(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 584 189**

(51) Int. Cl.:

A61P 5/50	(2006.01)
C07J 9/00	(2006.01)
A61K 36/896	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)
A61K 31/575	(2006.01)
A61K 36/886	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2006** **E 06810428 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016** **EP 1930341**

(54) Título: **Agente para la mejora de la resistencia a la insulina**

(30) Prioridad:

30.09.2005 JP 2005287886

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2016

(73) Titular/es:

MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD. (100.0%)
33-1, Shiba 5-chome, Minato-ku,
Tokyo 108-8384, JP

(72) Inventor/es:

TANAKA, MIYUKI y
MISAWA, ERIKO

(74) Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 584 189 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

Agente para la mejora de la resistencia a la insulina

Sector técnico

La presente invención se refiere a un agente para la mejora de la resistencia a la insulina, que contiene un compuesto que tiene un esqueleto de lofenol como un ingrediente activo y a un alimento o bebida que lo contienen. En particular, la presente invención se refiere a un agente para la mejora de la resistencia a la insulina, que tiene un efecto de control de la producción de adipocitocinas, que son factores implicados en la aparición y la gravedad de patologías en las que la resistencia a la insulina desempeña un papel, tales como ácidos grasos libres, inhibidor del activador de plasminógeno, factor de necrosis tumoral, proteína 1 quimiotáctica de monocitos y resistina, y se refiere a un alimento o bebida que lo contienen.

Técnica anterior

La insulina es una clase de hormona producida por las células β en los islotes de Langerhans del páncreas. La insulina actúa sobre el metabolismo de los lípidos y el metabolismo de las proteínas, así como en el metabolismo del azúcar, a través de los receptores de insulina que están presentes en los tejidos diana de insulina, tales como los músculos esqueléticos, el hígado y las grasas, y desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de los organismos vivos. Entre los ejemplos de los efectos de la insulina en los respectivos tejidos diana se incluyen la promoción de la incorporación de glucosa desde la sangre en las células musculares y adipocitos, la promoción de la producción de glucógeno en el hígado y los tejidos musculares, la inhibición de la gluconeogénesis en el hígado, la promoción del consumo de glucosa y la síntesis de ácidos grasos en los adipocitos y la inhibición de la descomposición de los lípidos.

La resistencia a la insulina significa un estado en el que las células, órganos o individuos requieren mayores cantidades de insulina que las que suelen ser necesarias con el fin de obtener los respectivos efectos de la insulina, es decir, un estado incompetente al efecto de la insulina en el que se reduce la sensibilidad a la insulina. A partir de resultados de investigaciones epidemiológicas anteriores, la hipertensión, la diabetes, la hiperlipidemia (hipertrigliceridemia e hipo-HDL-colesterolemia), la obesidad y similares son consideradas como patologías provocadas por la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina provoca efectos insuficientes de la insulina en el metabolismo del azúcar, lo que da como resultado la hiperinsulinemia compensatoria para mantener el nivel de azúcar en la sangre, de modo que se producen la hiperglucemia y la intolerancia a la glucosa y se promueve la diabetes por agotamiento de las células β pancreáticas. Además, la hiperinsulinemia aumenta la activación de los nervios simpáticos y acelera la absorción de sodio por el riñón, provocando hipertensión, e induce también la hiperlipidemia postprandial y la hiperuricemia, un aumento del inhibidor 1 del activador de plasminógeno (PAI-1) y similares.

A su vez, la resistencia a la insulina induce un metabolismo anormal de lípidos provocado por los efectos insuficientes de la insulina, y aumentan los ácidos grasos libres (FFA) liberados desde los adipocitos en el hígado para acelerar la síntesis de triglicéridos (TG) en el mismo, lo que da como resultado la hipertrigliceridemia. Además, la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL), que tiene generalmente una sensibilidad elevada a la insulina, se reduce en el estado resistente a la insulina, por lo que se reduce la descomposición de TG y se agrava adicionalmente la hipertrigliceridemia. Además, la progresión de la diabetes provoca la aparición de complicaciones tales como retinopatía, nefropatía y gangrena provocada por angiopatía, de modo que tienen lugar el infarto de miocardio y el infarto cerebral, que son enfermedades arterioescleróticas, y la hipertensión promueve enfermedades cardiovasculares. Tal como se ha descrito anteriormente, se considera que la resistencia a la insulina está involucrada significativamente en el agravamiento de las complicaciones patológicas (documento no de patente 1).

En los últimos años, se ha realizado el análisis de la expresión génica específica de órgano. Como resultado, se ha descubierto que diversas sustancias fisiológicamente activas se secretan desde los tejidos grasos y de este modo se ha asumido que los tejidos grasos no son sólo tejidos de almacenamiento de energía, sino que además son el mayor órgano endocrino en un organismo vivo. Los factores endocrinos derivados de los tejidos grasos tienen el nombre genérico de “adipocitocinas” y juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis en el metabolismo. Se considera que, en un caso de obesidad, es decir, en un estado en el que se acumulan las grasas, se producen y se secretan una cantidad excesiva de adipocitocinas o una cantidad demasiado pequeña de las mismas y se altera el equilibrio de las adipocitocinas, lo que da como resultado la resistencia a la insulina.

Las adipocitocinas se clasifican en dos grupos: uno que aumenta la sensibilidad a la insulina; y uno que provoca resistencia a la insulina. Entre los ejemplos representativos del primer grupo se incluyen la adiponectina, la leptina y la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) y similares. En particular, se ha descrito que la adiponectina tiene un efecto de cancelación de la resistencia a la insulina y un efecto de inhibición de la gluconeogénesis en el hígado (documento no de patente 2).

A su vez, entre los ejemplos de las adipocitocinas que provocan resistencia a la insulina se incluyen, además de los FFA y PAI-1 mencionados anteriormente, factor α de necrosis tumoral (TNF-α), proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), que es una especie de quimiocina inflamatoria, y resistina. En particular, se ha descrito que el TNF-α tiene un efecto de inhibición de la fosforilación de tirosina de un receptor de insulina y el IRS1 (sustrato 1 de receptor de insulina) en el mecanismo de transducción de señal de la insulina, de modo que el efecto de la insulina se atenúa, con lo que se provoca resistencia a la insulina. Además, se describe que, en el estado de resistencia a la insulina, el nivel de MCP-1 en un organismo vivo aumenta y se reduce el de ARNm de GLUT4 (transportador de glucosa 4), que es un vehículo de transporte de glucosa, PPAR (receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas), que es un receptor intranuclear, β3AR ((receptor β3 adrenérgico), que es un tipo de receptor de catecolamina β de un adipocito y aP2 (proteína adipocítica 2 de unión a ácidos grasos), que es una proteína de unión de ácidos grasos. De este modo, se considera que el MCP-1 es un agente causante que reduce la sensibilidad a la insulina (documentos no de patente 3, 4, y 5).

Como agentes para la mejora de la resistencia a la insulina, se han desarrollado agentes de biguanida que inhiben la gluconeogénesis, principalmente en el hígado, y derivados de tiazolidina para potenciar la sensibilidad a la insulina de los músculos y tejidos grasos. Estos agentes ya se han autorizado como medicamentos para la diabetes y también se utilizan para el tratamiento de la enfermedad arterioesclerótica. Se considera que cada uno de los derivados de tiazolidina, tipificados por la troglitazona y la pioglitazona, actúa como un ligando para un receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR), que es un factor de transcripción de tipo receptor intranuclear, para promover la diferenciación de los adipocitos, mejorando de este modo la resistencia a la insulina.

