



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 380 556**

51 Int. Cl.:
A61K 31/357 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06769069 .3**
96 Fecha de presentación : **27.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1948161**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Métodos para prevenir y tratar estados mediados por PPAR usando macelignano.**

30 Prioridad: **27.06.2005 KR 20050055539**
29.06.2005 KR 20050056692
22.09.2005 KR 20050087991

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2012

73 Titular/es: **NEWTREE Co., Ltd.**
11F Tech Center, Sk N Techno Park 190-1
Sangdaewon-dong Joongwon-gu Su, KR

72 Inventor/es: **Han, Kyu-Lee;**
Sohn, Jong-Hee;
Kim, Ah-Jin;
Choo, Jeong-Han;
Lee, Jae-Young y
Kim, Jeong-Hwan

74 Agente/Representante:
Manzano Cantos, Gregorio

ES 2 380 556 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

Métodos para prevenir y tratar estados mediados por PPAR usando macelignano.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a compuestos para su uso en un método para tratar estados mediados por PPAR, que comprende administrar una cantidad eficaz de macelignano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un sujeto.

10

Antecedentes de la técnica

15 PPAR (receptor activado por proliferadores de peroxisomas) se refiere a un receptor intranuclear cuyo ligando es un proliferador de peroxisomas, un compuesto que puede aumentar el número de peroxisomas. Además, se sabe que PPAR tiene tres isoformas de PPA α , PPAR δ y PPAR γ (J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 51, 157, 1994; Gene Expression, 4, 281, 1995; Biochem. Biophys. Res. Commun., 224, 431, 1996).

20 PPAR controla principalmente la expresión de genes que participan en el metabolismo de grasas o genes que participan en la diferenciación de adipocitos (J. Invest. Dermatol. 111, 1116-1121, 1998; J. Med. Chem., 43, 527-550, 2000). Entre las isoformas de PPAR anteriores, PPAR α se expresa principalmente en el hígado, la retina y el tejido adiposo, y participa en la oxidación de ácidos grasos, la neutralización de materiales tóxicos o reacciones inflamatorias. PPAR γ se expresa principalmente en los adipocitos, las células inmunitarias, la glándula suprarrenal, el bazo y el intestino delgado, y se sabe que funciona como mediador central en la diferenciación de adipocitos. PPAR δ no se expresa de una manera específica de tejido sino que se expresa ampliamente, y la función de PPAR δ no se entiende con claridad (Endocrinology., 137, 354, 1996).

30 Debido a que PPAR tiene un papel importante en el metabolismo de grasas, se han realizado muchos estudios para desarrollar un medicamento para tratar enfermedades metabólicas en las que está implicado PPAR. Se sabe que cuando se activa PPAR α , aumenta la expresión de enzimas que aumentan la descomposición de ácidos grasos y disminuyen la síntesis de ácidos grasos en el hígado, disminuyendo de ese modo la síntesis de triglicéridos y la producción y secreción de VLDL (lipoproteína de muy baja densidad). Se sabe también que la activación de PPAR α da como resultado la activación de LPL (lipoproteína lipasa), y una reducción de la producción de apoC-III que está induciendo la generación de VLDL (Curr. Pharm Des., 3: 1-14, 1997). Adicionalmente, se sabe que el fibrato, conocido como ligando de PPAR α , reduce los triglicéridos en un 20-50%, y reduce LDL mientras que aumenta HDL (Atherosclerosis, 171: 1-13, 2003). Por tanto, ligandos de PPAR α son útiles para tratar obesidad, dislipidemia y enfermedades cardiovasculares provocadas por la acumulación de triglicéridos (Curr. Opin. Lipidol., 10: 245-257, 1999).

40 Además, la activación de PPAR γ provoca la maximización de la receptividad de azúcar de adipocitos, estimula la diferenciación de adipocitos y reduce la resistencia a la insulina (Tren. Pharmacol. Sci., 25: 331-336, 2004). Por tanto, ligandos de PPAR γ pueden actuar como medicamento para tratar diabetes mellitus no insulino dependiente (diabetes mellitus tipo 2) provocada por resistencia a la insulina. Actualmente, productos farmacéuticos de TZD tales como pioglitazona y rosiglitazona, que son ligandos típicos de PPAR γ , se usan como medicamentos para tratar diabetes mellitus no insulino dependiente.

45 Tal como se mencionó anteriormente, puesto que PPAR es una diana en el tratamiento de enfermedades metabólicas incluyendo diabetes, complicaciones diabéticas o similares, se han hecho muchos intentos hasta la fecha de desarrollar ligandos de PPAR para activar PPAR. La patente estadounidense n.º 6.939.875 da a conocer una composición útil para tratar enfermedades mediadas por PPAR. También se da a conocer que la composición de la patente estadounidense n.º 6.939.875 es eficaz para tratar diabetes mellitus no insulino dependiente, obesidad, trastornos de la alimentación, falta de apetito, modulación del nivel de leptinas y síndrome metabólico. Adicionalmente, la patente estadounidense n.º 6.967.212 da a conocer una composición que comprende un derivado de ácido de azol sustituido que actúa como agonista de PPAR. También se da a conocer que la composición de la patente estadounidense n.º 6.967.212 es eficaz para tratar resistencia a la insulina, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, obesidad, síndrome X, síndrome dismetabólico, inflamación, complicaciones diabéticas, homeostasis de la glucosa alterada, tolerancia a la glucosa alterada, hipertrigliceridemia o aterosclerosis. Además, se dan a conocer otras sustancias eficaces para tratar diversas enfermedades mediadas por PPAR (patentes estadounidenses n.ºs 6.930.120, 7.041.691 y 7.037.914).

60 Sin embargo, los ligandos de PPAR que se han conocido hasta la fecha provocan efectos secundarios tales como toxicidad hepática, estados hipoglucémicos y obesidad. Por tanto, se requiere desarrollar un ligando que pueda activar PPAR a partir de una fuente natural que provoque pocos efectos secundarios tales como toxicidad. No obstante, ha habido pocos estudios para desarrollar un ligando que pueda activar PPAR a partir de una fuente natural.

65 Mientras tanto, *Myristica fragrans* es una planta perenne cultivada en los trópicos. Los frutos de *Myristica fragrans*, conocidos como macis o nuez moscada, se han usado como especias durante mucho tiempo. El macelignano es un compuesto a base de lignano típico, que se encuentra en *Myristica fragrans* (Phytochemistry, 59: 169-17, 2002). Se notifica que el macelignano tiene las funciones de potenciación de la actividad de caspasa 3 que induce apoptosis (Biol. Pharm. Bull., 27: 1305-1307, 2004), un efecto antibacteriano contra microorganismos orales (patente coreana

ES 2 380 556 T3

abierta a consulta por el público n.º 10-2005-0035954), inhibición de la peroxidación de lípidos de células cerebrales e inhibición de la producción de oxígeno activo (Biochem. Biophys. Res. Commu., 331: 1264-1269). La nuez moscada se ha dado a conocer para su uso en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (solicitud de patente sudafricana n.º 20013250). Sin embargo, no se ha notificado hasta la fecha ningún estudio de la interrelación entre macelignano y PPAR.

Descripción de la invención

Por tanto, los inventores de la presente invención han realizado estudios intensivos para buscar una sustancia eficaz para tratar enfermedades mediadas por PPAR, tales como diabetes mellitus, complicaciones diabéticas, obesidad o hiperlipidemia, a partir de varias fuentes naturales. Finalmente, encontraron que el macelignano aislado de *Myristica fragrans* es eficaz para activar PPAR, y por tanto para tratar enfermedades mediadas por PPAR tal como se especifica en las reivindicaciones. La presente invención se basa en este hallazgo.

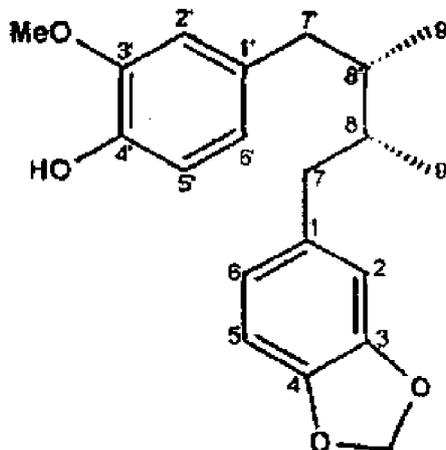
Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para tratar enfermedades mediadas por PPAR que se especifican en las reivindicaciones, que comprende administrar una cantidad eficaz de macelignano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un sujeto.

Con el fin de lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona compuestos para su uso en un método para tratar enfermedades mediadas por PPAR tal como se especifica en las reivindicaciones, que comprende administrar una cantidad eficaz de macelignano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un sujeto.

A continuación en el presente documento, la presente invención se explicará en más detalle.

Según la presente invención, el uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por PPAR comprende administrar una cantidad eficaz de macelignano representado por la siguiente fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un sujeto.

[Fórmula I]



El macelignano usado según la presente invención está disponible comercialmente o puede aislarse y purificarse a partir de una fuente natural. De lo contrario, el macelignano puede prepararse mediante un procedimiento sintético químico conocido por los expertos en la técnica.

Preferiblemente, el macelignano usado según la presente invención puede aislarse y purificarse a partir de una fuente natural. Más preferiblemente, el macelignano puede aislarse y purificarse a partir de *Myristica fragrans*, y lo más preferiblemente a partir de nuez moscada o arilo de *Myristica fragrans*. Adicionalmente, el macelignano puede aislarse y purificarse a partir de otras plantas de Myristicaceae, tales como *Myristica argentea* Warb (Nat. Prod. Lett., 16: 1-7, 2002), *Machilus thunbergii* (Bio. Pharm. Bull., 27: 1305-1307, 2004), o *Leucas aspera* (Chem. Pharm. Bull., 51: 595-598, 2003).

Preferiblemente, el macelignano usado en la presente invención puede aislarse y purificarse a partir de nuez moscada por medio de un procedimiento de separación usando extracción con disolvente y cromatografía que se conocen en la técnica.

ES 2 380 556 T3

Por ejemplo, la extracción de macelignano a partir de nuez moscada puede llevarse a cabo usando un disolvente cualquiera seleccionado del grupo que consiste en agua, disolventes orgánicos incluyendo alcoholes C1~C6, tales como etanol, metanol, propanol, isopropanol y butanol, acetona, éter, cloroformo, acetato de etilo, cloruro de metileno, hexano, ciclohexano, éter de petróleo, dietil éter y benceno, o un disolvente mixto de los mismos. Preferiblemente, tal extracción puede realizarse usando agua o un alcohol C1~C6. Lo más preferiblemente, el macelignano usado en la presente invención puede extraerse usando metanol como disolvente.

Para la extracción, puede añadirse metanol a polvo de nuez moscada en una cantidad de 1~20 veces (en una base en peso) la cantidad de polvo de nuez moscada con el fin de aumentar la eficacia de extracción.

La extracción de nuez moscada se realiza preferiblemente a temperatura ambiente a presión ambiental. Aunque el tiempo de extracción depende de la temperatura de extracción, la extracción se realiza generalmente durante 6~96 horas, y preferiblemente durante 36~72 horas. Adicionalmente, la extracción usando un agitador puede aumentar adicionalmente la eficacia de extracción.

Se usa nuez moscada en la extracción, tras recogerse y lavarse, y opcionalmente secarse. Como procedimiento de secado, pueden usarse un procedimiento de secado al sol, un procedimiento de secado a la sombra, un procedimiento de secado con aire caliente o un procedimiento de secado natural. Adicionalmente, con el fin de aumentar la eficacia de extracción, la nuez moscada o un producto secado de la misma puede pulverizarse en un molino.

El aislamiento de macelignano a partir del extracto puede realizarse usando un procedimiento de separación basado en cromatografía generalmente conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el extracto se carga en una columna de cromatografía de gel de sílice para obtener diferentes fracciones que tienen diferentes niveles de polaridad, y entonces se somete adicionalmente una fracción específica a cromatografía en columna de fase inversa y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para aislar macelignano.

Según una realización preferida, la extracción de macelignano usado en la presente invención se realiza pulverizando nuez moscada secada para dar un tamaño de 20~40 de malla, y añadiendo metanol a la misma en una cantidad de tres veces la cantidad de polvo de nuez moscada para llevar a cabo la extracción durante 48 horas a temperatura ambiente. Se centrifuga el extracto obtenido tal como se describió anteriormente, se elimina el precipitado y se recoge el sobrenadante para obtener extracto de nuez moscada que contiene macelignano. Entonces, se fracciona el extracto de nuez moscada para dar una fase de acetato de etilo, una fase de butanol y una fase de agua, y se somete la fase de acetato de etilo a una columna de gel de sílice y se eluye con hexano y acetato de etilo (10:1 (v/v)) para obtener una fracción deseada. La fracción se somete adicionalmente a una columna de gel de sílice y se eluye con hexano y acetato de etilo (20:1 (v/v)) para obtener una fracción deseada que, a su vez, se somete a una columna RP-18 y se eluye con metanol al 80% para obtener macelignano aislado.

El macelignano usado en la presente invención actúa como ligando para PPAR, activando de ese modo PPAR. Esto se ha demostrado por los inventores de la presente invención por primera vez.

Según una realización de la presente invención, se ha encontrado que el macelignano usado en la presente invención se une a PPAR, particularmente PPAR α y PPAR γ , activando de ese modo PPAR, a través de un método conocido para detectar un ligando que puede unirse a PPAR para activar genes que tienen el elemento de respuesta a PPAR (PPRE).

Cuando se activa PPAR, se une a una secuencia de ADN denominada PPRE (elemento de respuesta a PPAR) para controlar la expresión de genes diana. Principalmente, aumenta la expresión de genes diana de PPAR implicados en el metabolismo de grasas. Por tanto, según otra realización de la presente invención, se ha investigado el macelignano en cuanto a si aumenta la expresión de CD36, CPT-1, PDK 4, ACO, LPL y PEPCK, conocidos como genes diana de PPAR. Como resultado, se ha mostrado que el tratamiento con macelignano aumenta significativamente la expresión de los genes diana de PPAR.

Mientras tanto, se sabe que a medida que se activa PPAR, se maximiza la receptividad de azúcar de adipocitos y se estimula la diferenciación de adipocitos (Trends in Pharmacological Sciences, 25: 331-336, 2004). Por tanto, según todavía otra realización de la presente invención, se ha investigado el macelignano en cuanto a si activa PPAR para estimular la diferenciación de adipocitos. Como resultado, se mostró que el macelignano usado en la presente invención puede estimular la diferenciación de 3T3-L1, preadipocitos (véase la figura 10).

Según todavía otra realización de la presente invención, se mostró que el macelignano tiene el efecto de tratar o prevenir la obesidad, hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares provocadas por la obesidad reduciendo el peso corporal significativamente en un modelo de ratón con obesidad/diabetes. Adicionalmente, según aún otra realización de la presente invención, se demostró que el macelignano tiene el efecto de tratar o prevenir la diabetes mellitus no insulino dependiente reduciendo la glucemia significativamente en un modelo de ratón con obesidad/diabetes.

En resumen, puede observarse que el macelignano es un ligando de PPAR α que aumenta la descomposición de grasas y de PPAR γ que aumenta la sensibilidad a la insulina, tiene uso para inhibir la obesidad y enfermedades metabólicas incluyendo hiperlipidemia y enfermedad cardiovascular reduciendo significativamente el peso corporal y los triglicéridos en sangre en un modelo de obesidad/diabetes, y muestra uso para inhibir la diabetes mellitus no insulino dependiente reduciendo la glucemia en el mismo modelo.

ES 2 380 556 T3

Por tanto, el macelignano es útil para tratar enfermedades mediadas por PPAR.

Tal como se usa en el presente documento, “enfermedades mediadas por PPAR” se refieren a enfermedades o estados que se previenen, tratan, reducen o alivian mediante la activación de PPAR y que son: DMNID (diabetes mellitus no insulino dependiente), hiperinsulinemia, obesidad, hiperglucemia, hiperlipidemia, síndrome X, hipercolesterolemia, hiperlipoproteinemia, aterosclerosis, hipertensión, resistencia a la insulina, síndrome dismetabólico, homeostasis de la glucosa alterada, tolerancia a la glucosa alterada, hipertrigliceridemia, osteoporosis (J. Biol. Chem. 275: 14388-14393, 2000), glomerulonefritis (Kidney Int., 14-30, 2001) o nefropatía diabética (Kidney Int., 60: 14-30, 2001).

El uso en un método para tratar enfermedades mediadas por PPAR según la presente invención comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que tiene macelignano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un sujeto. En el presente documento, la expresión “cantidad eficaz” significa una cantidad tal que puede obtenerse una respuesta superior a la respuesta del control negativo, y preferiblemente una cantidad suficiente para tratar o prevenir enfermedades mediadas por PPAR. La cantidad eficaz de composición que tiene macelignano o una sal farmacéuticamente aceptable según la presente invención es de 0,1~200 mg/día/kg (peso corporal), preferiblemente 1~30 mg/día/kg (peso corporal). Sin embargo, la cantidad eficaz se determina considerando diversos factores, incluyendo la enfermedad y el grado de enfermedad, la edad, el peso corporal, la salud, el sexo, la dieta y la excreción de un paciente, la vía de administración, el período de administración, la frecuencia de tratamiento y la combinación de otros fármacos. Además, el término “sujeto” se refiere a un mamífero que necesita tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por PPAR, preferiblemente un ser humano.

