receptor del factor de necrosis tumoral (también conocido como factor inhibidor de la osteoclastogénesis)	2,74 veces regulados negativamente
			ADIPOQ	Adiponectina, Contiene el dominio C1Q y colágeno	1,78 veces regulados negativamente
			Casp3	Caspasa-3	1,71 veces regulados negativamente
			Ikbke	Inhibidor de la quinasa kappa épsilon	1,95 veces regulados negativamente
			Irs1	Sustrato 1 del receptor de la insulina	1,73 veces regulados negativamente
			Mapk9	Proteína quinasa activada por mitógeno 9	1,53 veces regulados negativamente
			Rxra	Receptor X retinoide alfa	1,89 veces regulados negativamente
			Ltf	Lactotransferrina	1,99 veces regulados negativamente
			Socsl	Supresor de la señalización de citoquinas 1	2,46 veces regulados negativamente
			CD40	Antígeno de superficie celular, CD40	1,79 veces regulados negativamente

(continuación)

Órganos	Señal	P	Genes representados		
	ruta		valor	Genes	Descripción del gen
Músculo	Ruta de señalización del IGF	2,65E-03	Mdk	Midquina	3,46 veces regulados positivamente
			Mmp13	Metaloproteínasa de matriz 13	3,08 veces regulados positivamente
			Spp1	Fosfoproteína secretada 1	3,61 veces regulados positivamente
			Vegfa	Factor de crecimiento del endotelio vascular alfa	1,51 veces regulados positivamente
			Cabinl	Proteína de unión a calcineurina 1	2,49 veces regulados positivamente
			Igfbp5	Proteína 5 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina	1,99 veces regulados positivamente
			Myh1	Miosina, polipéptido pesado 1, músculo esquelético, adulto	3,24 veces regulados positivamente
			Irs1	Sustrato 1 del receptor de la insulina	3,71 veces regulados positivamente
			Map2k2	Proteína quinasa activada por mitógeno 2	1,65 veces regulados positivamente
			Nfatc3	Factor nuclear de células T activadas, citoplásmico y dependiente de calcineurina 3	1,56 veces regulados positivamente
			Adprt1	Familia 1 de poli ADP ribosa polimerasa	1,94 veces regulados positivamente
			Pik3r1	Subunidad 1 (p85 alfa) regulada de la fosfatidilinositol 3-quinasa	1,87 veces regulados positivamente
			Rps6kb1	Polipéptido 1 de la proteína ribosomal S6 quinasa	4,79 veces regulados positivamente
Twist1	Homología twist 1 (Drosophila)	2,16 veces regulados positivamente			

ES 2 745 294 T3

(continuación)

Órganos	Señal	P	Genes representados		
	ruta	valor	Genes	Descripción del gen	Cambio en veces
	Ruta de señalización de adipocitoquinas	6,84E-03	Akt1	Protooncogén 1 viral de timoma	1,57 veces regulados negativamente
			Cd36	Antígeno de superficie celular CD36	2,42 veces regulados negativamente
			Acs1	Miembro 1 de la familia de la Acetil-CoA sintetasa de cadena larga	4,56 veces regulados negativamente
			Nfkbia	Factor nuclear del potenciador génico de la cadena ligera kappa en el inhibidor de células B, alfa	2,55 veces regulados negativamente
			Prkag1	Subunidad no catalítica 1 gamma de proteína quinasa, activada por AMP	1,93 veces regulados negativamente
			Ptpn11	Proteína tirosina fosfatasa, no receptor tipo 11	2,31 veces regulados negativamente
			Stat3	Transductor de la señal y activador de la transcripción 3	1,55 veces autorregulados
Bolsa de grasa	Metabolismo de ácido graso	1,10E-04	Acox1	Acil coenzima A oxidasa 1 (palmitoil)	2,05 veces regulados positivamente
			Cpt1a	Carnitina palmitoiltransferasa 1A, hígado	3,1 veces regulados positivamente
			Cpt2	Carnitina palmitoiltransferasa 2	1,59 veces regulados positivamente
			Hsd17b4	Antígeno de superficie celular CD63	1,77 veces regulados positivamente
			Acs14	Miembro 4 de la familia de la Acil-CoA sintetasa de cadena larga	5,19 veces regulados positivamente
			Sirt1	Sirtuina 1 (homólogo 2 de regulación de información de tipo unión silente) 1 (S. cerevisiae)	3,09 veces regulados positivamente
Riñón	Diabetes; Nefrosis	0,997505	Apoc3	Apolipoproteína C-III	2,5 veces regulados negativamente
			Ctla4	Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos	1,65 veces regulados negativamente
			Fabp2	Proteína de unión a ácido graso 2, intestino	1,62 veces regulados negativamente
			Fgb	Cadena β de fibrinógeno	1,91 veces regulados negativamente
			Hp	Heptoglobina	2,35 veces regulados negativamente

(continuación)

Órganos	Señal ruta	P valor	Genes representados		
			Genes	Descripción del gen	Cambio en veces
Hígado	Hígado graso	0,978033	Mmp2	Metaloproteinasa de matriz 2	2,11 veces regulados negativamente
			Aldh2	aldehído deshidrogenasa 2	2,5 veces regulados negativamente
			Ctla4	Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos	1,56 veces regulados negativamente
			Cyp17a1	Citocromo P450 familia 17, subfamilia A, polipéptido 1	1,52 veces regulados negativamente
			Mttp	Proteína microsomal de transferencia de triglicéridos	3,53 veces regulados negativamente
			Sod2	Superóxido dismutasa 2, mitocondria	1,71 veces regulados negativamente

Ejemplo 3. El presente polipéptido en el control de la inflamación y enfermedades asociadas a la inflamación.

5 En el Ejemplo 3, la eficacia del presente polipéptido en los ratones tratados se determinó mediante imagenología bioluminiscente de animales enteros, imagenología bioluminiscente *in vivo* en órganos específicos y tinción inmunohistoquímica.

#### Materiales

10 Ratones: Los ratones transgénicos NF-κB/luc que portan el transgén luciferasa controlado por dos copias de los elementos reguladores NF-κappaB se aparearon con ratones FVB de tipo silvestre para generar la descendencia transgénica híbrida NF-κB/luc para los experimentos.

15 Polipéptido: En este ejemplo se utilizó el polipéptido preparado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1.

#### Métodos

20 (1) Imagenología bioluminiscente *in vivo*

Imagenología bioluminiscente de animales enteros: 15 ratones con edad de 6-8 semanas fueron divididos aleatoriamente en tres grupos. El grupo 1 era el grupo blanco; el grupo 2 era el grupo de control; y el grupo 3 era el grupo experimental. Los ratones del grupo 2 y del grupo 3 fueron administrados con 100 ul de solución de lipopolisacárido (LPS) de 4 mg/g para inducir la inflamación en los ratones mediante inyección intraperitoneal (inyección IP). A modo de control blanco, se administraron 100 ml de PBS a los ratones del grupo 1 mediante inyección IP. Después de la inyección de LPS durante 5 minutos, se inyectaron adicionalmente 20 µl de una solución que contenía 0,5 mg/kg del presente polipéptido a los ratones del grupo 3 mediante inyección IP. En cambio, se inyectaron 2 ul de agua a los ratones del grupo 2 y del grupo 3. 4 horas después de la inyección, se observó la actividad de luciferasa en los ratones inyectados mediante imagenología bioluminiscente de animales enteros.