Además, se han dado a conocer un agente para la mejora de la resistencia a la insulina que contiene adiponectina o sus genes como un ingrediente activo (documento de patente 1), un agente preventivo y/o terapéutico para enfermedades debidas a la resistencia a la insulina, que contiene como ingrediente activo una sustancia que tiene afinidad por el subtipo 3 de receptor de bombesina (BRS-3) (documento de patente 2), un agente de reducción de ácidos grasos libres (FFA) que contiene como ingrediente activo un derivado de pirrol (documento de patente 3) y similares, como agentes para la mejora de la resistencia a la insulina. Además, se han dado a conocer una composición para la mejora de la resistencia a la insulina que contiene, como ingrediente activo, ácido acético y un ión o sal del mismo (documento de patente 4), un agente para la mejora de la resistencia a la insulina que contiene un aceite graso que contiene un diglicérido y/o monoglicérido en particular (documento de patente 5) y similares, como agentes que contienen como ingrediente activo una sustancia derivada de alimentos o bebidas.

Es conocido que los esteroles vegetales, tales como β-sitosterol, campesterol, estigmasterol, tienen un efecto reductor sobre el colesterol en sangre mediante la inhibición de la absorción de colesterol, y se ha intentado la utilización práctica de los mismos mediante su adición como una composición grasa en un aceite comestible. Además, se han dado a conocer un agente antiobesidad y un agente de mejora del metabolismo de los lípidos que contienen como ingrediente activo un compuesto de colestenona que se sintetiza utilizando como material de partida esteroles vegetales, tales como β-sitosterol y campesterol (documentos de patente 6 a 8 y documento no de patente 6).

Además, se ha dado a conocer un agente para promover la secreción de adiponectina que contiene: un extracto derivado de, como mínimo, uno de entre salvado de arroz, seta shimeji, crisantemo, centeno, abedul blanco y jazmín español (*Alpinia zerumbet*), y triterpeno de tipo cicloartano o cicloartenol y/o (24S)-24,25-dihidroxicicloartanol, que son derivados de los mismos (documento de patente 9).

Las plantas que pertenecen al género *Aloe* de las *Liliaceae* son un grupo de plantas que incluyen Aloe vera (*Aloe barbadensis Miller*), Aloe arborescens (*Aloe arborescens Miller var. Natalensis Berger*), y similares, y es conocido de la experiencia que tienen varios efectos. Por ejemplo, se han dado a conocer un agente de mejora de la inmunodepresión que contiene una fracción de butanol de un extracto de aloe o aloína (documento de patente 10), agentes relacionados con la mejora del nivel de glucosa en sangre (documentos de patente 11 a 14) y un agente preventivo y de mejora de la obesidad (documento de patente 15) y similares, pero no se ha descrito la acción de mejora en la resistencia a la insulina de las plantas que pertenecen al género *Aloe*.

[Documento de patente 1] Publicación Internacional No. WO 2003/63894
[Documento de patente 2] Patente japonesa abierta a inspección pública No. 10-298100
[Documento de patente 3] Patente japonesa abierta a inspección pública No. 08-12573
[Documento de patente 4] Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2002-193797
[Documento de patente 5] Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2001-247473
[Documento de patente 6] Patente japonesa abierta a inspección pública No. 07-165587
[Documento de patente 7] Patente japonesa abierta a inspección pública No. 11-193296
[Documento de patente 8] Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2001-240544
[Documento de patente 9] Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2005-68132
[Documento de patente 10] Patente japonesa abierta a inspección pública No. 08-208495
[Documento de patente 11] Patente japonesa abierta a inspección pública No. 59-214741
[Documento de patente 12] Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2003-286185
[Documento de patente 13] Patente de EE.UU. No. 4.598.069

[Documento de patente 14] Publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2003/0207818
[Documento de patente 15] Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2000-319190
[Documento no de patente 1] Insulin resistance and lifestyle-related diseases, Ed. Kazuaki Shimamoto, Shindan to Chiryo Company, 2003, págs. 1-5
[Documento no de patente 2] Adiposcience, 1 (3), 2004, págs. 247-257
[Documento no de patente 3] Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 100, 2003, págs. 7.265-7.270
[Documento no de patente 4] Nature, vol. 389, 1997, págs. 610-614
[Documento no de patente 5] The Netherlands Journal of Medicine, 6 (6), 2003, págs. 194-212
[Documento no de patente 6] Hormone Metabolism Research, vol. 37, 2005, págs. 79-83

Okyar A. y otros: “Effect of Aloe vera leaves on blood glucose level in type I and type II diabetes rat models”, PHYTOTHER. RES., da a conocer la utilización de extractos de aloe para tratar la diabetes, una enfermedad en la que la resistencia a la insulina es un factor importante de la patogénesis.

Características de la invención

Con la utilización del agente de biguanida, que es un agente convencional para la mejora de la resistencia a la insulina, se puede producir disfunción gastrointestinal u, ocasionalmente, acidosis láctica. Además, un derivado de tiazolidina, que es el mismo tipo de agente, puede provocar en algunos casos efectos secundarios graves, tales como retención de líquidos, aumento del peso corporal y disfunción hepática, por lo que la utilización del mismo requiere una atención adicional. Además, para la resistencia a la insulina en estados distintos a los de la diabetes o la hiperglucemia, ha resultado difícil en la práctica utilizar agentes antidiabéticos. En estas circunstancias, se ha deseado el desarrollo de un material funcional que sea excelente en seguridad, se pueda ingerir de forma diaria y pueda mejorar de manera eficiente la resistencia a la insulina con el mínimo dolor posible.

En vista de los problemas mencionados anteriormente, los inventores de la presente invención han investigado los mecanismos de la resistencia a la insulina implicados en las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, tales como hipertensión, diabetes, hiperlipidemia incluidas la hipertrigliceridemia y la hipocolesterolemia de lipoproteína de alta densidad, y obesidad, y han investigado un agente destinado a la prevención, la mejora y similares de las enfermedades, es decir, un agente para la mejora de la resistencia a la insulina. Los inventores de la presente invención han centrado la atención en las adipocitocinas, que son factores que intervienen en el inicio y la exacerbación de la resistencia a la insulina, y han realizado una extensa investigación sobre un nuevo material funcional capaz de mejorar la resistencia a la insulina mediante el control de los factores mencionados anteriormente. Como resultado, los inventores de la presente invención han descubierto que un compuesto que tiene un esqueleto de lofenol tiene un efecto de control sobre la producción de adipocitocinas, tales como ácidos grasos libres, TNF-α y MCP-1, en particular, un efecto de reducción eficaz de la producción de una adipocitocina que provoca la resistencia a la insulina y se mejora la resistencia a la insulina por esta acción.

En comparación con los efectos de la presente invención mencionados anteriormente, el documento de patente 9 sólo da a conocer un efecto preventivo del extracto vegetal en la diferenciación de los adipocitos de cultivo, y un efecto de promoción del ergosterol en la secreción de adiponectina, y no contiene ninguna descripción ni sugerencia del efecto de mejora del ingrediente activo de la presente invención sobre la resistencia a la insulina.

Además, los inventores de la presente invención han descubierto que, mediante la investigación de la utilización de una prueba de tolerancia a la insulina, además del método de clamp de glucosa, el método de glucosa en plasma en estado estacionario (SSPG) y el método de modelo mínimo, que son los métodos convencionales de evaluación de la resistencia a la insulina, el compuesto que tiene un esqueleto de lofenol mejora más directamente la resistencia a la insulina sin la intervención en la propiedad de secreción de insulina o similares.

La prueba de tolerancia a la insulina no se ha realizado en los documentos de patente 1 a 5 mencionados anteriormente. Los inventores de la presente invención descubrieron un efecto más ventajoso del compuesto que tiene un esqueleto de lofenol, que mejora la resistencia a la insulina sin estar afectado por las propiedades de secreción de insulina, o similares, lo que resulta extremadamente ventajoso en comparación con los efectos de mejora convencionales sobre la resistencia a la insulina, y de este modo se ha completado la presente invención.