Según la presente invención, el macelignano puede usarse en forma de una sal, preferiblemente una sal farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la sal incluye una sal de adición de ácido formada con un ácido libre farmacéuticamente aceptable. Tales ácidos libres incluyen ácidos orgánicos y ácidos inorgánicos. Ejemplos particulares de los ácidos orgánicos incluyen: ácido cítrico, ácido acético, ácido láctico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido oxálico, ácido trifluoroacético, ácido benzoico, ácido glucónico, ácido metanosulfónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido glutámico y ácido aspártico. Adicionalmente, los ejemplos particulares de los ácidos inorgánicos incluyen: ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico.

Anteriormente en el presente documento, la expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a sustancias que son fisiológicamente aceptables que no tienen efecto inhibidor de principios activos, y no provocan reacciones alérgicas o reacciones similares, tales como trastornos gastrointestinales o desvanecimientos, cuando se administran a un ser humano o un animal.

Mientras tanto, según la presente invención, el macelignano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede formularse con un portador adecuado para la vía de administración particular. Tales portadores incluyen todas las clases de disolventes, agentes de dispersión, emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, composiciones acuosas, liposomas, microperlas y microsomas. Las vías de administración de la composición farmacéutica según la presente invención incluyen vías orales o parenterales. Los ejemplos particulares de vías de administración parenterales incluyen vías transdérmica, nasal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o intravenosa.

Cuando el macelignano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la presente invención se administra por vía oral, puede formularse en forma de gránulos de polvo, comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, líquido, gel, jarabe, suspensión, oblea, junto con un portador adecuado para administración oral usando un procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Los ejemplos particulares de portadores adecuados incluyen: sacáridos, tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol y maltitol; almidón, tal como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de patata; celulosa, tal como metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica e hidroxipropilmetilcelulosa; y cargas, tales como gelatina, polivinilpirrolidona. Si es necesario, es posible añadir adicionalmente un agente disgregante, tal como un agente de reticulación, polivinilpirrolidona, agar, ácido algínico o alginato de sodio. Además, la composición farmacéutica según la presente invención puede comprender además un agente antiaglomerante, un lubricante, un agente humectante, un agente de fragancia y un conservante.

Mientras tanto, cuando el macelignano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra por medio de una vía parenteral, puede formularse en forma de una composición para inyección, administración transdérmica o inhalación nasal, junto con un portador adecuado para administración parenteral usando un procedimiento conocido generalmente por los expertos en la técnica. En el caso de una composición para inyección, es necesario esterilizar la composición y proteger la composición frente a la contaminación con microorganismos tales como bacterias y hongos. Los ejemplos particulares de portadores adecuados para administración por inyección incluyen: agua, etanol, polioli (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), una mezcla de los mismos y/o un disolvente o medio de dispersión que contiene aceite vegetal. Más preferiblemente, los portadores adecuados incluyen disolución de sal equilibrada de Hank, disolución de Ringer, PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contiene trietanolamina o agua esterilizada para inyección, disolución isotónica tal como etanol al 10%, propilenglicol al 40% o dextrosa al 5%. Para proteger la formulación de inyección frente a la contaminación con microorganismos, la formulación puede comprender además diversos agentes antibacterianos y agentes antifúngicos, tales como parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal. En la mayoría de los casos, una formulación de inyección puede comprender además un agente isotónico tal como azúcar o cloruro de sodio.

ES 2 380 556 T3

Pueden formularse composiciones para administración transdérmica en forma de pomada, crema, loción, gel, disolución para uso externo, pasta, linimento, aerosol. En el presente documento, la expresión “administración transdérmica” se refiere a la administración local de una composición farmacéutica sobre la piel, dando como resultado la administración de una cantidad eficaz de componente activo contenido en la composición farmacéutica a la piel. Las formulaciones anteriores se describen en más detalle en un libro de texto (Remington’s Pharmaceutical Science, 15ª edición, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania), ampliamente conocido en el campo de la química farmacéutica.

En el caso de una formulación e inhalación, el compuesto usado en el método según la presente invención puede administrarse convenientemente en forma de una formulación de pulverización de aerosol a partir de un envase presurizado o un atomizador usando un propelente adecuado, tal como diclorofluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases adecuados. En el caso de un aerosol presurizado, puede determinarse una unidad de dosificación proporcionando una válvula que puede administrar una cantidad medida de fármaco. Por ejemplo, una cápsula de gelatina o un cartucho usado en un inhalador o insuflador puede comprender una mezcla de polvo que contiene el compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Otros portadores farmacéuticamente aceptables se describen en más detalle en [Remington’s Pharmaceutical Science, 19ª edición, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995].

Adicionalmente, el macelignano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo usado según la presente invención puede comprender además al menos un tampón (por ejemplo solución salina o PBS), hidrato de carbono (por ejemplo glucosa, manosa, sacarosa o dextrano), antioxidante, agente bacteriostático, agente quelante (por ejemplo EDTA o glutatión), adyuvante (por ejemplo hidróxido de aluminio), agente de suspensión, agente espesante y/o conservante.

Mientras tanto, el macelignano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede formularse usando un método conocido en la técnica de modo que se proporcione una liberación rápida, duradera o retardada del componente activo tras la administración a un sujeto.

Además, según la presente invención, el macelignano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse en combinación con un compuesto conocido, tal como TZD, que tiene el efecto de prevenir o tratar enfermedades mediadas por PPAR.

Después de llevar a cabo una prueba de toxicidad tras la administración oral de macelignano a ratas, se mostró que la dosis letal al 50% (DL₅₀) en una prueba de toxicidad oral era de 2.000 mg/kg o más.

Breve descripción de los dibujos

Lo anterior y otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada cuando se toma conjuntamente con los dibujos adjuntos en los que:

la figura 1 es un diagrama de flujo de un procedimiento para aislar macelignano a partir de nuez moscada de *Myristica fragrans*;

la figura 2 es el espectro de ¹³C-RMN de macelignano según la presente invención;

la figura 3 es el espectro de ¹H-RMN de macelignano según la presente invención;

la figura 4 es el espectro de ¹H-¹H COSY de macelignano según la presente invención;

la figura 5 es el espectro de ¹H-¹³C HMBC de macelignano según la presente invención;

la figura 6 es el espectro de EI-masas de macelignano según la presente invención;

la figura 7 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la activación de PPAR α (A) o PPAR γ (B), en concentración;

la figura 8 es un resultado que muestra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la expresión de genes diana de PPAR α ;

A: CD36.

B: CPT-1.

C: PDK4.

D: ACO.

ES 2 380 556 T3

la figura 9 es un resultado que muestra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la expresión de genes diana de PPAR γ ;

5 A: LPL.

B: PEPCK.

10 la figura 10 es un resultado que muestra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la diferenciación de adipocitos 3T3-L1 de fibroblastos de ratón;

la figura 11 es un resultado que muestra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la glucemia en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

15 la figura 12 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la tolerancia a la glucosa en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

la figura 13 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la concentración de insulina en sangre en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

20 la figura 14 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la concentración de adiponectina en sangre en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

la figura 15 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la ingesta de la dieta en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

25 la figura 16 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre el peso corporal en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

la figura 17 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la cantidad de tejido adiposo en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

la figura 18 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la concentración de triglicéridos en células musculares en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

35 la figura 19 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la concentración de triglicéridos en sangre en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

la figura 20 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la concentración de ácidos grasos libres en sangre en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

40 la figura 21 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la concentración de colesterol total en sangre en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

la figura 22 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la concentración de colesterol de HDL en sangre en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

45 la figura 23 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la concentración de IL-6 en sangre en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

50 la figura 24 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la concentración de TNF- α en sangre en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

la figura 25 es un gráfico que ilustra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la cantidad de triglicéridos en el tejido hepático en un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

55 la figura 26 es un resultado que muestra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la expresión de genes diana de PPAR α en el tejido hepático de un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

60 A: CD36.

B: ACO.

C: CPT-1; y

65 la figura 27 es un resultado que muestra el efecto de macelignano según la presente invención sobre la expresión de genes diana de PPAR γ en el tejido hepático de un modelo de ratón con obesidad/diabetes;

A: CD36.

B: LPL.

5 C: ACS.

D: GyK.

10 Mejor modo para llevar a cabo la invención

Ahora se hará referencia en detalle a las realizaciones preferidas de la presente invención. Debe entenderse que los siguientes ejemplos son sólo ilustrativos.

15 Ejemplo 1

Aislamiento y purificación de macelignano a partir de Myristica fragrans

20 <1-1> Aislamiento y purificación de macelignano

A 100 g de nuez moscada secada y pulverizada se le añadieron 400 ml de metanol al 75%, y se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 días. Se filtró la disolución extraída y se concentró a vacío para obtener un extracto en metanol de nuez moscada (7 g). A continuación, se fraccionó el extracto en una fase de acetato de etilo, una fase de butanol y una fase de agua, y se concentró cada fracción a vacío para obtener una fracción de acetato de etilo, una fracción de butanol y una fracción de agua. Se sometió la fracción de acetato de etilo (4,2 g) a cromatografía en columna de gel de sílice (Merck Kieselgel 66; 70-230 de malla) usando hexano y acetato de etilo (10:1 (v/v)) como eluyente para obtener la fracción III (1 g). Adicionalmente, se sometió la fracción III a cromatografía en columna de gel de sílice (Merck Kieselgel 66; 70-230 de malla) usando hexano y acetato de etilo (20:1 (v/v)) como eluyente para obtener la fracción III-B (0,52 g). Entonces, se sometió la fracción III-B adicionalmente a cromatografía en columna Rp-18 (Merck LiChroprep; 25-40 μ m) usando metanol al 80% como eluyente para obtener una sustancia individual, la fracción III-B-2 (0,5 g). El procedimiento de aislamiento anterior se muestra en la figura 1 en forma de un diagrama de flujo.

35 <1-2> Análisis estructural

Para determinar la estructura de la sustancia individual, la fracción III-B-2, se realizaron espectrometría de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN a 600 MHz y 150 MHz, respectivamente (disolvente: DMSO). Los resultados se muestran en la figura 2 y la figura 3. Para determinar la interrelación ^1H - ^1H y la interrelación ^1H - ^{13}C basándose en los resultados de la espectrometría de ^1H -RMN y la espectrometría de ^{13}C -RMN, se realizaron espectrometría de ^1H - ^1H COSY y espectrometría de ^1H - ^{13}C HMBC. Los resultados se muestran en la figura 4 y la figura 5. La siguiente tabla 1 muestra los resultados globales de la espectrometría de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, ^1H - ^1H COSY y ^1H - ^{13}C HMBC.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 380 556 T3

TABLA 1

Posición	¹³ C-RMN	¹ H-RMN	¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC
1	135,4			
2	109,2	6,72 sa		C-7, C-6, C-4, C-3
3	147,3			
4	145,1			
5	107,9	6,79 d(7,8)	6,61	C-6, C-4, C-3, C-1
6	121,7	6,61 dd(7,8)	6,79	C-7, C-5, C-4, C-2, C-1
7	38,2	2,23 dd(13,2, 9,3) 2,66 dd(13,2, 4,8)	1,64, 2,66 1,64, 2,23	C-8, C-6, C-2, C-1 C-9, C-8, C-6, C-2, C-1
8	38,7	1,64 sa	0,75, 2,23, 2,66	C-7
9	16,0	0,75 d(6,3)	1,64	C-8, C-7
1'	132,4			
2'	112,9	6,66 sa		C-7', C-6', C-4', C-3'
3'	147,1			
4'	144,4			
5'	115,2	6,66 d(7,9)	6,53	C-6', C-4', C-3', C-1'
6'	121,0	6,53 d(7,9, 1,1)	6,66	C-7', C-5', C-4', C-2', C-1'
7'	38,0	2 17 dd(13,2, 9,3) 2,66 dd(13,2,4,8)	1,64, 2,66 1,64, 2,17	C-8', C-6', C-2', C-1' C-9', C-8', C-6', C-2', C-1'
8'	38,7	1,64 sa	0,75, 2,17, 2,66	C-7'
9'	16,1	0,75 d(6,3)	1,64	C-8', C-7'
OMe	55,5	3,72(s)		
O-CH ₂ -O	100,6	5,95 d(4,8)		C-3, C-4

<1-3> Espectrometría de masas

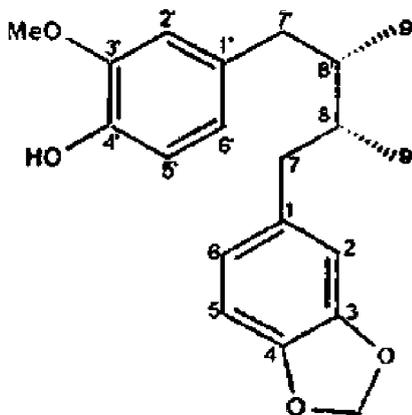
Se realizó EI/EM de la sustancia individual aislada, III-B-2, para determinar el peso molecular. Los resultados de la espectrometría de masas se muestran en la figura 6. Se mostró que el compuesto tenía un peso molecular de 328 tal como se determina mediante $[M]^+$ de m/z 328, y se representó mediante una fórmula molecular de C₂₀H₂₄O₄.

<1-4> Medición del valor de rotación específica

En primer lugar, se disolvieron 20 mg de la sustancia individual aislada, III-B-2, en 2 ml de cloroformo (CHCl₃). Entonces, se midió el valor de rotación específica ($[\alpha]_D$) del compuesto usando un polarímetro (polarímetro automático, APIII-89, Rodolph, NJ, EE.UU.). Tras la medición, se mostró que $[\alpha]_D = +4,0$ (CHCl₃, c=1,0).

Tras considerar los resultados anteriores de espectrometría de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HMBC, EI/EM y ($[\alpha]_D$) en comparación con un informe conocido (Woo, W.S. *et al.*, *Phytochemistry*, 26: 1542-1543, 1987), pudo observarse que la sustancia individual aislada era macelignano representado por la siguiente fórmula I:

[Fórmula I]



Ejemplo 2

25 *Activación de PPAR mediante macelignano*<2-1> *Activación de PPAR α por macelignano*

Para investigar si el macelignano actúa como ligando de PPAR o no, se sometió a prueba según un método conocido (Cell, 68: 879-887, 1992; J. Biol. Chem., 272: 25252-25259, 1997) usando un plásmido que expresa PPAR y un vector que tiene genes de luciferasa controlados por PPRE.

Se midió la activación de la expresión de luciferasa transfectando células de riñón de mono COS-7 (ATCC CRL-1651) con el plásmido de PPAR α y el vector pFR-luciferasa (Stratagene, EE.UU.), y luego tratando las células transfectadas con macelignano aislado del ejemplo 1 durante 24 horas. Se obtuvo el plásmido de PPAR α aislando el polinucleótido que codifica para la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 200~510 (es decir, dominio unido a ligando de PPAR α de la secuencia de aminoácidos total de PPAR α humano (n.º de registro de GenBank S74349)) con los cebadores de SEQ ID NO: 1 (CTTGGATCCGAACATGACATA) y SEQ ID NO: 2 (TGGGGTACCTGGCTGAT) mediante RT-PCR. Entonces, se clonó el polinucleótido entre los sitios de enzimas de restricción de BamHI y KpnI del vector pFA (Stratagene, EE.UU.). En el presente documento, se obtuvo el ARNm usado como molde en RT-PCR separando el ARN total en células de hígado humano Hep G2 (ATCC HB-8065) cultivadas usando TRI-ZOL (Invitrogen, EE.UU.). Se realizó la RT-PCR sintetizando ADNc usando transcriptasa inversa a 42°C durante 60 minutos, y 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 54°C y 2 minutos a 72°C usando Taq polimerasa. En este momento, se compararon los grupos de prueba tratados con diferentes concentraciones (1, 5, 10 y 25 μ M) de macelignano según la presente invención con el control tratado con DMSO al 0,01%, y con los grupos tratados con diferentes concentraciones (1, 5, 10 y 25 μ M) de Wy-14643 (Sigma, EE.UU.), un compuesto conocido como ligando de PPAR α .

Tal como se muestra en la figura 7A, el macelignano aumentó la actividad de PPAR α de una manera dependiente de la concentración, y todos los grupos de prueba tratados con diferentes concentraciones de macelignano mostraron una diferencia significativa (*, p<0,01) en comparación con el control. Por ejemplo, cuando se compararon ambos grupos tratados a una concentración de 25 μ M entre sí, el compuesto conocido Wy-14643 mostró actividad superior al control en aproximadamente 16 veces, mientras que la actividad luciferasa derivada del macelignano según la presente invención mostró actividad superior al control en aproximadamente 14 veces. Esto indica que la sustancia natural, el macelignano, actúa como ligando de PPAR α para activar PPAR α , y muestra actividad similar a la de Wy-14643, un ligando de PPAR α conocido, activando de ese modo PPAR α eficazmente.