30 Para la imagenología *in vivo*, los ratones se anestesiaron con isoflurano y se les inyectaron por vía intraperitoneal 150 mg/kg de luciferina. Después de 10 minutos, los ratones se pusieron boca arriba y se visualizaron durante 1 minuto con la cámara ajustada a la sensibilidad máxima mediante el IVIS Imaging System-200 (Series Xenogen Hopkinton, MA). Los fotones emitidos por los tejidos fueron cuantificados por el programa Living Images software (Xenogen, Hopkinton, MA) y se muestran en la figura 4A. En la figura 4A, el eje Y muestra la intensidad de la señal (fotones/seg) que representa los fotones totales difundidos desde los ratones. Además, la figura 4B mostró la comparación del valor cuantificado de luciferina detectado de los ratones de cada grupo.

40 De acuerdo con los estudios anteriores, se ha demostrado que el factor de transcripción NF-κB activa la ruta de señalización de NF-κB con la presencia de LPS en ratones transgénicos homocigotos NF-κB/luc. Además, la ruta de señalización nuclear y la activada de NF-κB desempeña un papel fundamental en la inmunomodulación. La activación

de NF- $\kappa$ B activaría aún más la expresión de genes asociados a la inflamación. Como se ve en los resultados mostrados en las figuras 4A y 4B, el promedio del valor de luciferina detectado de los ratones del grupo 1 fue de  $2,92 \times 10^7$  fotones/seg. Además, el promedio del valor de luciferina detectado en los ratones del grupo 2 fue de  $31,97 \times 10^7$  fotones/seg que fue más intenso que el del grupo 1. Curiosamente, el promedio reducido del valor de luciferina detectado en los ratones del grupo 3 fue de  $19,82 \times 10^7$  fotones/seg. En conjunto, el valor de luciferina detectado en los ratones del grupo 3 fue el punto de referencia sin inducción de LPS. Además, el valor de luciferina difundida de los ratones inyectados con LPS del grupo 2. Curiosamente, El valor de luciferina se redujo en los ratones del grupo 3 con tratamientos de LPS y el polipéptido presente.

Por lo tanto, el resultado de la imagenología bioluminiscente de animales enteros indica que el LPS fue capaz de inducir la inflamación en los ratones transgénicos NF- $\kappa$ B/luc que provocaron las señales luminiscentes en el abdomen de los ratones. Además, mediante el tratamiento del presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1, este obviamente puede disminuir la intensidad luminiscente en el abdomen de ratones transgénicos NF- $\kappa$ B/luc. Como se muestra en las figuras 4A y 4B, el LPS indujo un aumento de aproximadamente 10,95 veces de la intensidad luminiscente promovida por NF- $\kappa$ B en ratones. Además, en comparación con el grupo 1, el grupo 3 tuvo una intensidad luminiscente menor, y la supresión fue aproximadamente del 38 %. Por lo tanto, el tratamiento del presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 puede inhibir la actividad de NF- $\kappa$ B para la supresión eficaz de la inflamación aguda inducida por estímulos exógenos.

## (2) Imagenología bioluminiscente *ex vivo*

Se inyectaron por vía abdominal 150 mg/kg de luciferina a los ratones de los tres grupos manipulados en el ejemplo 3. Después de la inyección de luciferina durante 5 minutos, los ratones fueron sacrificados y los tejidos, incluyendo el cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo, estómago, riñón, ovario e intestino se extrajeron rápidamente. Los tejidos recolectados se colocaron en el IVIS Imaging System-200 Series (Xenogen, Hopkinton, MA) y se visualizaron con la misma configuración utilizada para la imagenología bioluminiscente *in vivo*. Además, Los fotones emitidos por los tejidos fueron cuantificados por el programa Living Images software (Xenogen, Hopkinton, MA) y se muestran en la figura 5, en donde el eje Y mostró la intensidad de la señal (fotones/seg) que representa el total de fotones detectados difundidos desde todos los tejidos indicados en los ratones de cada grupo.

Los resultados de la figura 5 mostraron que las alteraciones de la luciferina emitidas por los diversos tejidos en los ratones de cada grupo revelaron diferentes tendencias. Con la excepción del ovario, la intensidad luminiscente de los otros tejidos en los ratones del grupo de control (el grupo 2) obviamente aumentó en comparación con el grupo blanco (el grupo 1). En comparación con el grupo de control, las intensidades luminiscentes detectadas del pulmón, hígado, riñón e intestino en los ratones del grupo experimental (el grupo 3) obviamente disminuyeron.

Con el fin de identificar aún más los órganos diana del presente polipéptido en la supresión de la inflamación, las intensidades luminiscentes cuantificadas detectadas en los tejidos de cada grupo se presentaron como cambios en veces y se muestran en la tabla 2 y en la tabla 3 a continuación. En la tabla 2, el promedio del valor de luciferina en los ratones del grupo 2 se dividió por el promedio del valor de luciferina de los ratones del grupo 1 para obtener el cambio en veces. En la tabla 3, el promedio del valor de luciferina en los ratones del grupo 3 se dividió por el promedio del valor de luciferina en los ratones del grupo 2 para obtener el cambio en veces.

Tabla 2. El cambio en veces del valor de luciferina en los órganos indicados del grupo 2 en comparación con el grupo 1.

Tejido	Cerebro	Corazón	Pulmón	Hígado	Bazo	Estómago	Riñón	Ovario	Intestino
Cambio en veces	18,87 veces regulados positivamente	6,03 veces regulados positivamente	11,90 veces regulados positivamente	4,06 veces regulados positivamente	5,57 veces regulados positivamente	4,95 veces regulados positivamente	93,78 veces regulados positivamente	5,35 veces regulados positivamente	55,63 veces regulados positivamente

Tabla 3. El cambio en veces del valor de luciferina en los órganos indicados de cada grupo 3 en comparación con el grupo 2.

Tejido	Cerebro	Corazón	Pulmón	Hígado	Bazo	Estómago	Riñón	Ovario	Intestino
Cambio en veces	1,40 regulación positiva	1,13 regulación positiva	1,68 regulación negativa	1,57 regulación negativa	1,08 regulación positiva	1,11 regulación positiva	1,08 regulación negativa	1,17 regulación positiva	1,96 regulación negativa

Estos resultados mostraron que el LPS puede inducir la inflamación y la expresión de luciferasa en varios órganos indicados en ratones transgénicos NF- $\kappa$ B/luc. Sin embargo, el tratamiento del presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 puede suprimir el valor de luciferina en pulmón, hígado, riñón e intestino. Este resultado indicó que el tratamiento del presente polipéptido puede suprimir la actividad del NF- $\kappa$ B y las posteriores reacciones de inflamación inducidas por el LPS en pulmón, hígado, riñón e intestino.

### (3) Análisis de tinción de inmunohistoquímica (IHC)

La inmunohistoquímica (IHC) sería conocida por una persona experta en la materia. Los órganos se recolectaron de los ratones de cada grupo para la inclusión en parafina y la sección de histología. Los órganos incluidos en parafina se cortaron en secciones de 5- $\mu$ m, se desparafinaron en xileno y después se rehidrataron en alcohol graduado. La peroxidasa endógena se inactivó con peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol durante 15 minutos y la unión no específica se bloqueó con albúmina de suero bovino al 1 % a temperatura ambiente durante 1 hora. Las secciones bloqueadas se incubaron adicionalmente con anticuerpos monoclonales de ratón diluidos 50 veces frente a proteínas p56, TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  a 4 °C durante 16-18 horas, respectivamente, y después se incubaron con anticuerpos secundarios biotinilados (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) frente al fragmento Fc del primer anticuerpo correspondiente a temperatura ambiente durante 20 minutos. Por último, los portaobjetos se incubaron con un complejo reactivo de avidina-biotina y se tiñeron con 3,3'-diaminobencidina de acuerdo con el protocolo del fabricante (Histostain®-Plus Kit, Zymed Laboratories, South San Francisco, CA).