Un objeto de la presente invención es dar a conocer un agente para la mejora de la resistencia a la insulina, que contiene un compuesto que tiene el esqueleto de lofenol como un ingrediente activo. Además, otro objeto de la presente invención es dar a conocer un alimento o bebida fisiológicamente funcionales, tal como alimentos para aplicaciones de salud específicas que contienen el agente para la mejora de la resistencia a la insulina.

La primera invención de la presente solicitud para resolver los problemas mencionados anteriormente es un agente para su utilización en el tratamiento de una enfermedad, mediante la mejora de la resistencia a la insulina, en el que dicha enfermedad se selecciona entre tolerancia anormal a la glucosa e hiperinsulinemia, en el que dicho agente contiene un compuesto seleccionado del grupo que comprende 4-metilcolest-7-en-3-ol, 4-metilergost-7-en-3-ol y 4-metilestigmast-7-en-3-ol.

El agente para su utilización puede contener, como mínimo, el 0,001% en masa del compuesto.

La segunda invención de la presente solicitud para resolver los problemas mencionados anteriormente es un alimento o bebida para su utilización en el tratamiento de una enfermedad, mediante la mejora de la resistencia a la insulina, en el que dicha enfermedad se selecciona entre tolerancia anormal a la glucosa e hiperinsulinemia, en el que dicho alimento o bebida contienen un compuesto seleccionado del grupo que comprende 4-metilcolest-7-en-3-ol, 4-metilergost-7-en-3-ol y 4-metilestigmast-7-en-3-ol.

Además, la siguiente es una realización preferente.

El alimento o la bebida contienen el compuesto en una cantidad del 0,0001% en masa o más.

La tercera invención de la presente solicitud para resolver los problemas mencionados anteriormente es la utilización de un compuesto seleccionado del grupo que comprende 4-metilcolest-7-en-3-ol, 4-metilergost-7-en-3-ol y 4-metilestigmast-7-en-3-ol en la producción de un agente para el tratamiento de una enfermedad, mediante la mejora de la resistencia a la insulina, en el que dicha enfermedad se selecciona entre tolerancia anormal a la glucosa e hiperinsulinemia, en el que dicho agente contiene, como mínimo, el 0,001% en masa seca del compuesto.

El agente y el alimento o la bebida para su utilización según la presente invención se pueden administrar o ingerir con seguridad, y tienen efectos preventivos sobre las enfermedades relacionadas con el estilo de vida que se consideran provocadas por la resistencia a la insulina. Además, el ingrediente activo del agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención, por la experiencia, se puede ingerir con seguridad y se puede producir fácilmente a partir de plantas *Liliaceae* disponibles, tales como Aloe vera (*Aloe barbadensis Miller*).

El alcance de la presente invención está limitado por las reivindicaciones adjuntas.

Descripción breve de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que muestra el cambio en el nivel de glucosa en sangre en una prueba de tolerancia a la insulina.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación, se explicarán en detalle las realizaciones preferentes de la presente invención. El porcentaje, tal como se utiliza en el presente documento, indica porcentaje en masa, a menos que se especifique lo contrario.

En la presente invención, el efecto de mejora de la resistencia a la insulina (el efecto de aumentar la sensibilidad a la insulina) significa un efecto de prevenir o mejorar diversos efectos adversos sobre la salud inducidos por una disminución en la sensibilidad a la insulina, tales como las enfermedades relacionadas con el estilo de vida. Específicamente, el agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención, inhibe eficazmente un aumento o la producción de adipocitocinas que provocan resistencia a la insulina, tales como el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), ácidos grasos libres (FFA), factor de necrosis tumoral (TNF-α), MCP-1 y resistina, y tiene un efecto en la reducción de los riesgos, la prevención, la mejora o el tratamiento de las enfermedades que intervienen en la resistencia a la insulina, tales como hiperinsulinemia, hiperlipidemia, tolerancia anormal a la glucosa, diabetes, hipertensión, obesidad, enfermedad arteriosclerótica y similares. De este modo, el agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención se puede definir como un agente para aumentar la sensibilidad a la insulina o un agente para el control de la producción de adipocitocinas, en particular, un agente para inhibir la producción de adipocitocinas que provocan la resistencia a la insulina.

Existen métodos de evaluación de la resistencia a la insulina tales como el método de clamp de glucosa, el método de glucosa en plasma en estado estacionario (SSPG), el método de modelo mínimo, el método de evaluación de la resistencia a la insulina mediante el cálculo de la resistencia a la insulina por evaluación del modelo de homeostasis (HOMA-IR) a partir del nivel en ayunas de glucosa en sangre y la concentración de insulina en sangre, y la prueba de tolerancia a la insulina. Cualquiera de los métodos mencionados anteriormente puede ser utilizado para la evaluación de la resistencia a la insulina. Sin embargo, en la presente invención, es preferente utilizar la prueba de tolerancia a la insulina utilizando animales, debido a que la prueba no se ve afectada por las propiedades de secreción de insulina o similares, y de este modo se puede investigar directamente la sensibilidad a la insulina.

El compuesto seleccionado del grupo que comprende 4-metilcolest-7-en-3-ol, 4-metilergost-7-en-3-ol y 4-metilestigmast-7-en-3-ol tiene un efecto de aumentar la sensibilidad a la insulina y puede prevenir o mejorar de este modo las enfermedades provocadas por la resistencia a la insulina. Por lo tanto, el compuesto se puede utilizar como un ingrediente activo del agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina o el alimento o la bebida que lo contienen. Además, la sensibilidad a la insulina se puede evaluar también midiendo una disminución en el nivel de glucosa en sangre después de la administración de insulina.

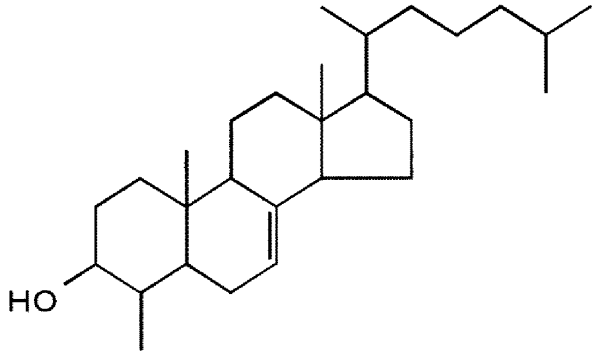
El compuesto utilizado como el ingrediente activo del agente para la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención (en adelante, referido también como “el agente de la presente invención”) es el compuesto seleccionado del grupo que comprende 4-metilcolest-7-en-3-ol, 4-metilergost-7-en-3-ol y 4-metilestigmast-7-en-3-ol (en adelante, referidos también como “el compuesto de la presente invención”).

Lo más preferente es que la pureza del compuesto de la presente invención, que se utiliza como el ingrediente activo del agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención, sea del 100%. Sin embargo, la pureza se puede ajustar de forma apropiada dentro de un intervalo en el que el agente tenga el efecto de mejorar la resistencia a la insulina.