<2-2> *Activación de PPAR γ por macelignano*

Para investigar si el macelignano activa PPAR γ o no, se sometió a prueba según el método del ejemplo 2-1 excepto porque se usó un plásmido de PPAR γ en lugar de un plásmido de PPAR α y se usó troglitazona en lugar de Wy-14643. En el presente documento, se obtuvo el plásmido de PPAR γ aislando el polinucleótido que codifica para la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 176-477 (es decir, dominio unido a ligando de PPAR γ de la secuencia de aminoácidos total de PPAR γ humano (n.º de registro de GenBank NM_138712)) con los cebadores de SEQ ID NO: 3 (TCGGTTTAAGATTCATCTTTATT) y SEQ ID NO: 4 (GTCTCCGGTACCTTGATCACCTGC) mediante RT-PCR. Entonces, se clonó el polinucleótido entre los sitios de enzimas de restricción XbaI y KpnI del vector pFA (Stratagene, EE.UU.).

ES 2 380 556 T3

Tal como se muestra en la figura 7B, el macelignano aumentó la actividad de PPAR γ de una manera dependiente de la concentración, y todos los grupos de prueba tratados con diferentes concentraciones de macelignano mostraron una diferencia significativa (*, p<0,01) en comparación con el control. Por ejemplo, cuando se compararon ambos grupos tratados a una concentración de 25 μ M entre sí, el compuesto conocido troglitazona mostró actividad superior al control en aproximadamente 8,3 veces, mientras que la actividad luciferasa derivada del macelignano según la presente invención mostró actividad superior al control en aproximadamente 10,4 veces. Esto indica que el macelignano actúa como ligando de PPAR γ para activar PPAR γ , muestra actividad superior a la de la troglitazona, un compuesto farmacológico conocido, y por tanto es más eficaz para la activación de receptores PPAR γ .

Ejemplo 3

Determinación de la expresión de genes diana inducida por la activación de PPAR del macelignano

<3-1> *Determinación de la expresión de genes diana de PPAR α*

Se pipetearon células hepáticas SK-HEP-1 (ATCC CL-173) cultivadas en medio DMEM que contenía FBS al 10% en una placa de múltiples pocillos en un recuento celular de 1×10^6 células por pocillo, y entonces se cultivaron adicionalmente durante 5 horas. Se añadieron diferentes concentraciones (1, 5, 10 y 25 μ M) de macelignano al medio de las células cultivadas, y entonces se dejaron las células durante 24 horas. Se recogieron las células y se aisló el ARN total usando TRIZOL (Invitrogen, EE.UU.). Se determinó el ARN total aislado tal como se describió anteriormente y se sintetizó ADNc usando transcriptasa inversa a 42°C durante 20 minutos con las mismas cantidades de ARN. Se sometió el ADNc a RT-PCR repitiendo 30 ciclos de 95°C/1 minuto, 56°C/30 segundos y 72°C/2 minutos con los siguientes cebadores y Taq polimerasa: cebadores para la amplificación de CD36 (SEQ ID NO: 5 (CGGCGATGAGAAAGCAGAA) y SEQ ID NO: 6(CAACCAGGCCAGGAGC)), cebadores para la amplificación de CPT-1 (SEQ ID NO: 7 (AGACGGTGGAAACAGAGGCTGAAG) y SEQ ID NO: 8 (TGAGACCAAACAAAGT GATGATGTCAG)), cebadores para la amplificación de PDK4 (SEQ ID NO: 9 (TCAAATCAAATAGCCTTCCC) y SEQ ID NO: 10 (ATAAGTTAAGTGGCCTGG)), y cebadores para la amplificación de ACO (SEQ ID NO: 11 (GGGCATGGCTATTCTCATTGC) y SEQ ID NO: 12 (CGAACAAAGGTCAACAGAAGTTAGGTTTC)).

Tal como se muestra en la figura 8, la expresión de ARNm de CD36, CPT-1, PDK-4 y ACO (genes diana) cuya expresión se aumenta mediante PPAR α , se aumentó significativamente mediante el tratamiento con macelignano en todos los grupos de prueba, en comparación con el control (*, p<0,01; **, p<0,05). Esto indica que el macelignano puede activar PPAR α , y controlar la expresión de genes diana de PPAR α .

<3-2> *Determinación de la expresión de genes diana de PPAR γ*

Se pipetearon preadipocitos de ratón 3T3-L1 (ATCC CL-173) cultivados en medio DMEM que contenía FBS al 10% en una placa de múltiples pocillos en un recuento celular de 1×10^6 células por pocillo, y entonces se cultivaron adicionalmente durante 5 horas. Al medio de las células cultivadas, se le añadieron 10 μ M de macelignano y se dejaron entonces durante 24 horas. Se indujo la diferenciación de adipocitos sustituyendo el medio de las células cultivadas por medio MDI (3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM, dexametasona 0,5 μ M, insulina 10 μ g/ml) (Am. J. Physiol. Cell Physiol., 280: C807-C813, 2001). Se recogieron las células dos días después de la sustitución del medio MDI, y se aisló el ARN total usando TRIZOL (Invitrogen, EE.UU.). Se determinó el ARN total aislado tal como se describió anteriormente, y se sintetizó ADNc usando transcriptasa inversa a 42°C durante 20 minutos con la misma cantidad de ARN. Se sometió el ADNc a RT-PCR repitiendo 30 ciclos de 95°C/1 minuto, 56°C/30 segundos y 72°C/2 minutos con los siguientes cebadores y Taq polimerasa: cebadores para la amplificación de LPL (SEQ ID NO: 13 (TATCCGCGTGATTGCAGAGA) y SEQ ID NO: 14 (AGAGAGTTCGATGAAGAGATGAATGG)), y cebadores para la amplificación de PEPCK (SEQ ID NO: 15 (CAGGCGGCTGAA GAAGTATGA) y SEQ ID NO: 16 (AACCGTCTTGCTTTCGATCCT)).

Tal como se muestra en la figura 9, la expresión de ARNm de LPL y PEPCK (genes diana), cuya expresión se aumenta mediante PPAR γ , se aumentó significativamente mediante el tratamiento con macelignano en todos los grupos de prueba en proporción a la concentración de macelignano, en comparación con el control (*, p<0,01; **, p<0,05). Esto indica que el macelignano puede activar PPAR γ , y controlar la expresión de genes diana de PPAR γ .

Ejemplo 4

Determinación de la estimulación de la diferenciación de adipocitos inducida por la activación de PPAR del macelignano

Se pipetearon preadipocitos de ratón 3T3-L1 cultivados en medio DMEM que contenía FBS al 10% en una placa de múltiples pocillos en un recuento celular de 1×10^6 células por pocillo, y entonces se cultivaron adicionalmente durante 5 horas. A las células cultivadas, se le añadieron 10 μ M de macelignano y entonces se dejaron durante 24 horas. Se indujo la diferenciación de adipocitos sustituyendo el medio de las células cultivadas con medio MDI (3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM, dexametasona 0,5 μ M, insulina 10 μ g/ml) (Am. J. Physiol. Cell Physiol., 280: C807-

ES 2 380 556 T3

C813, 2001). Se observó la forma de las células mediante un microscopio óptico dos días después de la sustitución del medio MDI.

Tal como se muestra en la figura 10, se estimuló la diferenciación de adipocitos en el grupo tratado con macelignano (10 μ M) en comparación con el control tratado con DMSO al 0,01% en lugar de macelignano y con el grupo tratado con 10 μ M de troglitazona. Esto indica que el macelignano puede activar PPAR para maximizar la absorción de azúcar de adipocitos y para estimular la diferenciación de adipocitos.

10 Ejemplo 5

Investigación del efecto anti-diabetes del macelignano en el modelo de ratón con obesidad/diabetes

Un ratón (ratón db/db; The Jackson Laboratory, EE.UU.) usado en la presente invención como modelo de obesidad/diabetes es deficiente en genes de leptinas y no puede controlar su apetito, y por tanto ingiere una cantidad excesiva de alimento de manera continua. Como resultado, el ratón acumula grasa excesiva en el cuerpo y muestra sobrepeso e hiperlipidemia en comparación con un ratón normal. Por tanto, puede ser un modelo típico de obesidad y enfermedades metabólicas. Adicionalmente, tiene un nivel de azúcar en sangre superior y puede ser un modelo típico de diabetes mellitus no insulino dependiente.

Para investigar el efecto de prevenir y tratar la diabetes del macelignano, se usaron siete ratones con obesidad/diabetes de 10 semanas de edad (ratones db/db) por grupo de prueba. A estos grupos de prueba, se les administró por vía oral macelignano suspendido en carboximetilcelulosa al 0,25% con la dosis de 5 mg/kg (peso corporal), 10 mg/kg (peso corporal) y 25 mg/kg (peso corporal), una vez al día en un tiempo predeterminado, durante 14 días. Como control, se administró por vía oral carboximetilcelulosa al 0,25% sola a ratones normales en la misma dosis que se administró al grupo de prueba. Como otro control, se administró por vía oral carboximetilcelulosa al 0,25% sola a ratones con obesidad/diabetes en la misma dosis que se administró al grupo de prueba. Como todavía otro control, se administraron por vía oral 10 mg/kg (peso corporal) de troglitazona. Se determinaron los niveles de azúcar en sangre de los ratones con obesidad/diabetes desde seis días antes de la administración, una vez cada tres días. En el día 12 tras la administración oral, se sometieron el grupo de prueba y los controles a la prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO). Para esta prueba, se mantuvieron en ayunas ratones con obesidad/diabetes en el grupo de prueba y los controles durante al menos 18 horas, se administró por vía oral glucosa a los ratones en una dosis de 3 g/kg (peso corporal), y entonces se midieron las variaciones en la glucemia a los 0 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos tras la administración de glucosa. Adicionalmente, en el día 14 de la administración oral, se analizaron el nivel de azúcar en sangre final, el contenido de insulina en sangre (kit de ELISA de insulina de ratón, Linco Research, o. EZRMI-BK, EE.UU.) y el contenido en adiponectina en sangre (kit de ELISA Quantikine de adiponectina, R&D systems, n.º MRP300, EE.UU.).

Como resultado de la medición de las variaciones en la glucemia durante 14 días desde el día de administración en el grupo de prueba y los controles, tal como se muestra en la figura 11, el nivel de azúcar en sangre en el grupo de prueba mostró una tendencia a disminuir en comparación con los controles. Particularmente, 14 días tras la administración oral, el nivel de azúcar en sangre en el control de ratón con obesidad/diabetes era de $618,61 \pm 35,03$ mg/dl, mientras que los grupos de prueba tratados con macelignano en una dosis de 5 mg/kg (peso corporal), 10 mg/kg (peso corporal) y 25 mg/kg (peso corporal) mostraron una caída en el nivel de azúcar en sangre hasta $552,84 \pm 47,95$ mg/dl, $501,03 \pm 43,67$ mg/dl y $412,74 \pm 31,15$ mg/dl, respectivamente ($p < 0,05$).

Además, como resultados de llevar a cabo la PTGO y medir el contenido en insulina en sangre y de adiponectina en sangre, tal como se muestra en la siguiente tabla 2 y las figuras 12~14, los grupos de prueba tratados con macelignano mostraron un aumento significativo en la tolerancia a la glucosa, una disminución significativa en la concentración de insulina en sangre y un aumento significativo en la concentración de adiponectina en sangre.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 380 556 T3

TABLA 2

		Ratones normales	Controles negativos	Triglitazona 10 mg/kg (peso corporal)	Macelignano 5 mg/kg (peso corporal)	Macelignano 10 mg/kg (peso corporal)	Macelignano 25 mg/kg (peso corporal)
PTGO (mg/dl)	0 min.	110,57± 13,70	378,14± 19,56	303,43 ± 37,83	379,14± 26,23	313,86± 51,40	319,14± 3525
	30 min.	450,00± 35,49	795,14± 103,08	610,57 ± 76,21	636,85± 63,29	670,14± 94,20	580,00± 101,37
	60 min.	296,85± 51,21	643,01± 45,75	523,70 ± 17,10	613,38± 24,36	593,11± 27,15	509,70± 27,71
	120 min.	199,04± 17,77	600,35± 11,48	456,41 ± 54,69	564,21± 29,86	529,46± 17,55	431,21± 59,18
Concentración de insulina en sangre (ng/ml)		5,25 ± 3,27	34,45± 6,33	18,57 ± 5,88	26,33± 10,78	16,66± 7,03	8,51 ± 3,67
Concentración de adiponectina en sangre (ng/ml)		7666,86± 570,63	3881,14± 396,51	6682,33± 250,05	5111,14± 925,88	6882,86± 250,05	7864,00± 808,21

Tal como puede observarse a partir de los resultados globales tal como se describió anteriormente en el presente documento, el tratamiento con macelignano en un modelo de ratón con obesidad/diabetes puede disminuir el contenido en insulina en sangre, aumentar la adiponectina en sangre, mejorar la tolerancia a la glucosa y disminuir la glucemia, de modo que el macelignano es eficaz para mejorar la resistencia a la insulina y para prevenir y tratar diabetes mellitus.

Ejemplo 6

Evaluación del efecto anti-obesidad del macelignano

Para investigar el efecto anti-obesidad del macelignano, se usaron siete ratones con obesidad/diabetes de 10 semanas de edad (ratones db/db) por grupo de prueba. A los grupos de prueba, se les administró por vía oral macelignano suspendido en carboximetilcelulosa al 0,25% en una dosis de administración de 5 mg/kg (peso corporal), 10 mg/kg (peso corporal) y 25 mg/kg (peso corporal), una vez al día en un tiempo predeterminado, durante 14 días. Como control, se administró por vía oral carboximetilcelulosa al 0,25% sola a ratones normales en la misma dosis que se administró al grupo de prueba. Como otro control, se administró por vía oral carboximetilcelulosa al 0,25% sola a ratones con obesidad/diabetes en la misma dosis que se administró al grupo de prueba. Como todavía otro control, se administraron por vía oral 10 mg/kg (peso corporal) de troglitazona. Desde 6 días antes de la administración, se midieron la ingesta de la dieta y el peso corporal de cada ratón con obesidad/diabetes una vez cada tres días. Adicionalmente, en el día 14 tras la administración oral, se midieron el peso de tejido adiposo blanco y la cantidad de triglicéridos acumulada en células musculares (kit de medición de triglicéridos, Wako, n.º 432-40201, Japón).

Como resultado de la medición de las variaciones en la ingesta de la dieta y el peso corporal en el grupo de prueba y en los controles durante 14 días tras la administración, tal como se muestra en la figura 15, los grupos de prueba y los controles no tenían diferencias significativas en cuanto a la ingesta de la dieta. Por el contrario, tal como se muestra en la figura 16, cuando se midieron en el día 14 de la administración oral, los ratones en el grupo

ES 2 380 556 T3

control mostraron un peso corporal de $48,16 \pm 2,09$ g, mientras que los grupos de prueba tratados con macelignano en una dosis de 5 mg/kg (peso corporal), 10 mg/kg (peso corporal) y 25 mg/kg (peso corporal) mostraron una caída en el peso corporal hasta $46,32 \pm 2,31$ g, $43,8 \pm 2,94$ g y $41,80 \pm 1,56$ g, respectivamente ($p < 0,05$). Adicionalmente, en el día 14 tras la administración oral, tal como se muestra en la figura 17, el control mostró un peso de tejido adiposo blanco de $4508,30 \pm 605,20$ mg, mientras que los grupos de prueba tratados con macelignano en una dosis de 5 mg/kg (peso corporal), 10 mg/kg (peso corporal) y 25 mg/kg (peso corporal) mostraron una caída en el peso de tejido adiposo blanco hasta $4231,9 \pm 284,5$ g, $3904,1 \pm 278,6$ g y $2689,40 \pm 154,2$ g, respectivamente ($p < 0,05$). Además, tal como se muestra en la figura 18, el control mostró una acumulación de triglicéridos intramuscular de $27,62 \pm 2,44$ mg, mientras que los grupos de prueba tratados con macelignano en una dosis de 5 mg/kg (peso corporal), 10 mg/kg (peso corporal) y 25 mg/kg (peso corporal) mostraron una caída en la acumulación de triglicéridos intramuscular hasta $24,73 \pm 4,74$ g, $22,80 \pm 5,76$ g y $20,24 \pm 3,82$ g, respectivamente ($p < 0,05$). Tal como puede observarse a partir de los resultados anteriores, en un modelo de obesidad/diabetes, la administración oral de macelignano puede disminuir el peso corporal, el peso de tejido adiposo y la acumulación de grasa intramuscular. Por tanto, el macelignano es eficaz para prevenir y tratar la obesidad.

15

Ejemplo 7

Investigación del efecto del macelignano sobre hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares

20

Para investigar los efectos del macelignano sobre el tratamiento de hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares, se usaron siete ratones con obesidad/diabetes de 10 semanas de edad (ratones db/db) por grupo de prueba. A los grupos de prueba, se les administró por vía oral macelignano suspendido en carboximetilcelulosa al 0,25% en una dosis de administración de 5 mg/kg (peso corporal), 10 mg/kg (peso corporal) y 25 mg/kg (peso corporal), una vez al día en un tiempo predeterminado, durante 14 días. Como control, se administró por vía oral carboximetilcelulosa al 0,25% sola a ratones normales en la misma dosis que se administró al grupo de prueba. Como otro control, se administró por vía oral carboximetilcelulosa al 0,25% sola a ratones con obesidad/diabetes en la misma dosis que se administró al grupo de prueba. Como todavía otro control, se administraron por vía oral 10 mg/kg (peso corporal) de troglitazona.