Los patrones de expresión de p65, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  caracterizados por IHC se muestran en la figura 6. Los resultados en la figura 6 mostraron que las señales marrones de TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  en el tejido del grupo de control (el grupo 2) obviamente aumentaron en comparación con el grupo blanco (el grupo 1). Sin embargo, la zona marrón significa que las rutas activas de señal de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  activa en el tejido de los ratones experimentales (el grupo 3) eran obviamente menores que el grupo 2. Se divulgó que el TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son citoquinas proinflamatorias en la inflamación aguda y en la inflamación. Por lo tanto, estos resultados indicaron que el tratamiento del presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1 es capaz de suprimir la producción de citoquinas proinflamatorias y la inflamación inducida por LPS.

### Ejemplo 4. El presente polipéptido en la terapia del hígado graso

#### Materiales:

Ratones: Los ratones FVB de tipo silvestre utilizados en este ejemplo se adquirieron en el National Laboratory Animal Center.

Polipéptido: El presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1 se preparó en el ejemplo 1.

#### Métodos:

30 ratones FVB de tipo silvestre se dividieron aleatoriamente en tres grupos, en donde los ratones del grupo 1 eran el grupo blanco que fueron alimentados en condiciones normales. Los ratones del grupo de control (el grupo 2) y el grupo experimental (el grupo 3) fueron alimentados con una dieta alta en grasas. Además, se realizó una inyección peritoneal semanal con 100  $\mu$ l de 10 mmol/kg del presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 en los ratones del grupo 3 dos veces durante 4 semanas. Se inyectaron de forma intraperitoneal 100  $\mu$ l de PBS a los ratones del grupo 2 y el grupo 3.

Después de la administración, se recolectaron los hígados de los ratones de cada grupo para las secciones histológicas. La histología hepática de los hígados en los ratones de cada grupo se dedujo de la tinción H&E y de la tinción con oil red-O para examinar la acumulación de lípidos en el hígado, respectivamente. La histología hepática de cada grupo se mostró en la figura 7A y la figura 7B. Además, el producto de la oxidación de lípidos en los hepatocitos se examinó mediante la tinción IHC descrita en el ejemplo 3 con anticuerpos frente a 4-hidroxinonenal (NHE) o malondialdehído (MDA) en los tejidos hepáticos de cada grupo. Los patrones de expresión de NHE y MDA en los hepatocitos de cada grupo se mostraron en la figura 8A y la figura 8B.

Los resultados de la figura 7 mostraron vacuolas grasas evidentes y una acumulación masiva de lípidos en el hígado del grupo 2 en comparación con el grupo 1. De manera alentadora, los ratones del grupo 3 revelaron menos acumulación de lípidos en el hígado en comparación con el grupo 2.

Los resultados de la figura 8 mostraron que los ratones de control del grupo 2 adquirieron más productos de oxidación de lípidos tales como HNE y MDA en el tejido hepático en comparación con el grupo 1. En cambio, los productos de la oxidación de lípidos en el tejido hepático obviamente disminuyeron en los ratones del grupo 3 en comparación con el grupo 2.

Una persona experta en la materia sabe que la producción excesiva de productos de oxidación de lípidos en la célula

conduciría a citopatogenicidad y fibrosis. Además, el HNE y el MDA son productos de la oxidación de los lípidos que podrían ser el biomarcador de diagnóstico de daño oxidativo. Por lo tanto, el presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1 podría mejorar eficazmente la acumulación de lípidos hepáticos y reducir los productos de la oxidación de lípidos en los hepatocitos. En otras palabras, el presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1 podría aplicarse para la terapia y la mejora del hígado graso o trastornos inducidos por daño hepático.

Ejemplo 5. El presente polipéptido en la supresión de la acumulación de grasa. Materiales

Ratones: En el Ejemplo 5, los ratones con deficiencias génicas y con acumulación masiva de grasa en el abdomen se adquirieron en el National Laboratory Animal Center.

Polipéptido: El presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1 se preparó en el ejemplo 1.

Métodos

Los ratones se dividieron en un grupo de control y un grupo experimental. Se inyectaron por vía intraperitoneal 100 ul de 2,5 nmol/kg del presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 a los ratones del grupo experimental dos veces por semana durante 4 semanas. Además, se inyectaron 100 ul de PBS a los ratones del grupo de control.

Durante el período de tratamiento, el peso corporal y la ingesta en la dieta de los ratones se registraron en momentos temporales periódicos. Después del tratamiento, las vistas brutas de los animales enteros se registraron mediante fotografías. A continuación, se recogieron las bolsas de grasa de los ratones para medir el peso de la bolsa de grasa. El examen histológico se realizó para determinar el número y el tamaño de los adipocitos en los ratones de ambos grupos. Además, el porcentaje de grasa corporal se calculó según la fórmula: (peso graso/peso corporal) X 100 %, y se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. El peso corporal, ingesta en la dieta, peso graso y grasa corporal de los ratones.

	Ratones de control	Ratones experimentales
Peso corporal en el punto de inicio (g)	71,99 ± 6,36	71,96 ± 6,46
Peso corporal en el punto final (g)	71,95 ± 6,25	72,54 ± 7,24
Ingesta en la dieta promedio (g/día/ratón)	0,78 ± 0,22	0,88 ± 0,17
Peso graso (g)	2,53 ± 0,19	1,90 ± 0,41
Grasa corporal (%)	3,68 ± 0,16	2,74 ± 0,21

Según la tabla 4 y las figuras 9 a 11, estas indicaron que no hubo diferencias obvias en el peso corporal en el punto de inicio y en la ingesta en la dieta durante el período de tratamiento entre el grupo de control y el grupo experimental. Sin embargo, el peso graso y el porcentaje de grasa corporal en los ratones del grupo experimental obviamente disminuyeron en comparación con el grupo de control. Por lo tanto, el presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1 en esta invención puede regular la adipogénesis para prevenir y/o mejorar el síndrome metabólico.

Referencia

Ejemplo 6. El presente polipéptido en la prevención de la distrofia muscular. Materiales

Ratones: Los ratones con deficiencias genéticas y con acumulación masiva de grasa abdominal utilizados en este ejemplo se adquieren en el National Laboratory Animal Center.

Polipéptido: El presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1 se preparó en el ejemplo 1.

Métodos

La recolección de los músculos de los ratones de ambos grupos se indica en el ejemplo 5. Los músculos fueron recogidos para su examen histológico. En el examen histológico, el número celular y el tamaño celular del tejido muscular se examinaron mediante tinción H&E y observación por microscopía. Los resultados se muestran en la figura 12.

De acuerdo con la figura 12, esta revela las características patológicas de la distrofia muscular en los ratones de control. De manera alentadora, el tratamiento del presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1 realmente mejora la distrofia muscular. Estos resultados sugieren que el tratamiento del presente

polipéptido en realidad afectó a la miogénesis para la prevención y/o terapia de la distrofia muscular.

Referencia

5 Ejemplo 7. El presente polipéptido es capaz de reducir la incidencia y las complicaciones de la diabetes. Materiales  
Ratones: Los ratones diabéticos no obesos (ratones NOD) utilizados en este ejemplo se adquirieron en el National Laboratory Animal Center.