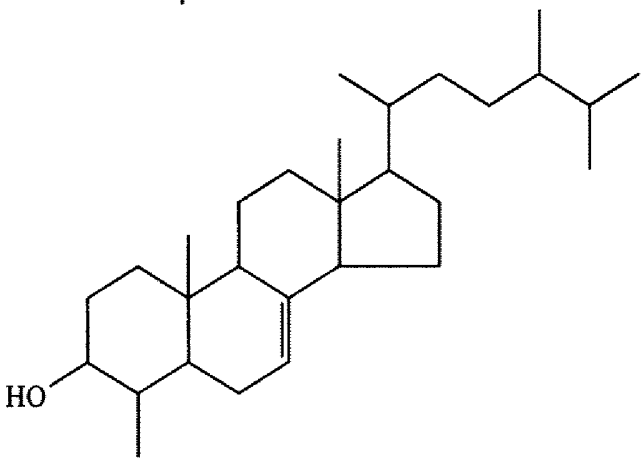
Además, el agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención puede contener el compuesto de la presente invención en una cantidad de, como mínimo, el 0,001% en masa seca, preferentemente el 0,01% en masa seca o más, y más preferentemente el 0,1% en masa seca o más. El límite superior del contenido del compuesto de la presente invención es, sin que constituya limitación particular, preferentemente el 10% en masa seca, el 50% en masa seca, el 70% en masa seca, o el 90% en masa seca, por ejemplo.

En la presente invención, masa seca significa una masa medida después de que un compuesto se seque mediante el método de secado definido por “Prueba de pérdida por secado” que es un método de prueba general tal como se describe en la Farmacopea Japonesa, decimocuarta revisión, (30 de marzo de 2001, Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar Social de Japón, Notificación Ministerial No. 111). Por ejemplo, la masa del compuesto de la presente invención se puede determinar de una manera tal que: se pesa aproximadamente 1 g del compuesto de la presente invención y se seca a 105°C durante 4 horas; el producto resultante se enfría depositándolo en un desecador y se determina la masa del compuesto con una balanza.

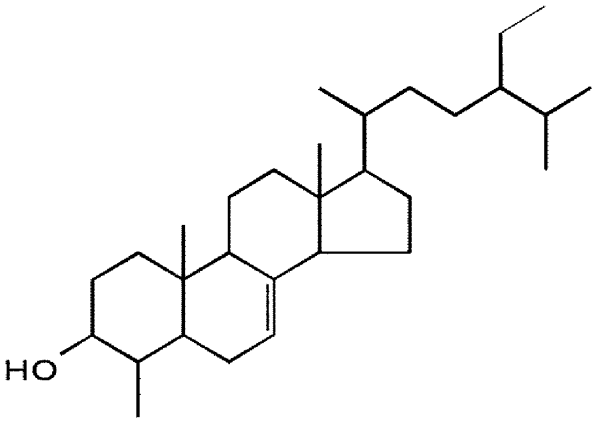
Los compuestos de la presente invención son los representados por las siguientes fórmulas, 4-metilcolest-7-en-3-ol (fórmula (2)), 4-metilergost-7-en-3-ol (fórmula (3)) y 4-metilestigmast-7-en-3-ol (fórmula (4)).



··· (2)

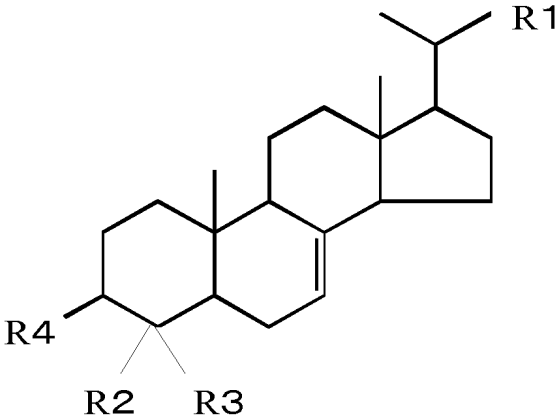


··· (3)



... (4)

Es decir, el 4-metilcolest-7-en-3-ol es un compuesto representado por la fórmula general (1):



(1)

en la que uno de entre R2 y R3 es un átomo de hidrógeno, el otro es un grupo metilo, R4 es un grupo hidroxilo y R1 es un grupo representado por $-CH_2-CH_2-CH(Rc)-CH(CH_3)Rd$ (Rc representa -H y Rd representa $-CH_3$). El 4-metilergost-7-en-3-ol es un compuesto representado por la fórmula general (1) mencionada anteriormente, en la que uno de entre R2 y R3 es un átomo de hidrógeno, el otro es un grupo metilo, R4 es un grupo hidroxilo y R1 es un grupo representado por $-CH_2-CH_2-CH(Rc)-CH(CH_3)Rd$ (Rc y Rd representan ambos $-CH_3$). Además, 4-metilestigmast-7-en-3-ol es un compuesto representado por la fórmula general (1) mencionada anteriormente en la que uno de entre R2 y R3 es un átomo de hidrógeno, el otro es un grupo metilo, R4 es un grupo hidroxilo y R1 es $-CH_2-CH_2-CH(-CH_2-CH_3)-CH(CH_3)_2$.

El agente, el alimento o la bebida para su utilización según la presente invención pueden contener un tipo o dos o más tipos cualesquiera de los compuestos mencionados anteriormente.

Es conocido que el lofenol está contenido en las plantas, y el compuesto de la presente invención puede producirse de acuerdo con el método conocido para la producción de lofenol (Yamada A., “Experimental Methods of Biochemistry”, Vol. 24, Experimental Methods for Fat and Lipid Metabolism, pág. 174, Gakkai Shuppan Center, 1989). El compuesto de la presente invención se puede obtener, por ejemplo, extrayendo el compuesto a partir de una planta que lo contiene utilizando un método tal como extracción con un disolvente orgánico o extracción con agua caliente y purificando el extracto obtenido. En la presente invención, aunque el compuesto de la presente invención se puede purificar, una composición tal como un extracto de plantas o una fracción del mismo se puede utilizar también con tal de que contengan una cantidad eficaz del compuesto.

El compuesto de la presente invención o una composición que lo contiene se pueden producir de una manera tal que, por ejemplo: a partir de una planta perteneciente a la familia *Liliaceae*, una parte o un producto triturado de la misma que contiene el compuesto de la presente invención, se extrae una fracción que contiene el compuesto con un disolvente orgánico o agua caliente y se concentra.

Entre los ejemplos de dicha planta perteneciente a la familia de *Liliaceae* se incluyen plantas pertenecientes al género *Aloe* o *Allium*. Entre los ejemplos de las plantas del género *Aloe* se incluyen Aloe vera (*Aloe barbadensis Miller*), *Aloe ferox Miller*, *Aloe africana Miller*, *Aloe arborescen Miller var. natalensis berger*, *Aloe spicata Baker,* etc. En la producción del compuesto de la presente invención o una composición que lo contiene, aunque se puede utilizar la totalidad de las plantas mencionadas anteriormente, es preferente la utilización del mesófilo (porción de gel

claro) de las mismas. Dicha planta o una parte de la misma se disgrega preferentemente mediante la utilización de un homogeneizador o similar para de este modo licuarlas, y el compuesto de la presente invención o una composición que lo contiene se extrae a partir del producto disgregado mediante la utilización de un disolvente orgánico o agua caliente. Entre los ejemplos del disolvente orgánico se incluyen alcoholes tales como metanol, etanol y butanol; ésteres tales como acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo y acetato de butilo; cetonas tales como acetona y metil isobutil cetona; éteres tales como éter dietílico y éter de petróleo; hidrocarburos tales como hexano, ciclohexano, tolueno y benceno; hidrocarburos halogenados tales como tetracloruro de carbono, diclorometano y cloroformo; compuestos heterocíclicos tales como piridina; glicoles tales como etilenglicol; alcoholes polihidroxilados tales como polietilenglicol; disolventes de tipo nitrilo tales como acetonitrilo, mezclas de estos disolventes, etc. Además, estos disolventes pueden ser anhidros o hidratados. Entre estos disolventes, son particularmente preferentes una mezcla de acetato de etilo/butanol (3:1) y una mezcla de cloroformo/metanol (2:1).