30

Catorce días tras la administración, se midieron la concentración de triglicéridos en sangre (kit de medición de triglicéridos, Wako, Japón), la concentración de ácidos grasos libres en sangre (kit de medición de ácidos grasos libres, Wako, Japón), el contenido en colesterol total en sangre (ASAN T-CHO-Lq Reagents, Asan Pharmaceutical Co. Ltd., Korea), el contenido en colesterol de HDL en sangre (ASAN HDL-Cholesterol, Asan Pharmaceutical Co. Ltd., Korea), el contenido en IL-6 en sangre (ELISA Quantikine de IL-6, R&D systems, EE.UU.) y el contenido en TNF- α en sangre para los grupos de prueba y los controles.

35

Tal como se muestra en la siguiente tabla 3 y las figuras 19~24, la concentración de triglicéridos, la concentración de ácidos grasos libres, el contenido en IL-6 y el contenido en TNF- α en sangre disminuyeron significativamente. No hubo diferencias significativas en el contenido en colesterol total en sangre entre el control y los grupos de prueba. Sin embargo, el contenido en colesterol de HDL en sangre aumentó significativamente en los grupos de prueba.

40

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 380 556 T3

TABLA 3

	Ratones normales	Control negativo	Triglitazona 10 mg/kg (peso corporal)	Macelignano 5 mg/kg (peso corporal)	Macelignano 10 mg/kg (peso corporal)	Macelignano 25 mg/kg (peso corporal)
Triglicéridos en sangre (mg/dl)	72,57 ± 3636	279,29 ± 67,89	112,57 ± 57,47	98,71 ± 36,62	91,71 ± 44,04	84,00 ± 31,24
Ácidos grasos libres en sangre (mEq/l)	0,76 ± 0,27	1,69 ± 0,34	1,22 ± 0,27	1,26 ± 0,19	1,16 ± 0,31	1,14 ± 0,15
Colesterol total en sangre (ng/ml)	98,33 ± 19,69	146,29 ± 12,67	133,67 ± 34,86	118,86 ± 13,75	109,71 ± 15,25	110,40 ± 23,72
Colesterol de HDL en sangre (ng/ml)	35,74 ± 6,41	23,07 ± 8,97	43,85 ± 6,34	43,50 ± 6,73	42,17 ± 7,29	46,58 ± 3,89
IL-6 en sangre (pg/ml)	3,97 ± 1,60	36,42 ± 10,2	10,24 ± 3,60	21,42 ± 1142	12,04 ± 5,47	4,86 ± 2,46
TNF- α en sangre (pg/ml)	24,99 ± 8,04	49,59 ± 9,86	30,49 ± 13,18	36,92 ± 16,27	16,41 ± 9,60	27,54 ± 9,77

Por tanto, puede observarse a partir de los resultados anteriores que el macelignano es eficaz para prevenir y tratar hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares, porque los grupos de prueba tratados con macelignano en el modelo de ratón con obesidad/diabetes muestran una caída en la concentración de triglicéridos, la concentración de ácidos grasos libres, la concentración de IL-6 y la concentración de TNF- α en sangre, y un aumento en el contenido en colesterol de HDL.

Ejemplo 8

Investigación del efecto del macelignano sobre la prevención y el tratamiento de hígado graso

Para investigar los efectos del macelignano sobre la prevención y el tratamiento de hígado graso, se usaron siete ratones con obesidad/diabetes de 10 semanas de edad (ratones db/db) por grupo de prueba. A los grupos de prueba, se les administró por vía oral macelignano suspendido en carboximetilcelulosa al 0,25% en una dosis de administración de 5 mg/kg (peso corporal), 10 mg/kg (peso corporal) y 25 mg/kg (peso corporal), una vez al día en un tiempo predeterminado, durante 14 días en total. Como control, se administró por vía oral carboximetilcelulosa al 0,25% sola a ratones normales en la misma dosis que se administró al grupo de prueba. Como otro control, se administró por vía oral carboximetilcelulosa al 0,25% sola a ratones con obesidad/diabetes en la misma dosis que se administró al grupo de prueba. Como todavía otro control, se administraron por vía oral 10 mg/kg (peso corporal) de troglitazona. Catorce días tras la administración oral, se aisló el tejido hepático y se trituró para extraer el contenido en grasas y lípidos total, y entonces se midió el contenido en triglicéridos acumulado en el tejido hepático.

ES 2 380 556 T3

Tal como se muestra en la figura 25, el contenido en triglicéridos en el tejido hepático era de $10,32 \pm 1,72$ mg/g en el control, mientras que el contenido en triglicéridos en sangre, que era de $6,30 \pm 1,59$ mg/g, disminuyó significativamente en el grupo de prueba tratado con 25 mg/kg de macelignano (*, $p < 0,05$). Por tanto, puede observarse que el macelignano es eficaz para prevenir y tratar hígado graso.

5

Ejemplo 9

10 *Determinación de la expresión de genes diana inducida por la activación de PPAR en el modelo de ratón con obesidad/diabetes*

<9-1> *Determinación de la expresión de genes diana de PPAR α*

15 Se extrajo tejido hepático de los grupos de prueba y los controles tratados mediante administración oral en los ejemplos 5~8. Se homogeneizó el tejido hepático en nitrógeno líquido y se aisló el ARN total de los tejidos usando TRIZOL (Invitrogen, EE.UU.). Se determinó el ARN total aislado tal como se describió anteriormente y se sintetizó ADNc usando transcriptasa inversa a 42°C durante 20 minutos con la misma cantidad de ARN. Se sometió el ADNc a RT-PCR repitiendo 30 ciclos de 95°C/1 minuto, 56°C/30 segundos y 72°C/2 minutos con los siguientes cebadores y Taq polimerasa: cebadores para la amplificación de CD36 (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6), cebadores para la amplificación de ACO (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12), y cebadores para la amplificación de CPT-1 (SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8). Se determinó la expresión de los genes mediante PCR en tiempo real.

25 Finalmente, tal como se muestra en la figura 26, la expresión de ARNm de CD36, ACO y CPT-1 (genes diana), cuya expresión mediante PPAR α , se aumentó significativamente mediante el tratamiento con macelignano en todos los grupos de prueba, en comparación con el control (*, $p < 0,05$). En el presente documento, los gráficos mostrados en la figura 26 se realizan mediante el procesamiento estadístico de los resultados obtenidos a partir de cada ratón usado en los ejemplos 5~8. Cada fotografía mostrada con los gráficos ilustra el resultado típico. Esto indica que el macelignano puede activar PPAR α , y controlar la expresión de genes diana de PPAR α , lo que puede desempeñar papeles importantes en la oxidación de ácidos grasos, el metabolismo de grasas y la inhibición de la inflamación, reduciendo de ese modo las grasas en sangre y tejido hepático. Por tanto, puede observarse que el macelignano es eficaz para prevenir y tratar hiperlipidemia, enfermedades cardiovasculares e hígado graso mediados por PPAR.

30

<9-2> *Determinación de la expresión de genes diana de PPAR γ*

35

Se extrajo tejido hepático de los grupos de prueba y los controles tratados mediante administración oral en los ejemplos 5~8. Se homogeneizó el tejido hepático en nitrógeno líquido y se aisló el ARN total de los tejidos triturados usando TRIZOL (Invitrogen, EE.UU.). Se determinó el ARN total aislado tal como se describió anteriormente y se sintetizó ADNc usando transcriptasa inversa a 42°C durante 20 minutos. Se sometió el ADNc a RT-PCR repitiendo el ciclo de 95°C/1 minuto, 56°C/30 segundos y 72°C/2 minutos treinta veces con los siguientes cebadores y Taq polimerasa: cebadores para la amplificación de CD36 (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6), cebadores para la amplificación de LPL (SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14), cebadores para la amplificación de ACS (SEQ ID NO: 17 (AGCAGAGCTTCGCACGGC) y SEQ ID NO: 18 (TCTGCTGTTTCGCTGGGTCC) y cebadores para la amplificación de GyK (SEQ ID NO: 19 (TCGAACCCGAGGATTTGCT) y SEQ ID NO: 20 (AATTTCACTTTCCTCCGCATTAAT)). Se determinó la expresión de los genes mediante PCR en tiempo real.

40

45

Finalmente, tal como se muestra en la figura 27, la expresión de ARNm de CD36, LPL, ACS y GyK (genes diana, cuya expresión se aumenta mediante PPAR γ) se aumentó significativamente mediante el tratamiento con macelignano en todos los grupos de prueba, en comparación con el control (*, $p < 0,05$). En el presente documento, los gráficos mostrados en la figura 27 se realizan mediante el procesamiento estadístico de los resultados obtenidos a partir de cada ratón usado en los ejemplos 5~8. Cada fotografía mostrada con los gráficos ilustra los resultados típicos. Esto indica que el macelignano puede activar PPAR γ , y controlar la expresión de genes diana de PPAR γ , desempeñando papeles importantes en el metabolismo de azúcares, reduciendo de ese modo el nivel de azúcar en sangre y aumentando la sensibilidad a la insulina. Por tanto, puede observarse que el macelignano es eficaz para prevenir y tratar diabetes mellitus y complicaciones diabéticas tales como enfermedades relacionadas con el metabolismo de azúcares, mediadas por PPAR.

50

55

Ejemplo de preparación 1

60

Preparación de un medicamento que comprende una composición farmacéutica para tratar y prevenir obesidad, hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares según la presente invención

<1-1> *Preparación de comprimidos*

65

En primer lugar, se introdujeron 25 mg de macelignano según la presente invención en una mezcladora en forma de U junto con 26 mg de lactosa y 3,5 mg de Avicel (celulosa amorfa) como excipientes para la preparación de comprimidos directa, 1,5 mg de gliconato sódico de almidón como agente disgregante complementario y 8 mg de L-

ES 2 380 556 T3

HPC (hidroxipropilcelulosa de baja sustitución) como aglutinante, y entonces se mezcló la mezcla durante 20 minutos. Tras la finalización del mezclado, se añadió adicionalmente a lo mismo 1 mg de estearato de magnesio como lubricante, seguido por mezclado durante 3 minutos adicionales. Se sometió la mezcla a una prueba de determinación del peso y una prueba de anti-humedad. Entonces, se prepararon comprimidos a partir de la mezcla y se recubrieron con una película para proporcionar comprimidos terminados.

<1-2> Preparación de jarabe

Se preparó jarabe que comprende macelignano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad del 2% (P/V) como componente activo mediante el siguiente procedimiento: se disolvieron 2 g de una sal de adición de ácido de macelignano según la presente invención, 0,8 g de sacarina y 25,4 g de azúcar en 80 g de agua caliente. Tras enfriar la disolución, se mezclaron con la disolución 8,0 g de glicerina, 0,04 g de un perfume, 4,0 g de etanol, 0,4 g de ácido sórbico y una cantidad adecuada de agua destilada. Se añadió agua a la mezcla resultante hasta el volumen final de 100 ml.

<1-3> Preparación de cápsulas

En primer lugar, se mezclaron 50 mg de macelignano según la presente invención, 50 mg de lactosa, 46,5 mg de almidón, 1 mg de talco y una cantidad adecuada de estearato de magnesio. Entonces, se llenaron cápsulas de gelatina dura con la mezcla para proporcionar cápsulas terminadas.

<1-4> Preparación de disolución para inyección

Se preparó una disolución para inyección que comprendía 10 mg del componente activo mediante el siguiente procedimiento: se disolvieron 1 g de sal de clorhidrato de macelignano según la presente invención, 0,6 g de cloruro de sodio y 0,1 g de ácido ascórbico en agua destilada hasta el volumen final de 100 ml. Se introdujo la disolución en ampollas, y se calentaron y esterilizaron las ampollas a 120°C durante 30 minutos.

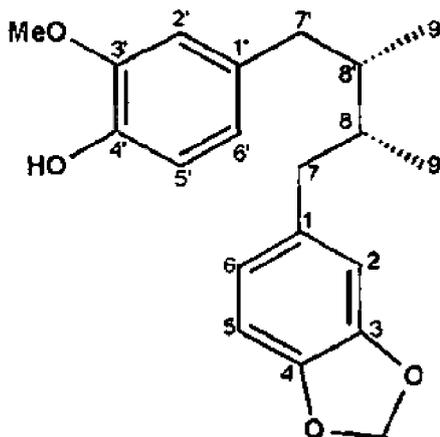
Aplicabilidad industrial

Tal como puede observarse a partir de lo anterior, el macelignano según la presente invención funciona como ligando de PPAR y activa PPAR, de modo que tiene el efecto de prevenir y tratar enfermedades mediadas por PPAR definidas en las reivindicaciones. Por tanto, el macelignano según la presente invención es útil para prevenir y tratar enfermedades mediadas por PPAR tales como diabetes mellitus y complicaciones diabéticas.

REIVINDICACIONES

1. Uso de macelignano representado por la siguiente fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad mediada por PPAR seleccionada del grupo que consiste en: DMNID (diabetes mellitus no insulino dependiente), hiperinsulinemia, obesidad, hiperglucemia, hiperlipidemia, síndrome X, hipercolesterolemia, hiperlipoproteinemia, aterosclerosis, hipertensión, resistencia a la insulina, síndrome dismetabólico, homeostasis de la glucosa alterada, tolerancia a la glucosa alterada, hipertrigliceridemia, osteoporosis, glomerulonefritis o nefropatía diabética.

[Fórmula I]