10 Polipéptido: El presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1 se preparó en el ejemplo 1.

Método

15 Se dividieron 23 ratones en cuatro grupos con diferentes administraciones durante 20 semanas, en donde 6 ratones del grupo 1 eran ratones de control que fueron administrados diariamente por vía oral con 20 µl de PBS. Se administraron diariamente a 6 ratones del grupo 2 por vía oral 20 µl de solución de 0,01 umol/kg que contenía el presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1. Se administraron diariamente a 6 ratones del grupo 3 por vía oral 20 µl de solución de 0,1 umol/kg que contenía el presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1. Se administraron diariamente a 5 ratones del grupo 4 por vía oral 20 µl de solución de 1 umol/kg que contenía el presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1.

25 Durante el período de administración, se midieron el índice de supervivencia, la incidencia de diabetes y la retinopatía inducida por diabetes en cada grupo, y se muestran en la tabla 5. Después de la administración, las muestras de sangre fueron recolectadas para análisis serológicos y bioquímicos. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 5. El índice de supervivencia, la incidencia de diabetes y el índice de retinopatía inducida por diabetes en los ratones de cada grupo

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Índice de supervivencia (%)	4/6 (66,67 %)	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)	5/5 (100 %)
Incidencia de diabetes (%)	2/6 (33,33 %)	0/6 (0 %)	0/6 (0 %)	1/5 (20 %)
Retinopatía inducida por diabetes (%)	3/6 (50 %)	0/6 (0 %)	1/6 (16,66 %)	1/5 (20 %)

30 Los resultados de la tabla 5 indicaron que el índice de supervivencia del grupo 1 fue 4/6 (66,67 %). Además, los índices de supervivencia del grupo 2, el grupo 3 y el grupo 4 fueron 6/6 (100 %), 6/6 (100 %) y 5/5 (100 %), respectivamente. La incidencia de diabetes del grupo 1 fue de 2/6 (33,33 %). Después de la administración del presente polipéptido, la incidencia de diabetes del grupo 2, el grupo 3 y el grupo 4 fue 0/6 (0 %), 0/6 (0 %) y 1/5 (20 %), respectivamente.  
35 Además, el índice de retinopatía inducida por diabetes del grupo 1 fue 3/6 (50 %). Después de la administración del presente polipéptido, el índice de retinopatía inducida por diabetes del grupo 2, el grupo 3 y el grupo 4 fue 0/6 (0 %), 1/6 (16,67 %) y 1/5 (20 %), respectivamente.

40 Estos resultados sugirieron que el tratamiento del presente polipéptido en esta invención podría elevar eficientemente el índice de supervivencia, reducir la incidencia de diabetes y/o reducir las complicaciones relacionadas, como la retinopatía inducida por diabetes y la nefrosis.

Tabla 6. El análisis serológico y bioquímico de cada grupo

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
BUN (mg/dl)	40,50 ± 4,54	37,38 ± 2,77	38,50 ± 4,69	35,88 ± 6,33
Creatinina en suero (mg/dl)	0,70 ± 0,05	0,64 ± 0,12	0,69 ± 0,06	0,69 ± 0,06

45 Los resultados de la tabla 6 mostraron que el BUN en suero en los ratones del grupo 1 era 40,50 ± 4,54 mg/dl. Con la administración del presente polipéptido, la concentración de BUN en suero en los ratones de los grupos 2 a 4 fue de 37,38 ± 2,77 mg/dl, 38,50 ± 4,69 mg/dl, 35,88 ± 6,33 mg/dl, respectivamente. Además, la concentración sérica de creatinina en los ratones del grupo 1 fue de 0,70 ± 0,05 mg/dl. Con la administración del presente polipéptido, la concentración sérica de creatinina en los ratones del grupo 2, el grupo 3 y el grupo 4 fue 0,64 ± 0,12 mg/dl, 0,69 ± 0,06 mg/dl y 0,69 ± 0,06 mg/dl, respectivamente. Los resultados sugirieron que la administración del presente polipéptido obviamente podría reducir el BUN y la creatinina en el suero. Además, La mayor cantidad de tratamiento del presente polipéptido condujo a un efecto más obvio en la reducción del BUN y de la creatinina en el suero.

55 Conjuntamente, los resultados de la tabla 5 y la tabla 6 indicaron que el tratamiento del presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 realmente podría mejorar el índice de supervivencia, disminuir la incidencia de diabetes y evitar la complicación de la diabetes y la nefrosis. Por lo tanto, el tratamiento del presente polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 en ratones NOD podría curar

y/o prevenir la diabetes y las complicaciones relacionadas.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Universidad de Medicina de China

<120> Métodos para regular la transcripción de múltiples genes y la expresión de múltiples dianas

<130> 1

10 <150> TW103129210  
<151> 25-08-2014

<160> 1

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 68  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Síntesis artificial

25 <400> 1

Ser Arg Cys Gln Gly Lys Ser Ser Trp Pro Gln Leu Val Gly Ser Thr  
1 5 10 15

Gly Ala Ala Ala Lys Ala Trp Ile Glu Arg Glu Asn Pro Arg Val Arg  
20 25 30

Ala Val Ile Ile Lys Val Gly Ser Gly Ala Thr Lys Asp Phe Arg Cys  
35 40 45

Asp Arg Val Arg Val Trp Val Thr Glu Arg Gly Ile Val Ala Arg Pro  
50 55 60

Pro Thr Ile Gly  
65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polipéptido para su uso en una composición farmacéutica para tratar a un sujeto que tiene al menos una enfermedad seleccionada de un grupo que comprende inflamación y reacciones inflamatorias, síndrome metabólico y obesidad, en donde la composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva del polipéptido, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 o una secuencia de aminoácidos homóloga modificada por sustitución, deleción o inserción de uno o varios aminoácidos, en donde dicho polipéptido homólogo comprende una secuencia de aminoácidos que incluye más del 90 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID No. 1.
- 10 2. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido es la SEQ ID No. 1.
- 15 3. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido es un intermediario para la regulación de la expresión de múltiples genes.
4. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde los múltiples genes incluyen al menos un factor transcripcional.
- 20 5. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el factor transcripcional se selecciona del grupo que consiste en PPAR- $\gamma$ , NF- $\kappa$ B y el gen *Sirt1*.