Como método de extracción, se puede utilizar un método utilizado para la extracción habitual de un componente vegetal. Se utiliza normalmente, por ejemplo, un método de calentamiento a reflujo de 1 a 300 partes en masa de un disolvente orgánico con 1 parte en masa de la planta fresca o la planta seca, con calentamiento a una temperatura por debajo del punto de ebullición del disolvente y agitando o removiendo, o un método de extracción por ultrasonidos a temperatura ambiente. Aislando la materia insoluble a partir del licor de extracción, utilizando un método adecuado, tal como filtración o centrifugación, se puede obtener un extracto crudo.

El extracto crudo se puede purificar por diversos tipos de cromatografía, tales como cromatografía en columna de gel de sílice de fase normal o inversa. Cuando se utiliza como disolvente de elución un gradiente de mezcla de cloroformo/metanol en cromatografía en columna de gel de sílice de fase normal, el compuesto de la presente invención se eluye con una relación de mezcla de cloroformo:metanol = aproximadamente 25:1. Además, cuando se utiliza como disolvente de elución una mezcla de hexano/acetato de etilo (4:1) en cromatografía en columna de gel de sílice de fase inversa, el compuesto de la presente invención se eluye en una fracción eluída en una etapa temprana. La fracción obtenida se puede purificar adicionalmente mediante HPLC o similar.

Además, el compuesto utilizado para la presente invención se puede producir también mediante un método de síntesis química o un método biológico o enzimático utilizando microorganismos, enzimas o similares.

Se puede confirmar si un compuesto o una composición que lo contiene, obtenido tal como se describe anteriormente, contiene realmente el compuesto de la presente invención mediante, por ejemplo, espectrometría de masas (EM), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) o similares.

El compuesto de la presente invención se puede utilizar como un ingrediente activo del agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención y un alimento o bebida que lo contienen como tal. Además, un extracto de disolvente orgánico o un extracto de agua caliente de una planta, o una fracción de los mismos (en adelante, referido como “extracto etc.”) que contienen el compuesto de la presente invención, se pueden utilizar como el ingrediente activo del agente para la mejora de la resistencia a la insulina o el alimento o la bebida que lo contienen de la presente invención. Además, cuando se utiliza Aloe vera que pertenece a las *Liliaceae* como la planta, es preferente que el contenido total de aloína y aloe-emodina, que están contenidos en una gran cantidad en la piel de las hojas de Aloe vera, sea de 5 ppm o menos.

El extracto etc. mencionado anteriormente que va a estar contenido en el agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina contiene preferentemente, como mínimo, el 0,001% en masa seca, más preferentemente del 0,01 al 1% en masa seca, de forma particularmente preferente, del 0,05 al 1% en masa seca, del compuesto de la presente invención. Además, el extracto etc. mencionado anteriormente que va a estar contenido en el alimento o la bebida contiene preferentemente, como mínimo, el 0,0001% en masa seca, más preferentemente del 0,001 al 1% en masa seca, de forma particularmente preferente del 0,005 al 1% en masa seca, del compuesto de la presente invención. El extracto etc. mencionado anteriormente puede contener dos o más tipos del compuesto de la presente invención. Además, el extracto etc. mencionado anteriormente puede ser una solución, o también se puede liofilizar o secar mediante pulverización de una manera convencional y almacenarse o utilizarse como polvo.

Como agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención, el compuesto de la presente invención o una composición que lo contiene como tal, o el compuesto de la presente invención o una composición que lo contiene en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, se puede administrar por vía oral o parenteral a un mamífero, incluyendo un ser humano. En el agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención, el compuesto de la presente invención puede ser una sal farmacéuticamente aceptable. Entre los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable se incluyen tanto sales metálicas (sales inorgánicas) como sales orgánicas, que incluyen, por ejemplo, las que se enumeran en “Remingtons Pharmaceutical Sciences”, 17ª edición, pág. 1418, 1985. Entre los ejemplos específicos de las mismas se incluyen, sin que constituyan limitación, sales de ácidos inorgánicos tales como hidrocloruro, sulfato, fosfato, difosfato e hidrobromato, y sales de ácidos orgánicos, tales como malato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, citrato, acetato, lactato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, pamoato, salicilato y estearato. Además, la sal puede ser una sal con un metal tal como sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, o una sal con un aminoácido tal como

lisina. Además, están también dentro del alcance de la presente invención solvatos tales como hidratos del compuesto mencionado anteriormente o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

La forma de dosificación del agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención no está particularmente limitada y se puede seleccionar adecuadamente dependiendo del propósito terapéutico. Entre sus ejemplos específicos se incluyen comprimido, píldora, polvo, solución, suspensión, emulsión, gránulos, cápsula, jarabe, supositorio, inyección, pomada, parche, gotas oculares, gotas nasales, etc. Para la preparación, se pueden utilizar aditivos utilizados de forma general en agentes preventivos habituales para la mejora de la resistencia a la insulina como vehículos farmacéuticos, tales como excipientes, aglutinantes, agentes desintegrantes, lubricantes, estabilizantes, agentes aromatizantes, diluyentes, agentes surfactantes y disolventes para inyección, etc. Además, siempre que el efecto de la presente invención no se degrade, el compuesto de la presente invención o el extracto etc. que lo contiene se puede utilizar en combinación con otros agentes que tienen la acción de mejorar la resistencia a la insulina.

Aunque la cantidad del compuesto de la presente invención o el extracto etc. que lo contiene contenida en el agente para su utilización en la mejora de resistencia a la insulina de la presente invención no está particularmente limitada y se puede seleccionar de manera adecuada, la cantidad puede ser, por ejemplo, como mínimo, el 0,001% en masa, preferentemente del 0,01 al 1% en masa, de forma particularmente preferente del 0,05 al 1% en masa, en términos de la cantidad del compuesto de la presente invención.

El agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención puede prevenir, mejorar o tratar diversas enfermedades, complicaciones y similares provocadas por la resistencia a la insulina y reducir los riesgos de estas enfermedades, complicaciones y similares. Además, el agente para la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención se puede utilizar preferentemente en un paciente cuya resistencia a la insulina se ha agravado más que la de una persona sana. Además, la resistencia a la insulina en general significa un estado en el que el nivel de insulina en plasma en ayunas es de 10 a 15 μU/ml o más, y el índice HOMA es de 1,73 o más.

Entre los ejemplos de las diversas enfermedades provocadas por la resistencia a la insulina se incluyen hipertensión, hiperlipidemia, diabetes y enfermedad arteriosclerótica. Entre los ejemplos de las complicaciones provocadas por las enfermedades se incluyen (a) derrame cerebral, nefroesclerosis e insuficiencia renal provocada por hipertensión, (b) arteriosclerosis y pancreatitis provocada por hiperlipidemia, (c) retinopatía diabética, nefropatía, neuropatía y gangrena diabética provocada por la diabetes y (d) derrame o infarto cerebral, enfermedades cardiovasculares tales como angina de pecho e infarto de miocardio y nefropatías tales como uremia, nefroesclerosis e insuficiencia renal debido a la enfermedad arteriosclerótica. Además, los inventores de la presente invención han descubierto que el compuesto de la presente invención tiene el efecto de reducir el nivel de hemoglobina A1c y mejorar la hiperglucemia (documento WO 2005/094838). Es preferente que las enfermedades a las que el agente para la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención se aplica sean aquellas no acompañadas de niveles de hemoglobina A1c mayores que los de una persona sana.