2. Uso según la reivindicación 1, en el que el PPAR es PPAR α o PPAR γ .

FIG. 1

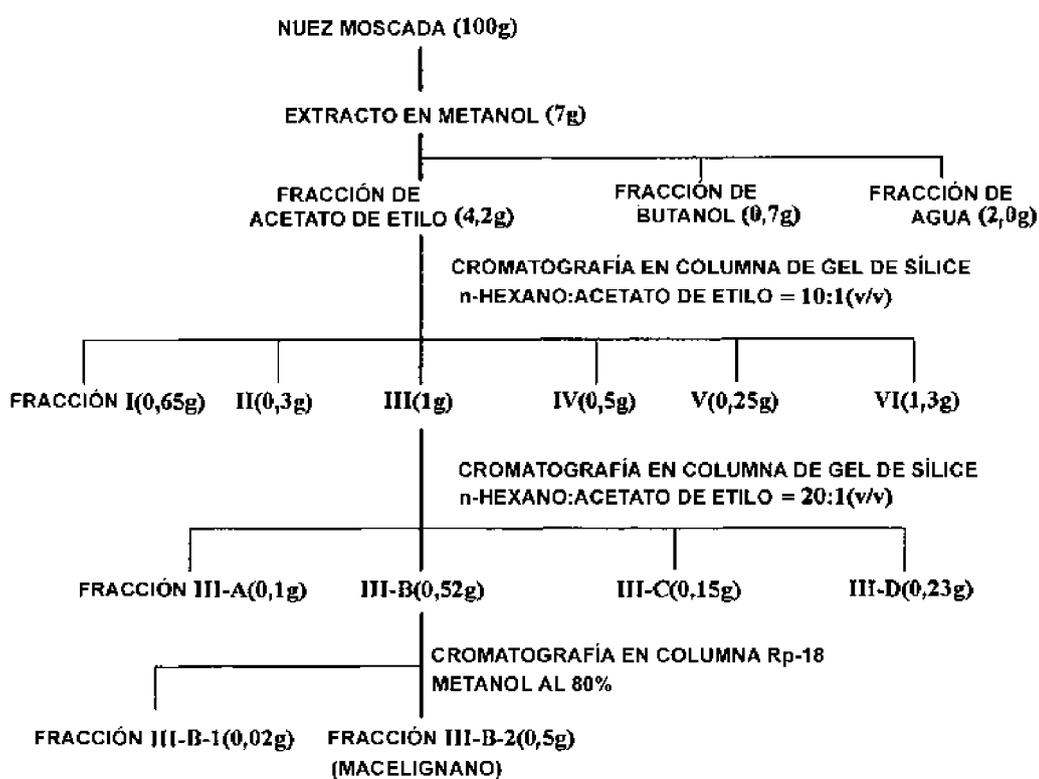


FIG. 2

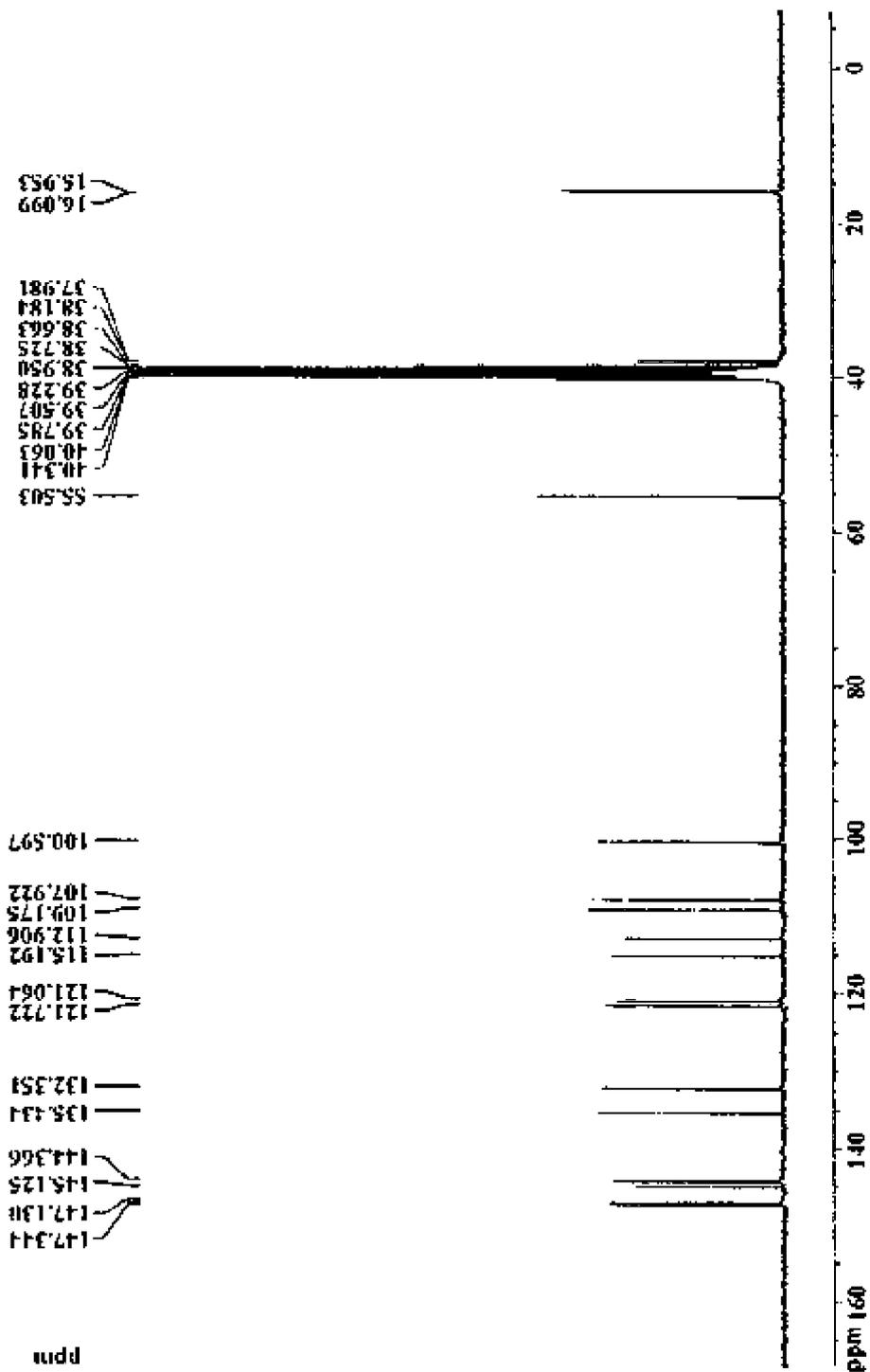


FIG. 3

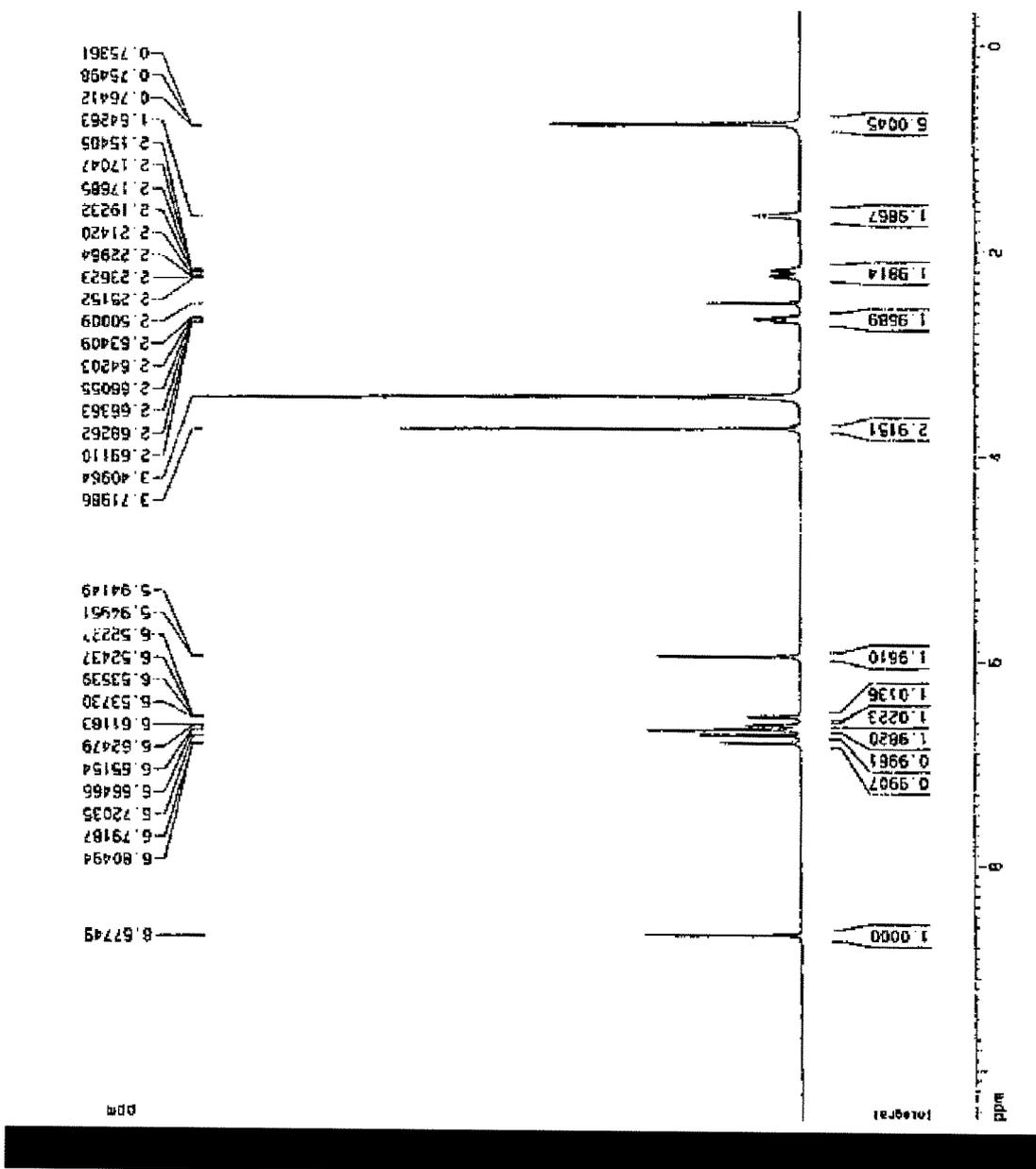


FIG. 4

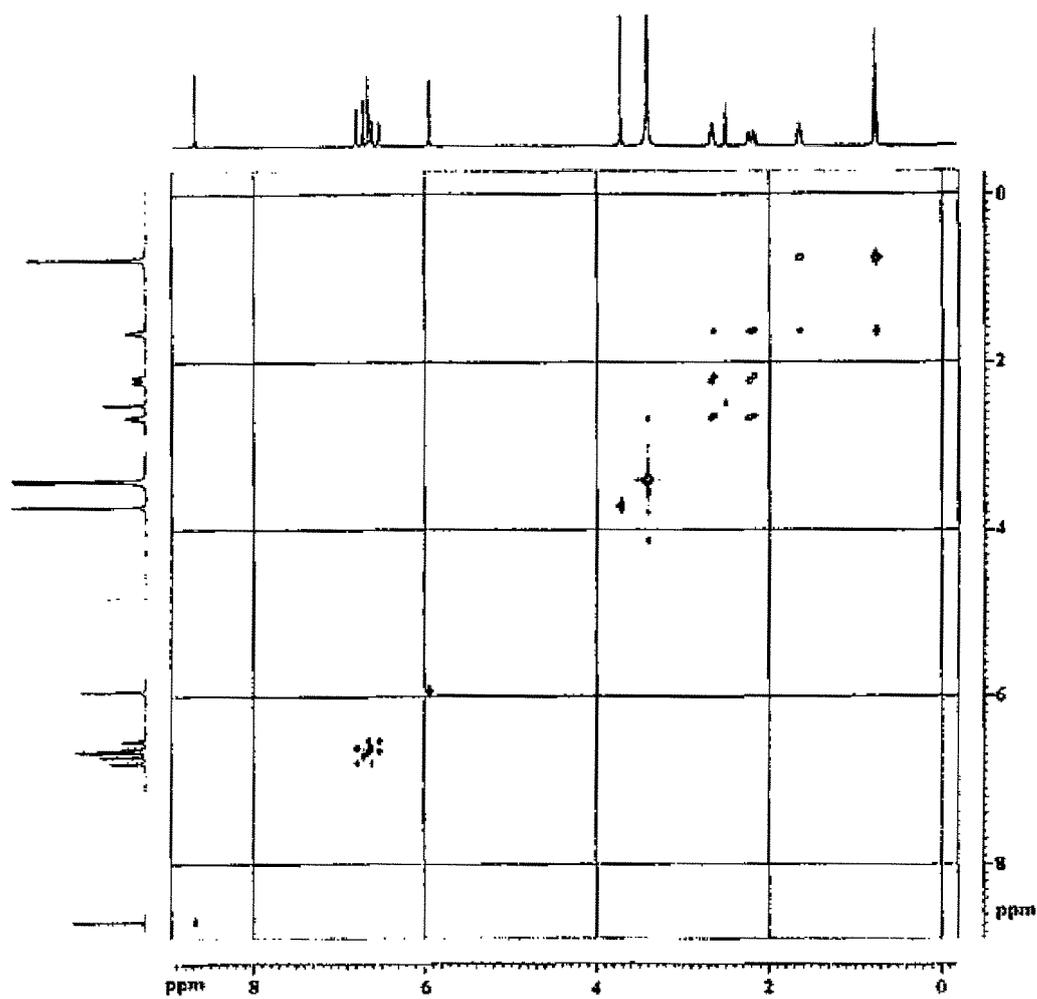


FIG. 5

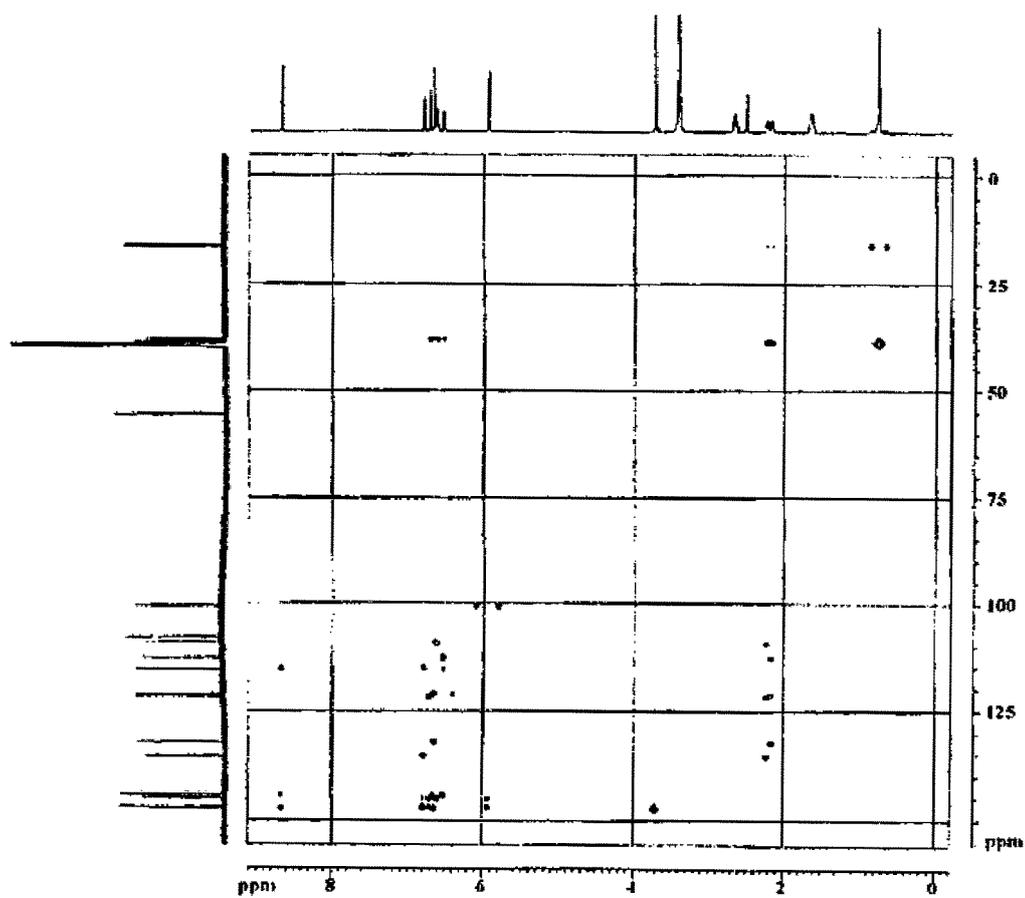


FIG. 6

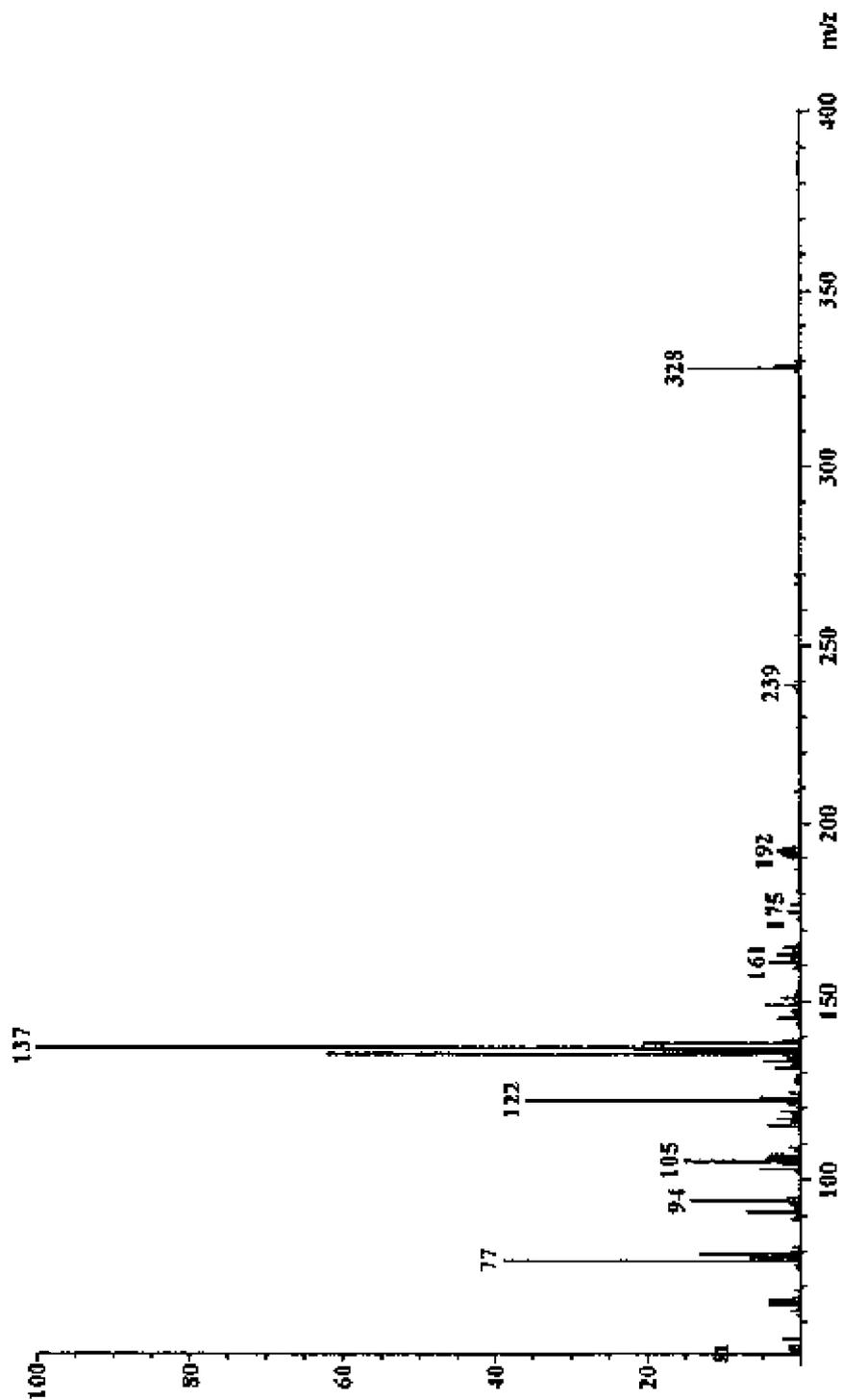


FIG. 7

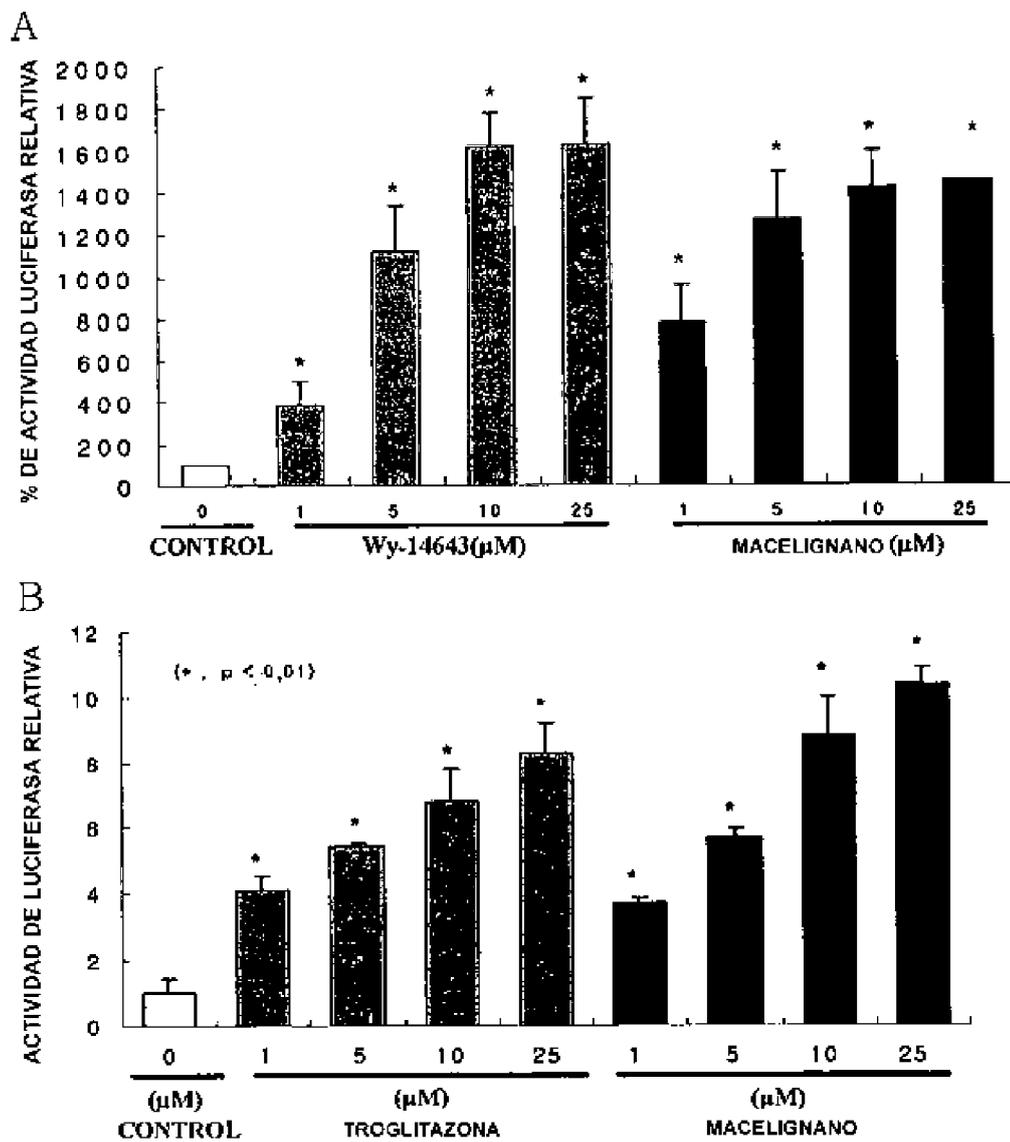


FIG. 8

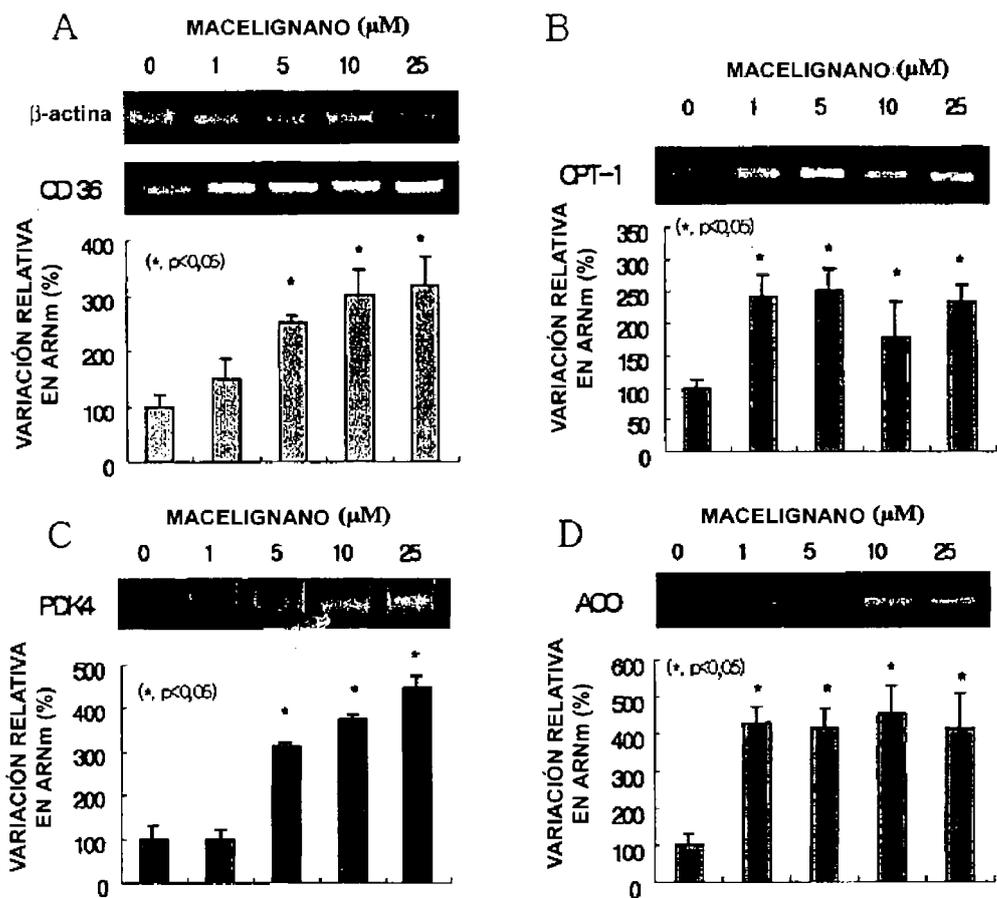


FIG. 9

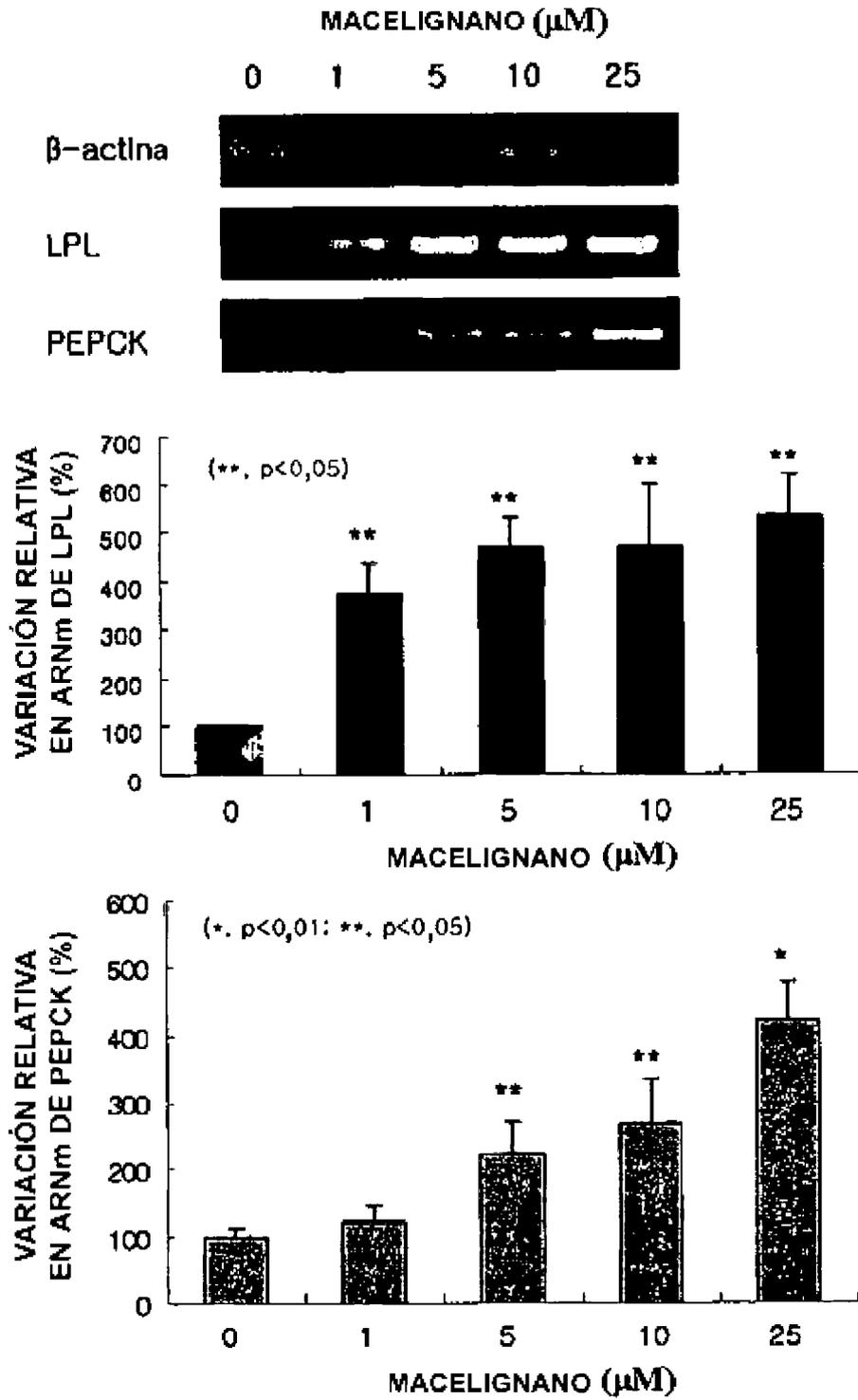


FIG. 10

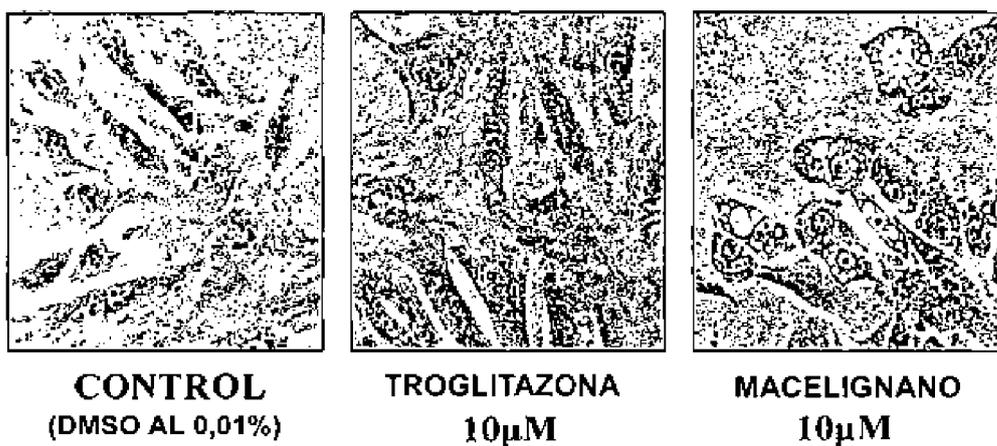


FIG. 11

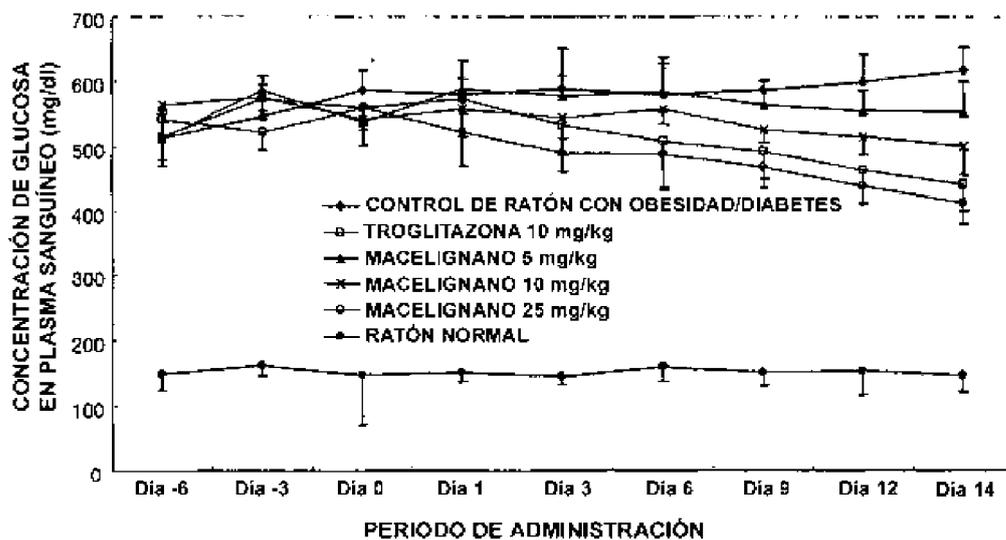


FIG. 12

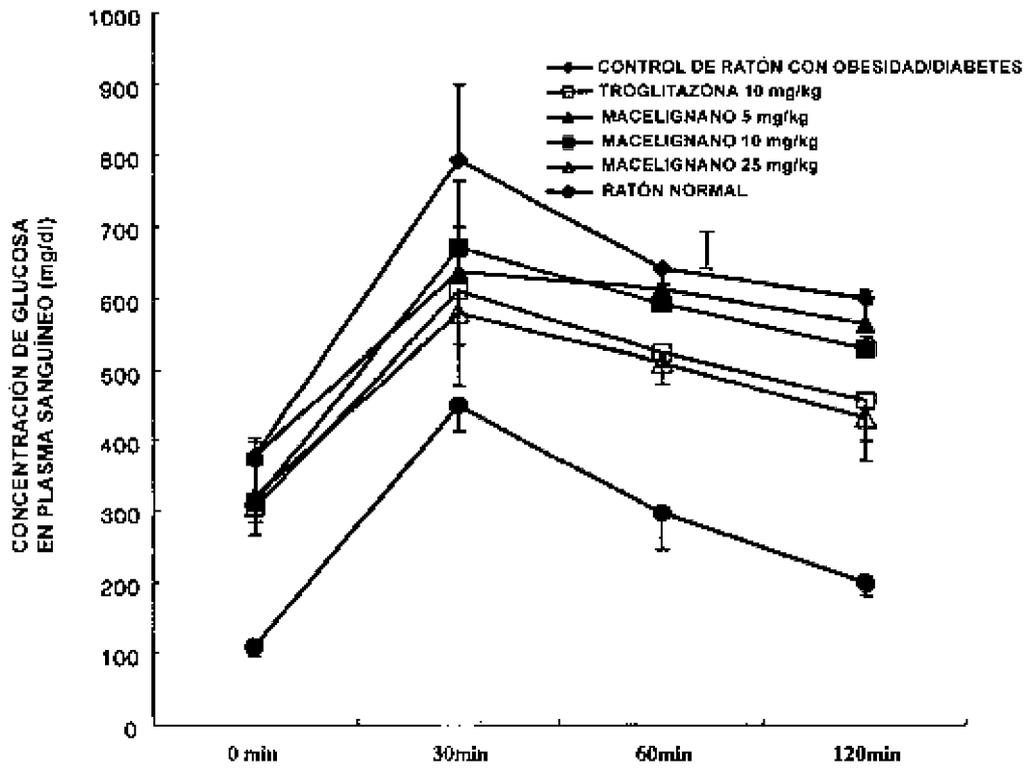


FIG. 13

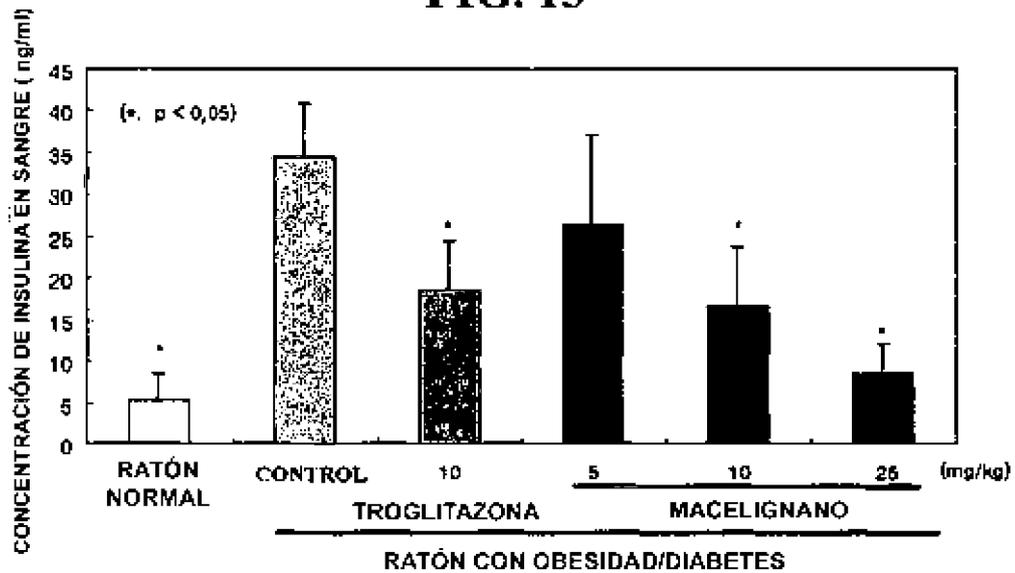


FIG. 14

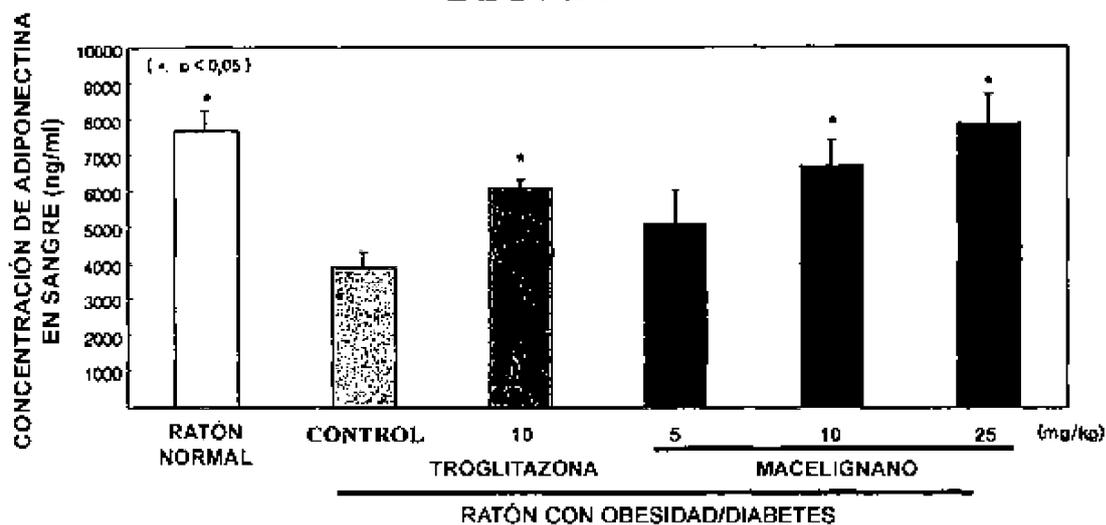


FIG. 15

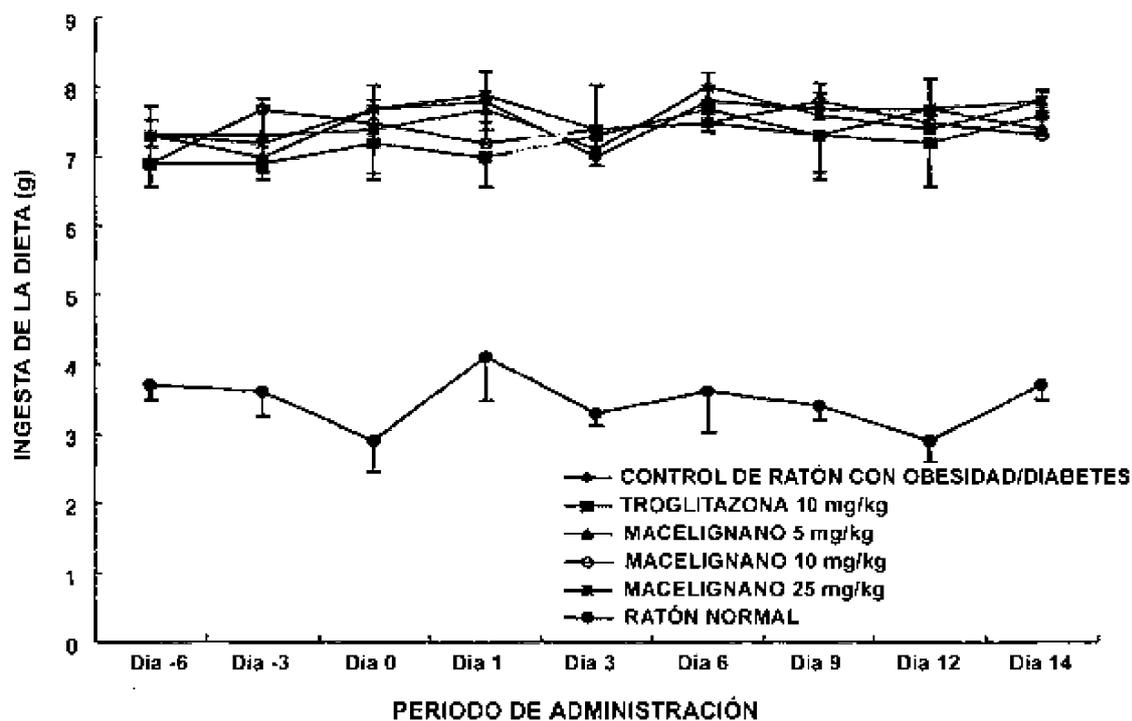


FIG. 16

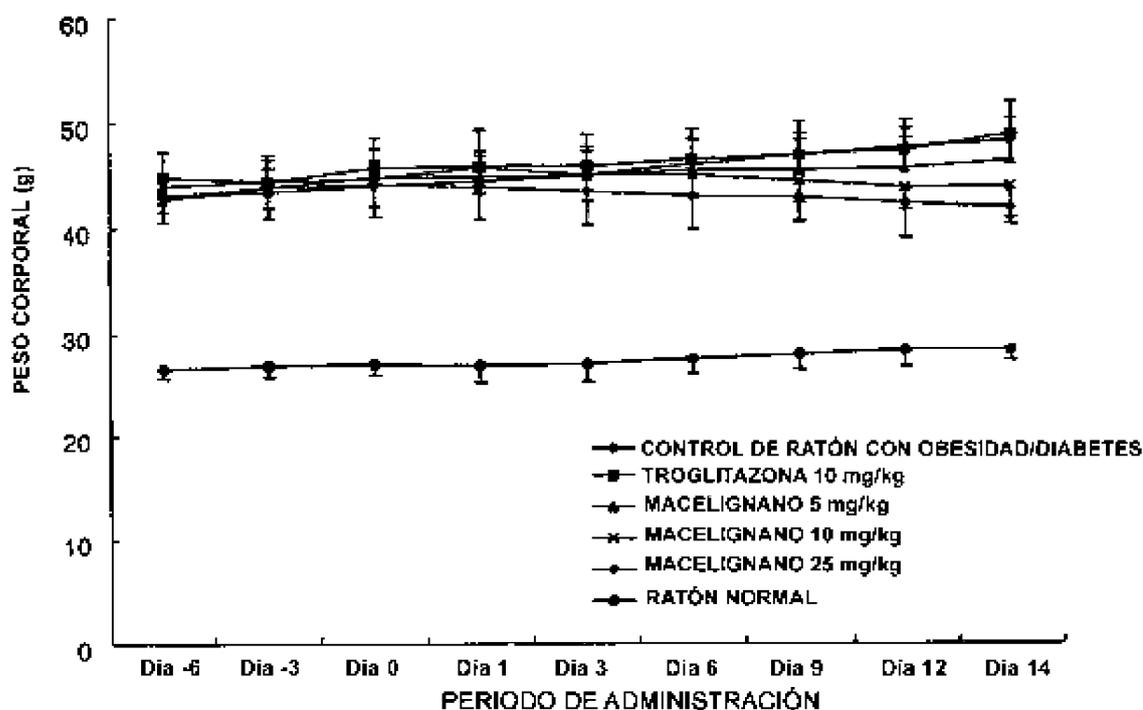


FIG. 17

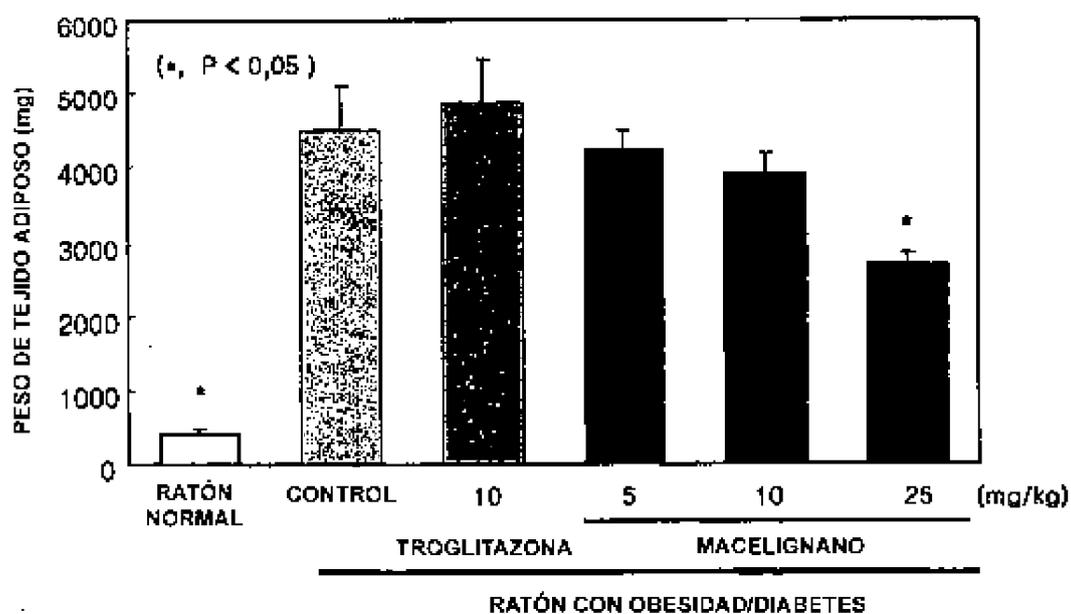


FIG. 18

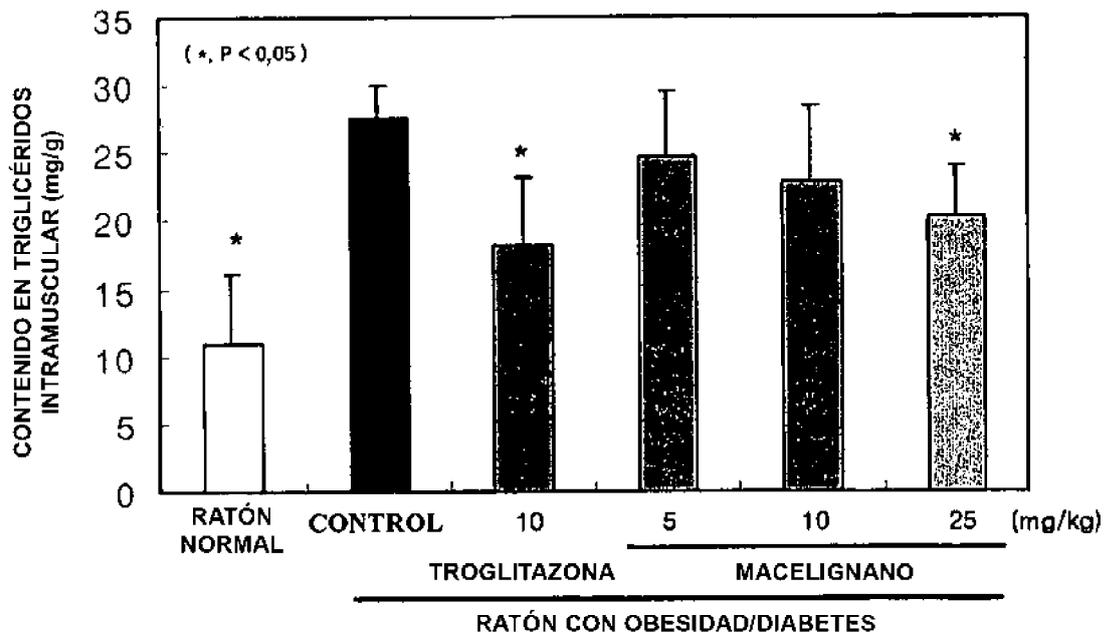


FIG. 19

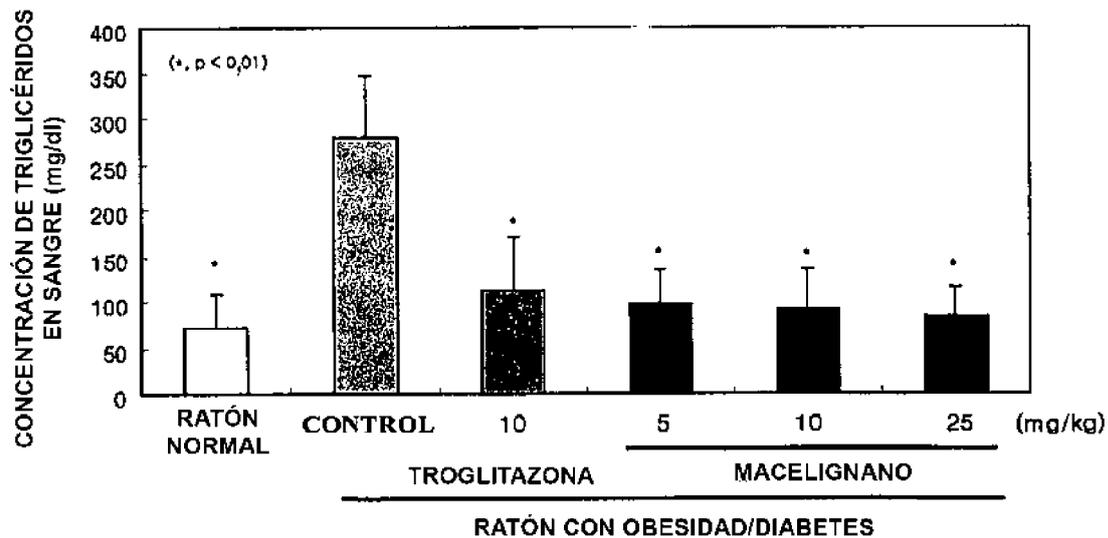


FIG. 20