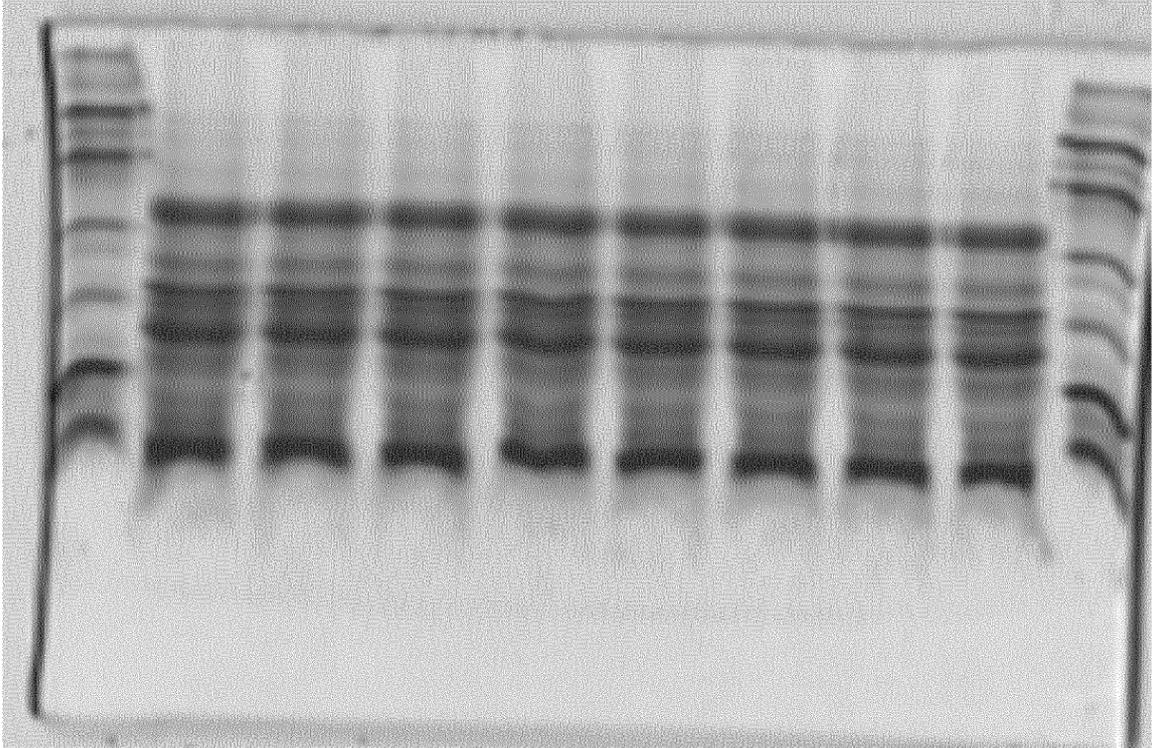


Fig. 1

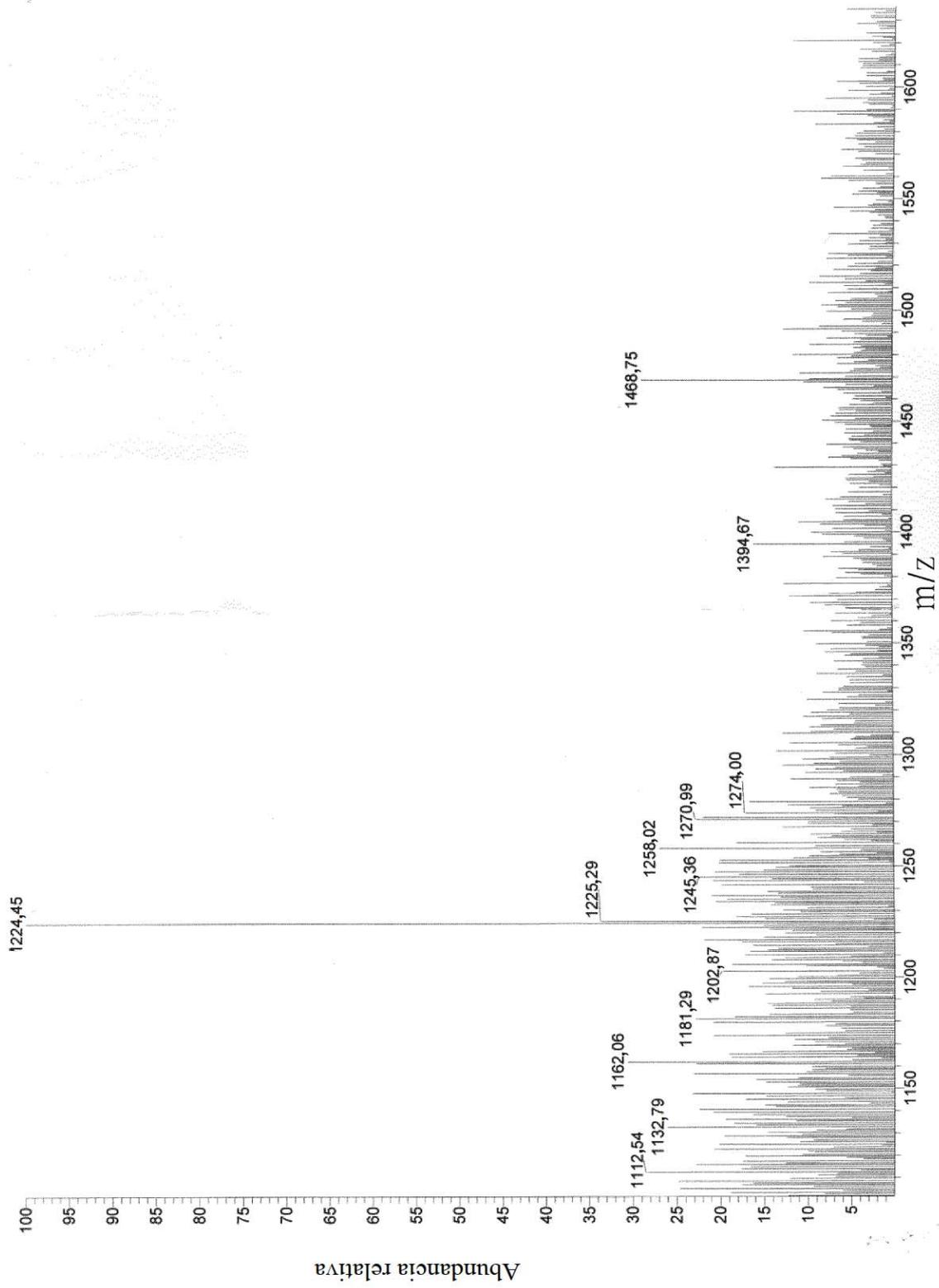


Fig. 2

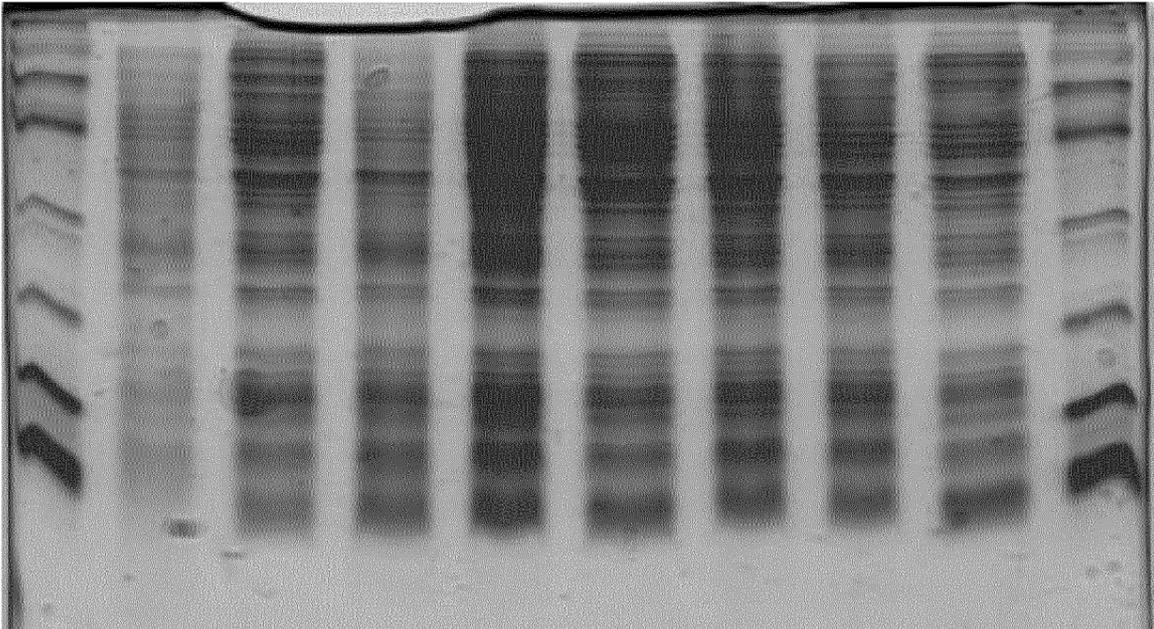


Fig. 3

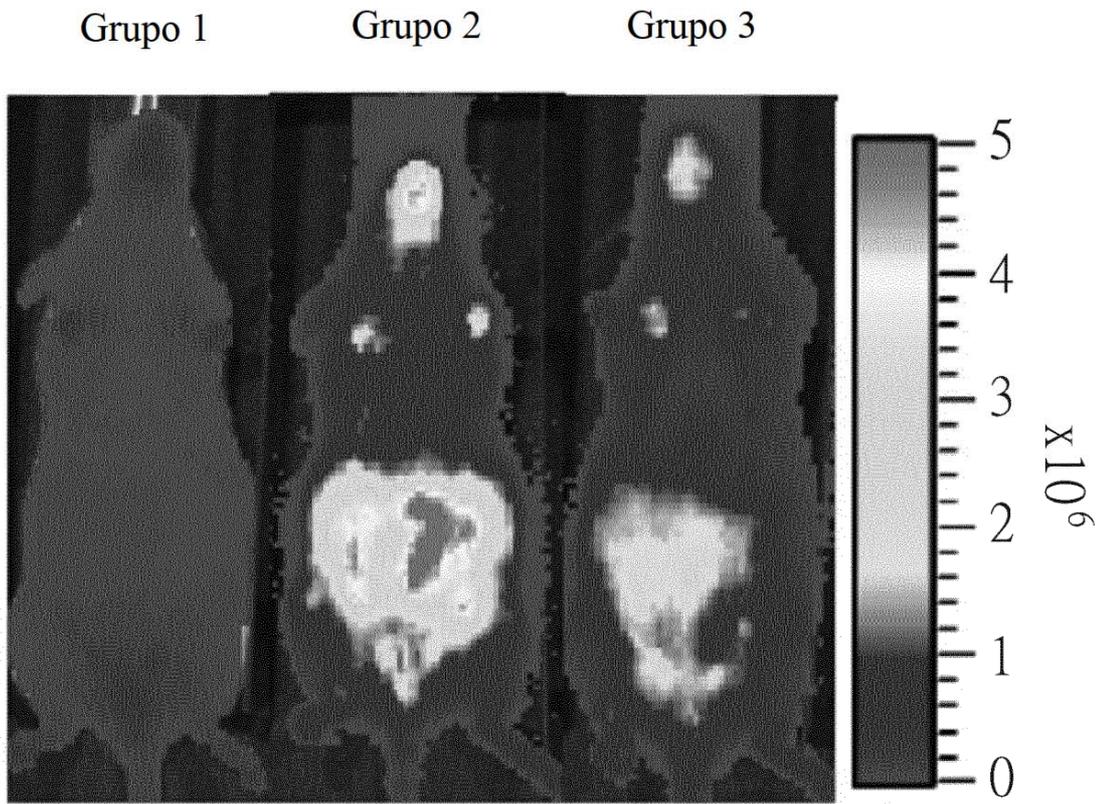


Fig. 4A

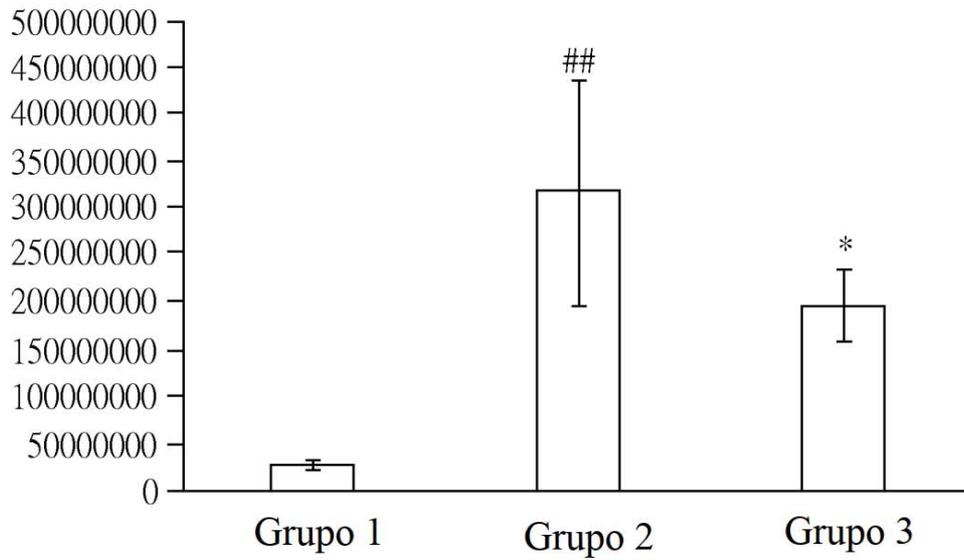