Además, se espera que el agente de la presente invención, que tiene un efecto de mejora de la resistencia a la insulina, tenga un efecto de inhibición de la producción y el aumento de las adipocitocinas que provocan la resistencia a la insulina, tales como TNF-α, MCP-1 y FFA. Por lo tanto, el agente de la presente invención tiene el efecto de prevenir y/o aliviar las enfermedades provocadas por el aumento de las adipocitocinas mencionadas anteriormente, entre las que se incluyen enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias en diversos órganos tales como nefritis, pancreatitis, hepatitis y neumonitis, angiopatía, sepsis, caquexia por cáncer. De este modo, el agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención se puede utilizar preferentemente en un paciente en el que está aumentada la producción de las adipocitocinas, en particular, un paciente en el que está aumentada la producción de las adipocitocinas que provocan la resistencia a la insulina.

El tiempo de administración del agente de la presente invención no está particularmente limitado y puede seleccionarse adecuadamente de acuerdo con el método para tratar una enfermedad objetivo. Además, la vía de administración se determina preferentemente en función de la forma de dosificación, la edad, el sexo y otras condiciones de los pacientes, la gravedad de los síntomas de los pacientes, etc. La dosis del ingrediente activo en el agente de la presente invención se selecciona adecuadamente dependiendo del régimen terapéutico, la edad y sexo de los pacientes, la gravedad de la enfermedad, otras condiciones de los pacientes, etc. Por lo general, la cantidad del compuesto de la presente invención como ingrediente activo se selecciona del intervalo de, preferentemente, 0,001 a 50 mg/kg/día, más preferentemente de 0,01 a 1 mg/kg/día, como una dosis provisional. Además, cuando se utiliza el extracto etc. que contiene el compuesto de la presente invención, el peso seco del extracto etc. se selecciona del intervalo de, preferentemente 0,1 a 1.000 mg/kg/día, más preferentemente de 1 a 100 mg/kg/día, como una cantidad provisional. En cualquier caso, la dosis se puede administrar una vez al día o varias veces como partes divididas.

El compuesto de la presente invención o la composición que lo contiene se pueden añadir a un alimento o bebida (una bebida o un alimento) para producir un alimento o una bebida que tienen un efecto de mejora de la resistencia

a la insulina. La forma y las propiedades del alimento o la bebida no están particularmente limitadas, siempre que el efecto del ingrediente activo no se degrade y el alimento o la bebida se puedan ingerir por vía oral, y se pueden producir de manera convencional mediante la utilización de materias primas utilizadas habitualmente para alimentos o bebidas, excepto porque se añade el ingrediente activo mencionado anteriormente. La cantidad del compuesto de la presente invención o el extracto etc. que lo contiene, contenida en el alimento o la bebida de la presente invención, no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada. Por ejemplo, el compuesto de la presente invención o el extracto etc. que lo contiene está contenido en el alimento o la bebida en una cantidad, como mínimo, del 0,0001% en masa, preferentemente del 0,001 al 1% en masa, de forma particularmente preferente del 0,005 al 1% en masa, en términos de la cantidad del compuesto de la presente invención.

El alimento o la bebida de la presente invención se pueden aplicar a diversas utilizaciones que aprovechan el efecto de mejora de la resistencia a la insulina. Por ejemplo, el alimento o la bebida de la presente invención se pueden utilizar para la reducción y la eliminación de factores de riesgo de las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, que se consideran debidas a la resistencia a la insulina. Además, el alimento o la bebida de la presente invención pueden prevenir enfermedades provocadas por la resistencia a la insulina, tales como hipertensión, hiperlipidemia y diabetes, y pueden reducir los riesgos de estas enfermedades. Además, el alimento o la bebida de la presente invención pueden prevenir diversas complicaciones provocadas por la resistencia a la insulina, tales como derrame cerebral, nefroesclerosis, insuficiencia renal provocada por hipertensión, arteriosclerosis, pancreatitis y similares debido a hiperlipidemia, retinopatía diabética, nefropatía, neuropatía, gangrena diabética provocada por diabetes, derrame o infarto cerebral, enfermedades cardiovasculares tales como angina de pecho e infarto de miocardio, nefropatías, tales como uremia, nefroesclerosis e insuficiencia renal debido a enfermedad aterosclerótica, y pueden reducir el riesgo de estas enfermedades.

Además, se espera que el alimento o la bebida de la presente invención tengan un efecto de inhibición de la producción y el aumento de las adipocitocinas que provocan resistencia a la insulina, tales como TNF-α, MCP-1 y FFA. Por lo tanto, el agente de la presente invención tiene un efecto de prevención de las enfermedades provocadas por el aumento de las adipocitocinas mencionadas anteriormente y de disminución de los riesgos de estas enfermedades, entre las que se incluyen enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias en diversos órganos tales como nefritis, pancreatitis, hepatitis, neumonitis y angiopatía, sepsis, caquexia por cáncer. De este modo, el alimento o la bebida de la presente invención pueden ser ingeridos preferentemente por un paciente en el que está aumentada la producción de las adipocitocinas mencionadas anteriormente, en particular, un paciente en el que está aumentada la producción de las adipocitocinas que provocan la resistencia a la insulina.

Preferentemente, el alimento o la bebida de la presente invención se comercializan en forma de un alimento o bebida junto con una indicación de que el alimento o la bebida se utilizan para la mejora de la resistencia a la insulina, por ejemplo, “alimento o bebida que contienen un compuesto que tiene un efecto de mejora de la resistencia a la insulina indicado como ‘Para la mejora de la resistencia a la insulina’”, “alimento o bebida que contiene un extracto vegetal indicado como ‘Para la mejora de la resistencia a la insulina’” o “alimento o bebida que contiene un extracto de Aloe vera indicado como ‘Para la mejora de la resistencia a la insulina’” y similares. Además, debido a que el compuesto de la presente invención y la composición y similares que lo contienen tienen un efecto de mejora de la resistencia a la insulina, la indicación de “mejora de la resistencia a la insulina” se considera de este modo que tiene un significado de que se aumenta la sensibilidad a la insulina. Por lo tanto, el alimento o la bebida de la presente invención se pueden indicar como “para aumentar la sensibilidad a la insulina”. En otras palabras, la indicación de “Para la mejora de la resistencia a la insulina” se puede sustituir por la indicación de “Para aumentar la sensibilidad a la insulina”.

La expresión utilizada para una indicación, tal como se ha mencionado anteriormente, no se limita a la expresión “Para la mejora de la resistencia a la insulina” o “Para aumentar la sensibilidad a la insulina”. Se incluyen también otras expresiones dentro del alcance de la presente invención, siempre que la expresión notifique el efecto de aumento de la sensibilidad a la insulina, o la prevención o la mejora de la resistencia a la insulina. Para las expresiones, son adecuadas las indicaciones basadas en diversas utilizaciones, que notifican a los consumidores que el alimento o la bebida tiene un efecto de mejora de la resistencia a la insulina o aumento de la sensibilidad a la insulina. Entre los ejemplos de la indicación se incluyen “Adecuado para aquellos que tienden a ser resistentes a la insulina” y “Útil para reducir o eliminar los factores de riesgo o riesgos de las enfermedades relacionadas con el estilo de vida”.