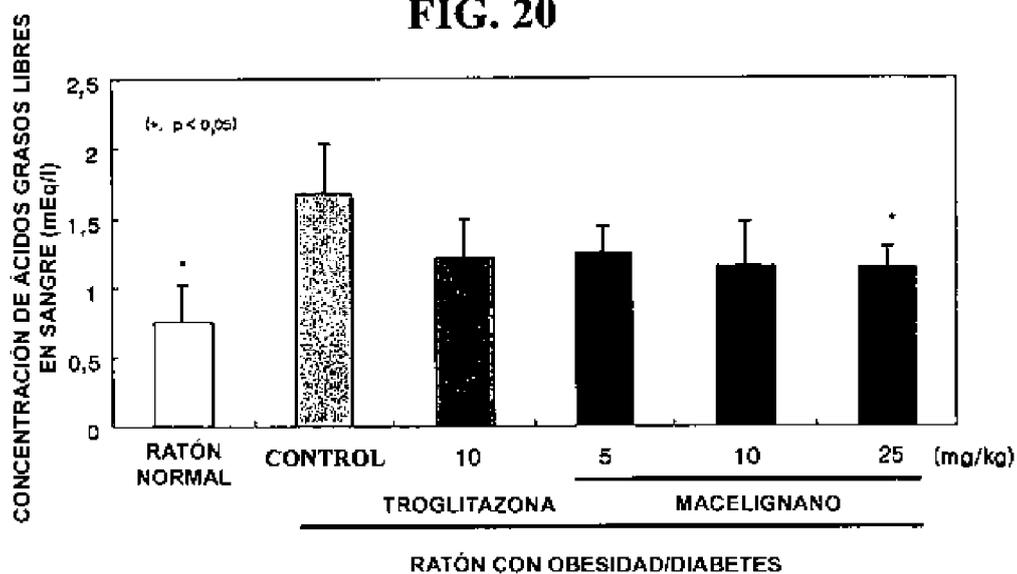


FIG. 21

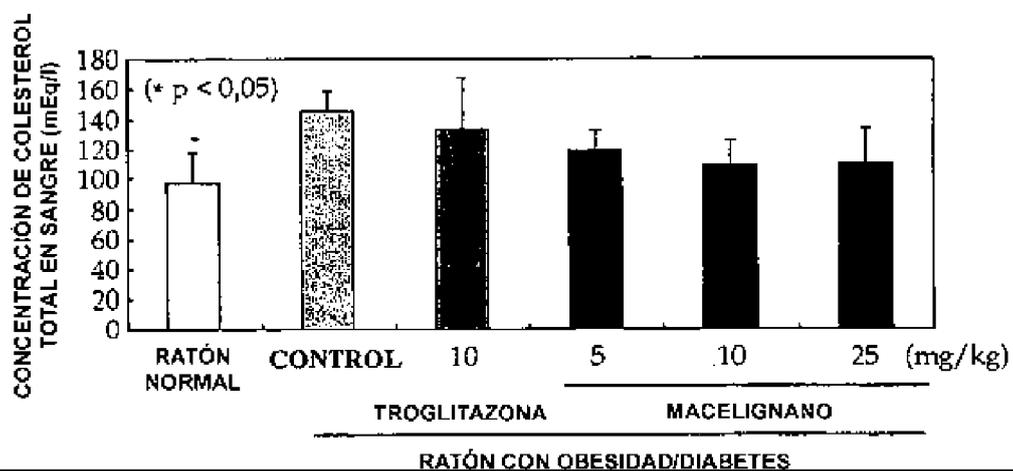


FIG. 22

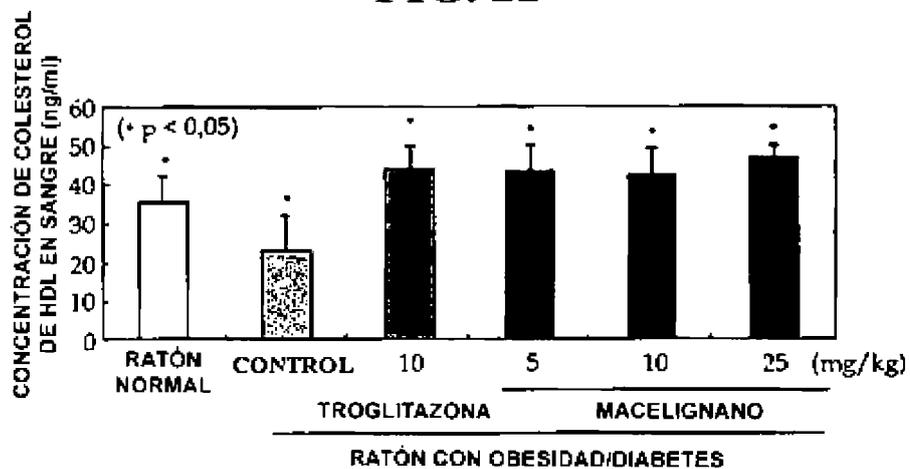


FIG. 23

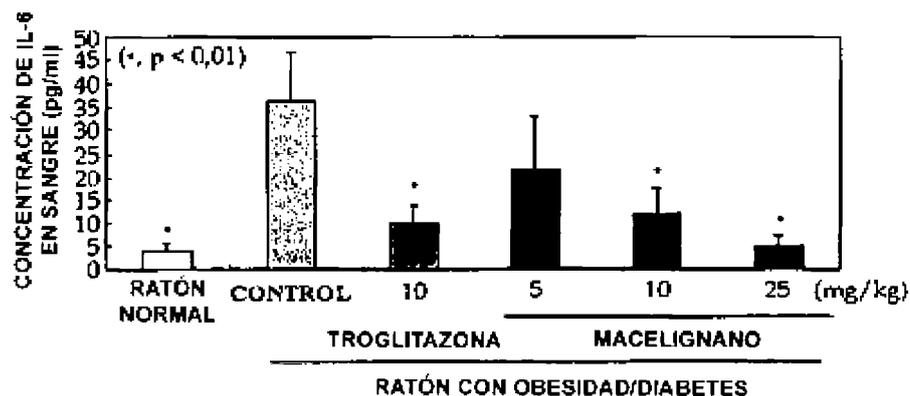


FIG. 24

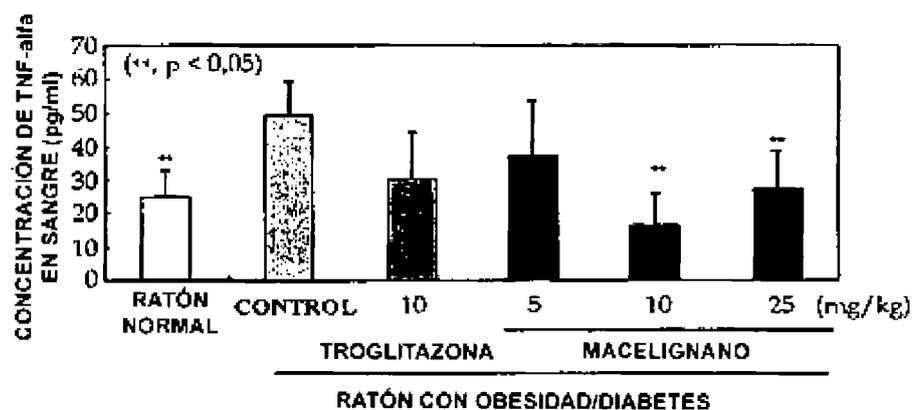


FIG. 25

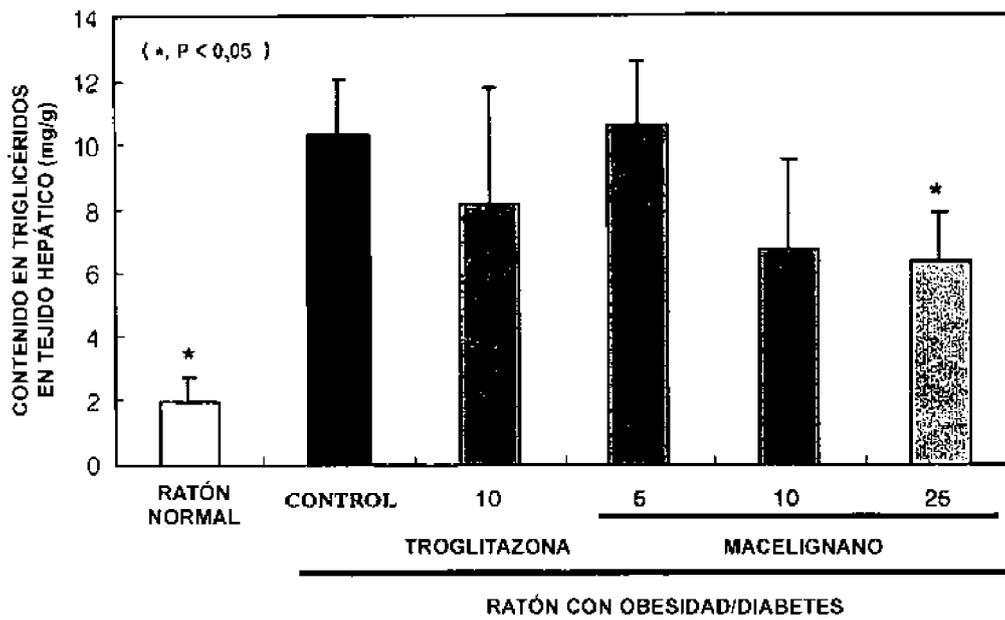


FIG. 26

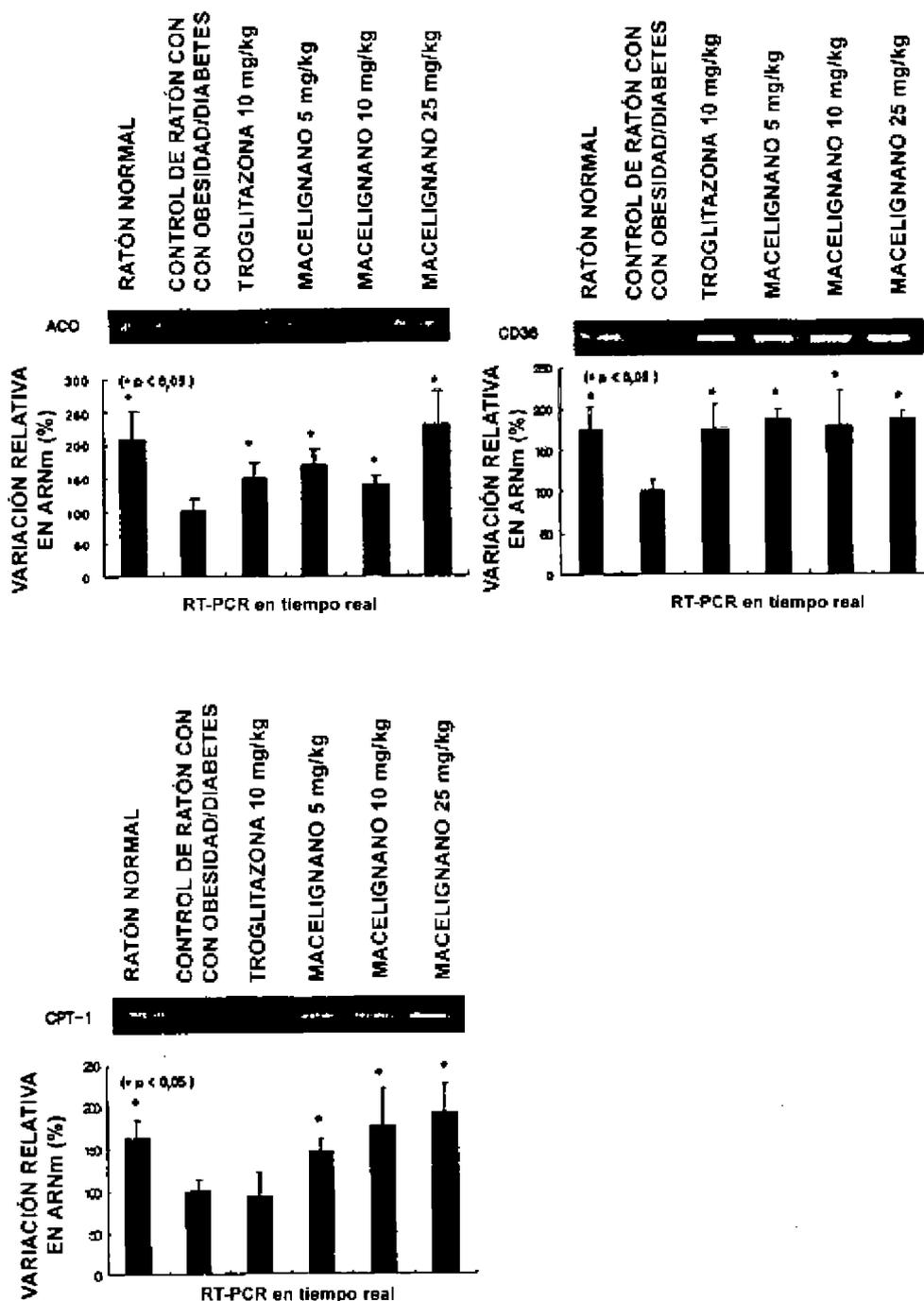
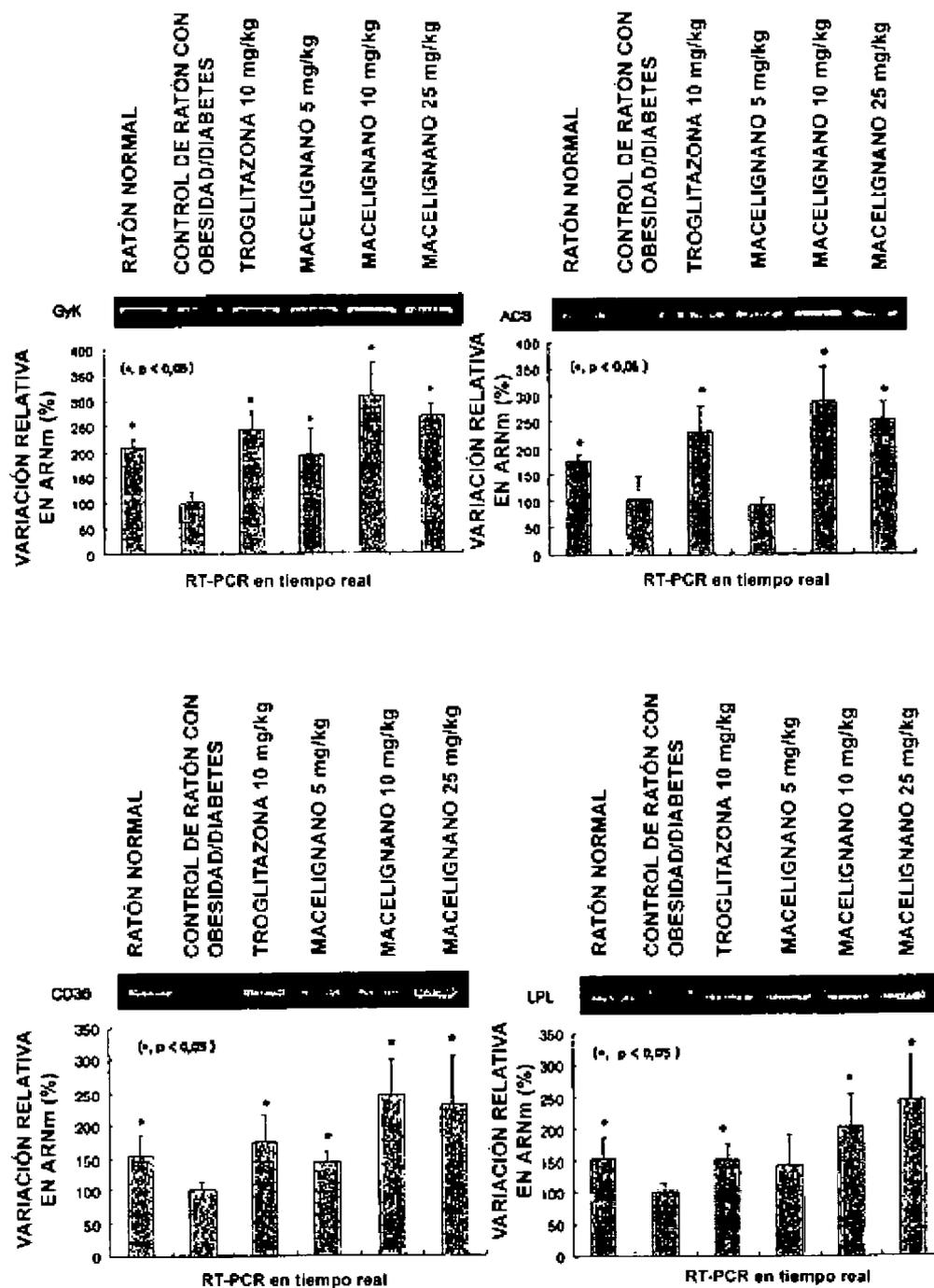


FIG. 27



ES 2 380 556 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> HWANG, JAE-KWAN	
5	<120> Método para prevenir y tratar estados mediados por PPAR usando macelignano	
	<130> op06-1034	
	<160> 20	
	<170> KopatentIn 1.71	
10	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> PPARa directo	
20	<400> 1	
	cttggatccg aacatgacat a	21
25	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> PPARa inverso	
	<400> 2	
35	tgggtacct gtgctgat	19
40	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> PPARr directo	
	<400> 3	
50	tcggttaag attcatcttt att	23
	<210> 4	
	<211> 24	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> PPARr inverso	
	<400> 4	