Fig. 4B

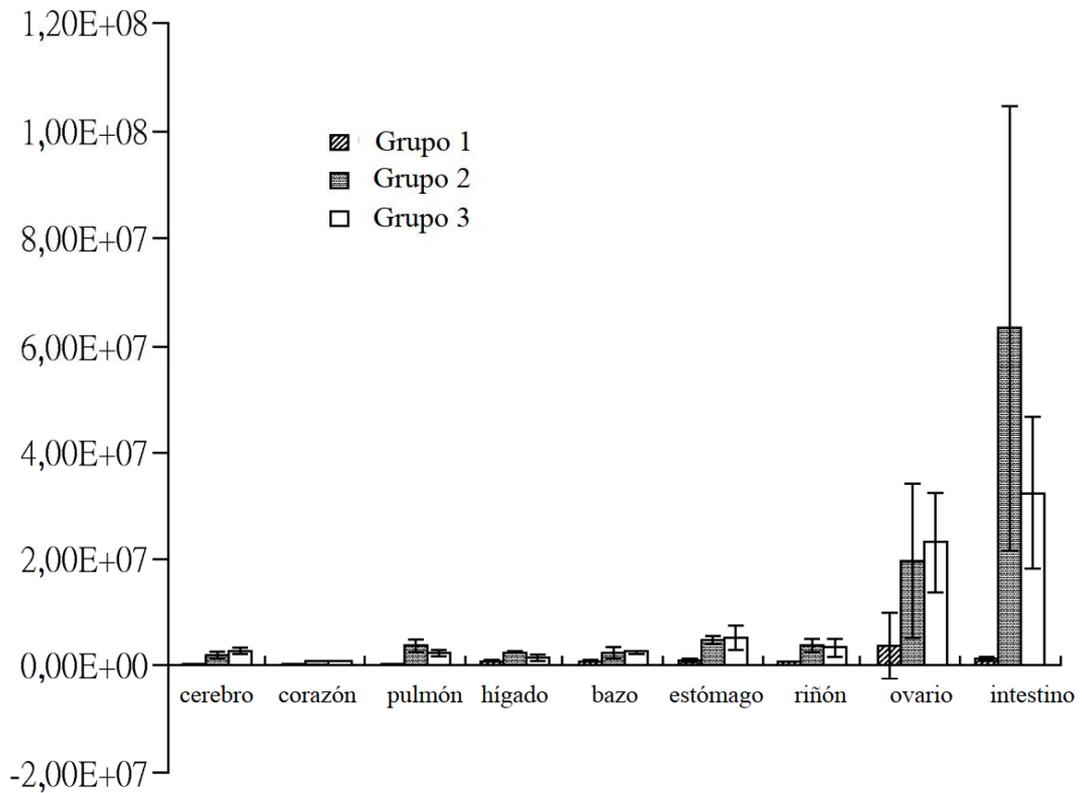


Fig. 5

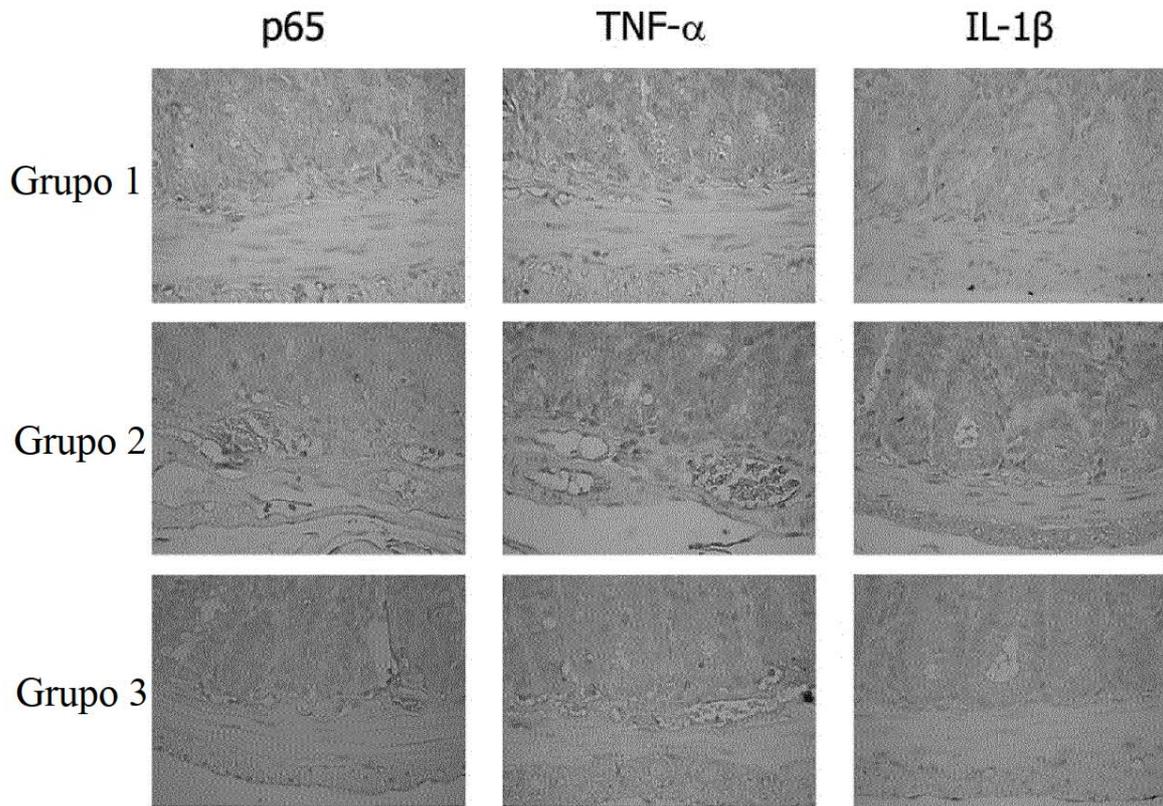


Fig. 6

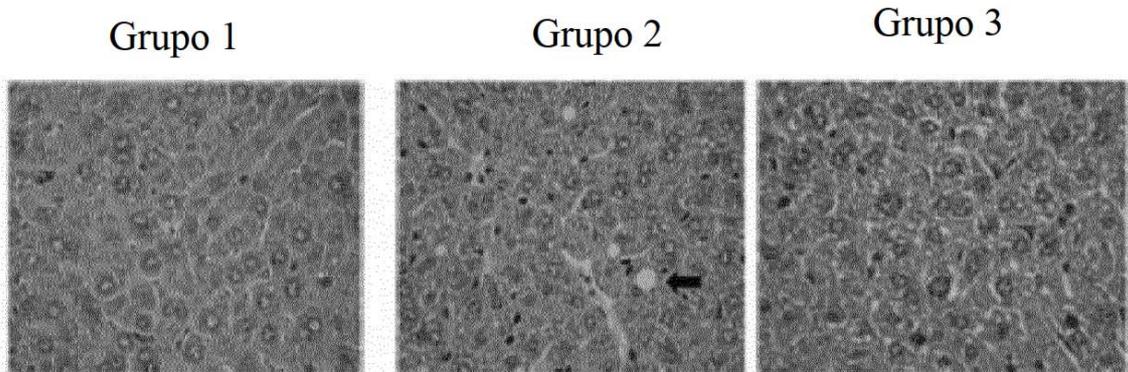


Fig. 7A

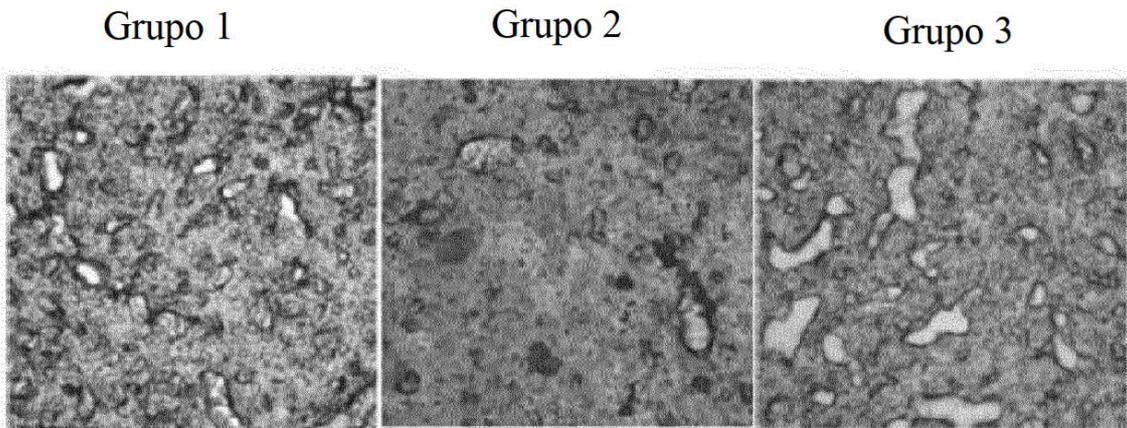


Fig. 7B