El término “indicación” mencionado anteriormente incluye todas las acciones para informar a los consumidores de la utilización mencionada anteriormente, y cualquier indicación que recuerde o haga una analogía de la utilización mencionada anteriormente queda dentro del alcance de la “indicación” de la presente invención, independientemente del propósito, el contenido, el artículo objetivo, medio, etc. de la indicación. Sin embargo, la indicación se hace preferentemente con una expresión que permita a los consumidores reconocer directamente la utilización mencionada anteriormente. Entre los ejemplos específicos se incluyen acciones de indicar la utilización mencionada anteriormente sobre los artículos o los envases de los artículos relacionados con el alimento o la bebida de la presente invención, acciones de asignar, entregar, exponer con el propósito de asignación o entrega o importación de dichos artículos o envases de artículos indicados con la utilización mencionada anteriormente,

exponer o distribuir anuncios, listas de precios o folletos comerciales relacionados con los productos que indican la utilización mencionada anteriormente, o proporcionar información que incluye aquella tal como contenidos que indican la utilización mencionada anteriormente por un método electromagnético (Internet, etc.), etc. Por otro lado, la indicación es, preferentemente, una indicación aprobada por la administración, etc. (por ejemplo, una indicación en una forma basada en una aprobación, que se califica sobre la base de cualquiera de los diversos sistemas legales previstos por la administración) y es, de forma particularmente preferente, una indicación en materiales de publicidad en los puntos de venta, tales como envases, recipientes, catálogos, folletos, materiales POP y otros documentos.

Entre los ejemplos de la indicación se incluyen además indicaciones de alimentos saludables, alimentos funcionales, alimentos nutritivos entéricos, alimentos para regímenes especiales, alimentos con reivindicación de función nutriente, cuasifármacos, etc., así como las indicaciones aprobadas por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar, por ejemplo, las indicaciones aprobadas sobre la base del sistema de alimentos para utilizaciones de salud específicas y sistemas similares. Entre los ejemplos de estos últimos se incluyen indicaciones tales como alimentos para utilizaciones de salud específicas, indicaciones como alimento para utilizaciones de salud específicas con reivindicaciones de salud cualificadas, indicaciones de influencia sobre las estructuras y funciones del organismo, indicaciones de reivindicación sobre la reducción del riesgo de enfermedades, etc., y de forma más precisa, entre los ejemplos habituales se incluyen indicaciones como alimentos para utilizaciones de salud específicas (especialmente las indicaciones de utilización para la salud) previstas en el reglamento de aplicación de la Ley de Promoción de la Salud (Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón, orden ministerial Nº 86, 30 de abril, 2003) e indicaciones similares.

La presente invención se explicará más específicamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, el alcance de la presente invención no queda limitado a los siguientes ejemplos.

En primer lugar, se explica mediante el ejemplo de preparación que el compuesto de la presente invención se puede producir a partir de una planta que pertenece a las *Liliaceae*.

[Ejemplo de preparación 1]

Se licuó una cantidad de 100 kg de mesófilo (parte de gel claro) de Aloe vera mediante la utilización de un homogeneizador, se añadieron 100 l de una mezcla de acetato de etilo/butanol (3:1) y se agitaron.

La mezcla se dejó reposar durante toda la noche, y posteriormente se separaron la mezcla de acetato de etilo/butanol y la fase acuosa para recuperar la mezcla de acetato de etilo/butanol. El extracto de esta mezcla de acetato de etilo/butanol obtenido por concentración de la mezcla de acetato de etilo/butanol a presión reducida pesó 13,5 g. Se cargó una solución de 13 g de este extracto disuelto en 1 ml de una mezcla de cloroformo/metanol (1:1) en una columna rellena con 400 g de gel de sílice 60 (Merck Ltd.) para conseguir la adsorción de los componentes en la columna, a continuación, los componentes se eluyeron con una mezcla de cloroformo/metanol por el método de gradiente por etapas, en el que la concentración de metanol se aumentó etapa a etapa (proporciones de mezcla de cloroformo:metanol = 100:1, 25:1, 10:1, 5:1 y 1:1), y el eluato se fraccionó para cada proporción de mezcla de la mezcla mencionada anteriormente. Se confirmó por cromatografía de capa fina de fase normal y de fase inversa (Merck Ltd., Silica Gel 60F254 y RP-18F2543) que, entre estas fracciones, el compuesto de la presente invención se encontraba en la fracción eluída con una mezcla de cloroformo:metanol = 25:1.

Esta sustancia purificada cruda (producto de purificación crudo 1) que contenía el compuesto de la presente invención pesó 3 g. Además, los rendimientos de los productos de purificación crudos obtenidos en la operación anterior de las fracciones eluídas con las mezclas de cloroformo:metanol = 10:1 y 1:1 fueron de 1,17 y 2,27 g, respectivamente. Se eliminaron los disolventes de estas fracciones, se disolvió cada extracto en 1 ml de una mezcla de cloroformo/metanol (1:1) y se cargó en una columna rellena con 100 g de gel de sílice 60 para conseguir la adsorción de los componentes en la columna, y a continuación los componentes se eluyeron con 1.100 ml de una mezcla de hexano/acetato de etilo (4:1). Las fracciones eluídas se recogieron en forma de alícuotas de 300 ml (fracción A), 300 ml (fracción B) y 500 ml (fracción C) en este orden. Los rendimientos obtenidos después de la eliminación de los disolventes de las fracciones A, B y C fueron de 0,6 g, 1,35 g y 0,15 g, respectivamente. Se confirmó por cromatografía de capa fina de fase normal y de fase inversa que el compuesto de la presente invención se había concentrado en la fracción A.

(Producto de purificación crudo 2). Este producto de purificación crudo 2 se separó adicionalmente mediante HPLC utilizando COSMOSIL C18 (Nacalai Tesque, Inc.) con una mezcla de cloroformo/hexano (85:15) para obtener 1,3 mg de compuesto 3 (4-metilcolest-7-en-3-ol), 1,2 mg de compuesto 4 (4-metilergost-7-en-3-ol) y 1 mg del compuesto 5 (4-metilestigmast-7-en-3-ol). Las estructuras de estos compuestos se confirmaron por EM y RMN.

Ejemplo 1

El presente ejemplo se realizó utilizando ratones AKR a los que se les indujo resistencia a la insulina mediante alimentación de los ratones con una dieta elevada en grasas, para evaluar el cambio en el nivel de ácidos grasos

libres (FFA) en el suero, el cual fue provocado por una aplicación del agente de la presente invención para la mejora de la resistencia a la insulina.

(1) Preparación de muestras

Se disolvieron el compuesto 3 (4-metilcolest-7-en-3-ol), el compuesto 4 (4-metilergost-7-en-3-ol) y el compuesto 5 (4-metilestigmast-7-en-3-ol), que se produjeron en el ejemplo de preparación 1, cada uno en DMSO y se ajustaron con agua destilada para tener una concentración de 1 μg/ml, para preparar de este modo las muestras de prueba 1, 2, y 3. En este caso, se ajustó el DMSO para tener una concentración final del 0,2%. Además, se preparó como muestra negativa una solución sin las muestras de prueba.

(2) Método de prueba

Se alimentaron de forma preliminar ratones AKR macho de 6 semanas de edad (adquiridos de The Jackson Laboratory, EE.UU.) con una dieta elevada en grasas (Research Diet Inc.) durante 2 meses para inducirles resistencia a la insulina. Posteriormente, los ratones se dividieron en grupos de 8 ratones cada uno. A cada uno de los grupos de ratones se les administró por vía oral 1 ml por 40 g de peso corporal (25 μg/kg de peso corporal) de una muestra de prueba o de la muestra negativa, una vez al día utilizando una sonda. En el 60º día desde el inicio de la administración de las muestras, se recogió sangre de los ratones en condiciones de ayuno, y se midió el nivel de ácidos grasos libres en suero mediante la utilización de un test NEFA C de Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

(3) Resultados (nivel de ácidos grasos libres en sangre)

La tabla 1 muestra el nivel de los ácidos grasos libres en el suero de ratón en el 60º día desde el inicio de la administración. En comparación con el grupo administrado con la muestra negativa, se observó que la administración de las muestras de prueba 1, 2, y 3 tendía a reducir los niveles de ácidos grasos libres en suero al 86,4%, 81,6% y 60,8%, respectivamente. Por lo tanto, se encontró que la administración del agente para la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención reduce las concentraciones sistémicas de los ácidos grasos libres y, de este modo, muestra un efecto preventivo sobre el agravamiento de la resistencia a la insulina.