65	gtctccgta cttgatcac ctgc	24
	<210> 5	

ES 2 380 556 T3

	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> CD36 directo	
	<400> 5	
10	cgcgatgag aaagcagaa	19
	<210> 6	
15	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> CD36 inverso	
	<400> 6	
25	caaccaggcc caggagc	17
	<210> 7	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> CPT-1 directo	
	<400> 7	
40	agacggtgga acagaggctg aag	23
	<210> 8	
	<211> 27	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> CPT-1 inverso	
50	<400> 8	
	tgagacaaa caaagtgatg atgtcag	27
55	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> PDK4 directo	
65		

ES 2 380 556 T3

<400> 9		
	tcaaatcaaa atagccttc c	21
5	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> PDK4 inverso	
15	<400> 10	
	ataagttaag tgggcctgg	19
20	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> ACO directo	
30	<400> 11	
	gggcatggct atttcattg c	21
35	<210> 12	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> ACO inverso	
	<400> 12	
45	cgaacaaggt caacagaagt taggttc	27
	<210> 13	
50	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> LPL directo	
	<400> 13	
60	tatccgcgtg attgcagaga	20
	<210> 14	
	<211> 25	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 380 556 T3

	<220>		
	<223> LPL inverso		
5	<400> 14		
	agagagtcga tgaagagatg aatgg		25
10	<210> 15		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> PEPCK directo		
	<400> 15		
20	caggcggctg aagaagtatg a		21
	<210> 16		
25	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> PEPCK inverso		
	<400> 16		
35	aaccgtcttg ctttcgatcc t		21
	<210> 17		
40	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> ACS directo		
	<400> 17		
50	agcagagctt cgcagcggc		19
	<210> 18		
	<211> 21		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> ACS inverso		
	<400> 18		
65	tctgctgttt tcgctgggtc c		21
	<210> 19		
	<211> 20		

ES 2 380 556 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> GyK directo

<400> 19

10 tcgaaccgga ggattgtct 20

<210> 20
<211> 24
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
20 <223> GyK inverso

<400> 20

25 aattcactt tctccgcat taat 24

30

35

40

45

50

55

60

65