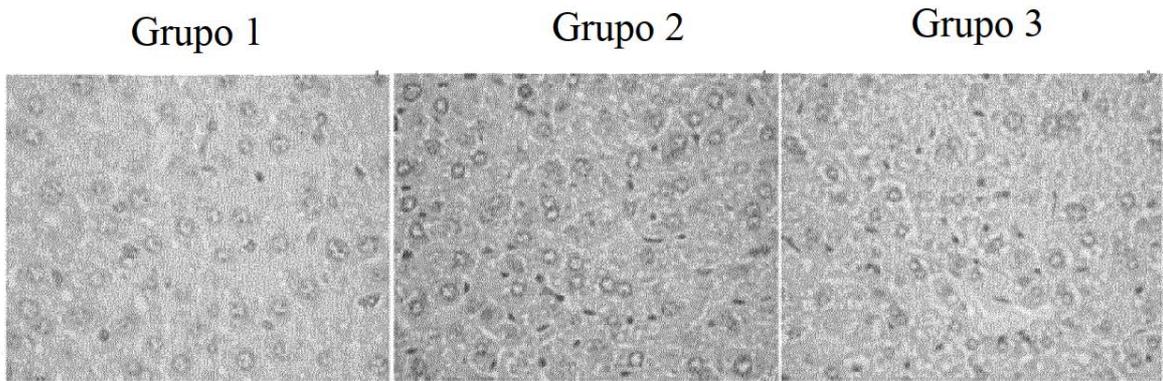


Fig. 8A

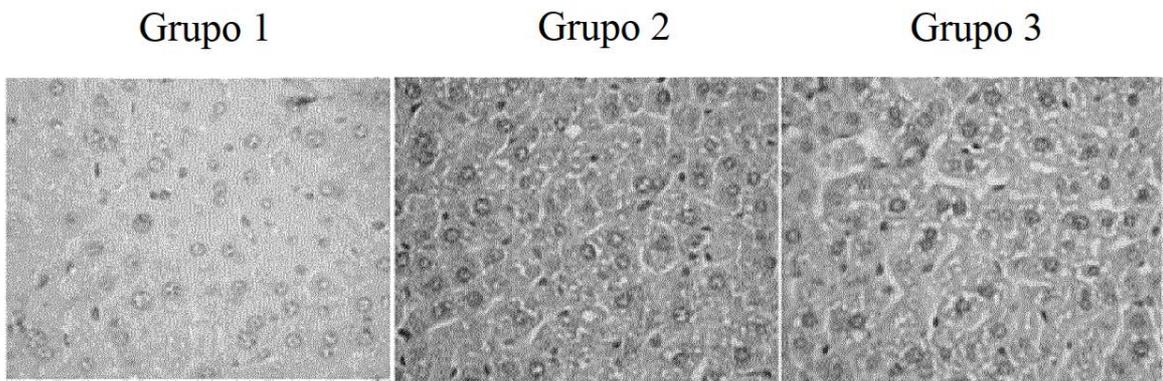


Fig. 8B

el grupo control

el grupo experimental

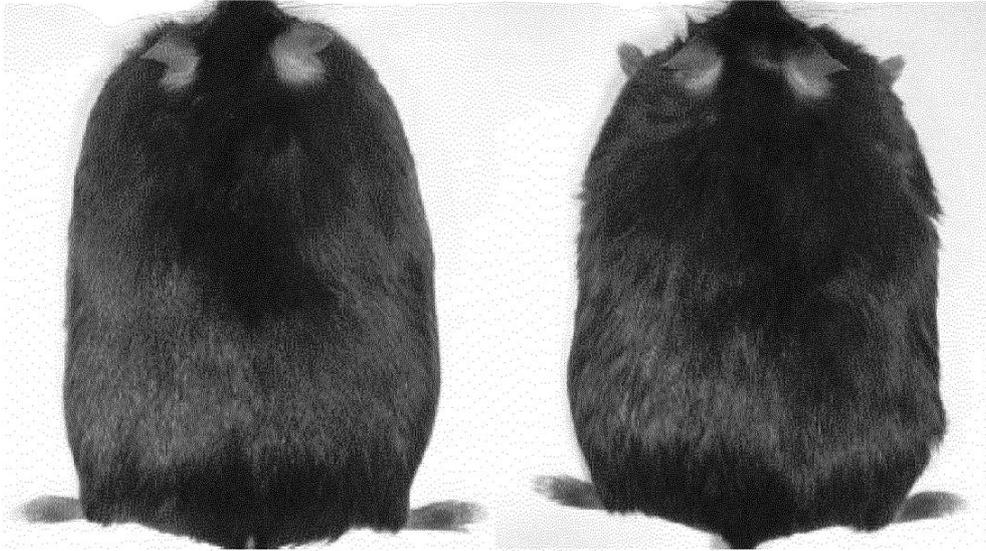


Fig. 9

el grupo control

el grupo experimental

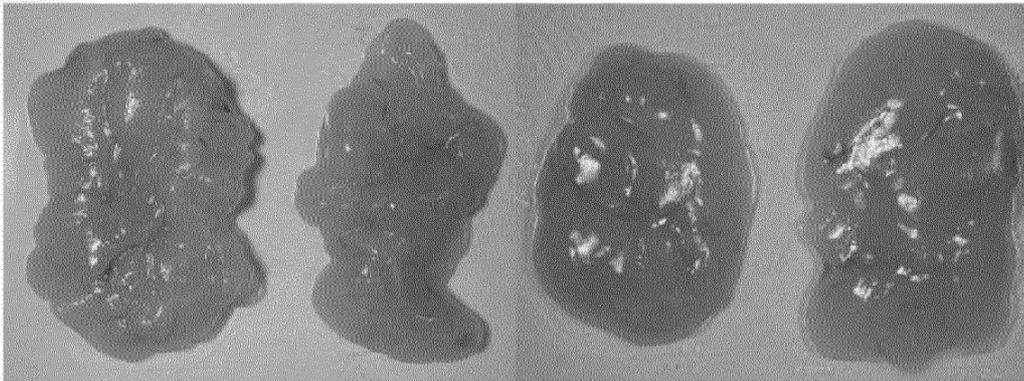


Fig. 10

el grupo control

el grupo experimental

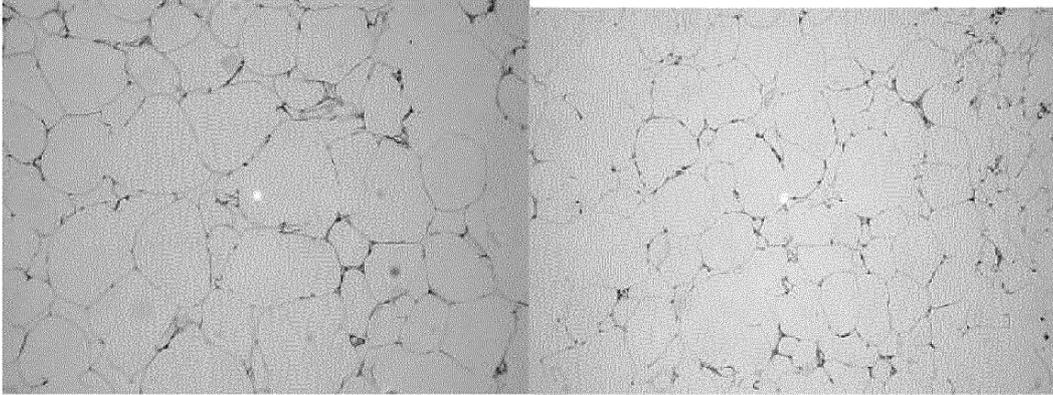


Fig. 11

el grupo control

el grupo experimental

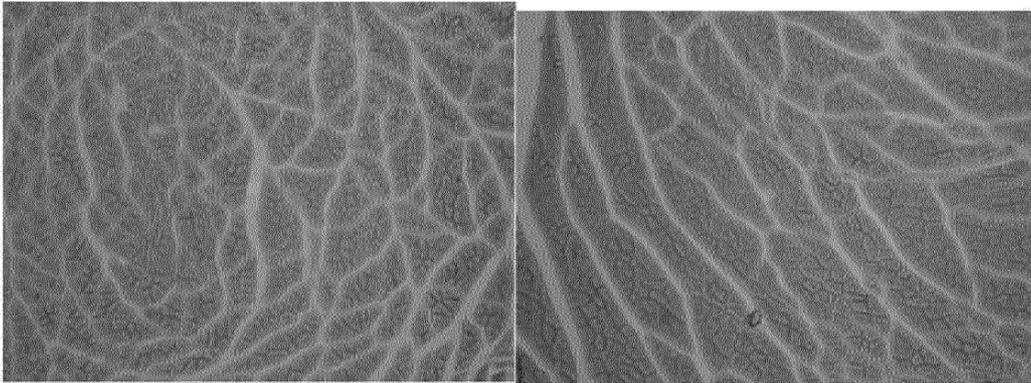


Fig. 12