Tabla 1

Muestra	Ácidos grasos libres (mEp/l)	Muestra de prueba/muestra negativa (%)
Muestra de prueba 1	1,35 ± 0,23	84,5
Muestra de prueba 2	1,21 ± 0,22	81,6
Muestra de prueba 3	0,90 ± 0,15	60,8
Muestra negativa	1,48 ± 0,17	-

Ejemplo 2

El presente ejemplo se realizó utilizando ratones AKR a los que se les indujo la resistencia a la insulina mediante alimentación con una dieta elevada en grasas, para evaluar los efectos del agente para la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención sobre la producción de TNF-α y MCP-1 de las células respectivas de los tejidos grasos.

(1) Preparación de las muestras

En el ejemplo 2, se utilizaron las mismas muestras de prueba y muestra negativa que las preparadas en el ejemplo 1.

(2) Método de prueba

Se alimentaron de forma preliminar ratones AKR macho de 6 semanas de edad (adquiridos de The Jackson Laboratory, EE.UU.) con una dieta elevada en grasas (Research Diet Inc.) durante 2 meses para inducirles resistencia a la insulina. Posteriormente, los ratones se dividieron en grupos de 8 ratones cada uno. A cada uno de los grupos de ratones se les administró por vía oral 1 ml por 40 g de peso corporal (25 μg/kg de peso corporal) de una muestra de prueba o de la muestra negativa, una vez al día utilizando una sonda. En el 60º día desde el inicio de la administración de las muestras, se recogieron tejidos adiposos epididimales de los ratones en condiciones de ayuno, y se añadió 1 g de cada una de las grasas a 1,5 ml de un medio D-MEM/F12 que contenía albúmina de suero bovino al 0,5%, seguido de cultivo a 37°C. Después de 1 hora del cultivo, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se midieron las concentraciones de TNF-α y MCP-1 en los sobrenadantes de cultivo por ELISA (Biosource).

(3) Resultados (cantidades producidas de TNF-α y MCP-1)

La tabla 2 muestra las cantidades de TNF-α producidas por los tejidos grasos, y la tabla 3 muestra las cantidades de MCP-1 producidas por los tejidos grasos. Tal como resulta evidente a partir de los resultados de las mismas, se confirmó que en los grupos a los que se administraron las muestras de prueba 1, 2, y 3, respectivamente, éstas tenían efectos inhibidores significativos sobre la producción tanto de TNF-α como de MCP-1 en comparación con el grupo al que se administró la muestra negativa. Como los resultados del presente ejemplo, se encontró que la administración del agente para la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención reduce la producción de adipocitocinas que provocan la resistencia a la insulina en los tejidos grasos y agravan la resistencia a la insulina, y se evita de este modo la generación de resistencia a la insulina. Además, los valores de p de las tablas indican la significación estadística por la prueba de Tukey-Kramer.

Tabla 2

Muestra	TNF-α (pg/ml)	Valor de p
Muestra de prueba 1	33,73 ± 1,68*	0,0450
Muestra de prueba 2	32,71 ± 1,70*	0,0170
Muestra de prueba 3	29,80 ± 3,82*	0,0157
Muestra negativa	37,89 ± 2,56	–

En la tabla, "*" indica que existía un efecto inhibidor estadísticamente significativo sobre la producción de TNF-α.

Tabla 3

Muestra	MCP-1 (pg/ml)	Valor de p
Muestra de prueba 1	100,86 ± 8,31*	0,0154
Muestra de prueba 2	95,56 ± 10,56*	0,0043
Muestra de prueba 3	87,80 ± 9,24*	0,0017
Muestra negativa	122,92 ± 10,06	–

En la tabla, "*" indica que existía un efecto inhibidor estadísticamente significativo sobre la producción de MCP-1.

Ejemplo 3

El presente ejemplo se realizó utilizando ratones AKR a los que se les indujo la resistencia a la insulina por la alimentación con una dieta elevada en grasas, para confirmar un efecto potenciador del agente para la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención sobre la sensibilidad a la insulina, mediante la realización de una prueba de tolerancia a la insulina.

(1) Preparación de las muestras

En el ejemplo 3, se utilizaron las mismas muestras de prueba y la muestra negativa que las preparadas en los ejemplos 1 y 2.

(2) Método de prueba

Se alimentaron de forma preliminar ratones AKR macho de 6 semanas de edad (adquiridos de The Jackson Laboratory, EE.UU.) con una dieta elevada en grasas (Research Diet Inc.) durante 2 meses para inducirles resistencia a la insulina. Posteriormente, los ratones se dividieron en grupos de 8 ratones cada uno. A cada uno de los grupos de ratones se les administró por vía oral 1 ml por 40 g de peso corporal (25 µg/kg de peso corporal) de una muestra de prueba o de la muestra negativa una vez al día utilizando una sonda. En el 45º día desde el inicio de la administración de las muestras, se realizó una prueba de tolerancia a la insulina. La prueba de tolerancia a la insulina en el presente ejemplo se realizó de una manera tal que: los ratones se mantuvieron en ayunas durante 4 horas, y después se les administraron por vía intraperitoneal 0,75 U/kg de peso corporal de insulina humana (Eli Lily and Company); y se midieron los cambios con el tiempo en el nivel de glucosa en sangre a partir del inicio de la administración de insulina hasta 60 minutos más tarde.

(3) Resultados (prueba de tolerancia a la insulina)

Los resultados del presente ejemplo fueron tal como se muestra en la figura 1, que muestra los resultados de la prueba de tolerancia a la insulina. Tal como resulta evidente a partir de la figura 1, los grupos a los que se administraron las muestras de prueba 1, 2, y 3, respectivamente, mostraron una rápida reducción en los niveles de glucosa en sangre inmediatamente después de la iniciación de la administración de insulina, en comparación con el grupo al que se adminsistró la muestra negativa. A partir de los resultados del presente ejemplo, se puso de manifiesto que la administración del agente para la mejora de la resistencia a la insulina de la presente invención aumenta la sensibilidad a la insulina.

Aplicabilidad Industrial

La presente invención puede proporcionar un agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina que es seguro y sin efectos secundarios y es capaz de aumentar la sensibilidad a la insulina, y puede proporcionar un alimento o bebida fisiológicamente funcional, tal como alimentos de utilización para la salud específicos, que contienen el agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina. El agente para su utilización en la mejora de la resistencia a la insulina y el alimento o la bebida fisiológicamente funcionales que lo contienen de la presente invención, tienen efectos de mejora o preventivos sobre enfermedades, complicaciones y similares provocados por una disminución de la sensibilidad a la insulina, por ejemplo, las enfermedades relacionadas con el estilo de vida tales como hipertensión, diabetes, hiperlipidemia y arteriosclerosis, y tienen efectos de reducción sobre los riesgos de estas enfermedades, complicaciones y similares.

REIVINDICACIONES

1. Agente para su utilización en el tratamiento de una enfermedad, mediante la mejora de la resistencia a la insulina, en el que dicha enfermedad se selecciona entre tolerancia anormal a la glucosa e hiperinsulinemia, en el que dicho agente contiene un compuesto seleccionado del grupo que comprende 4-metilcolest-7-en-3-ol, 4-metilergost-7-en-3-ol y 4-metilestigmast-7-en-3-ol.

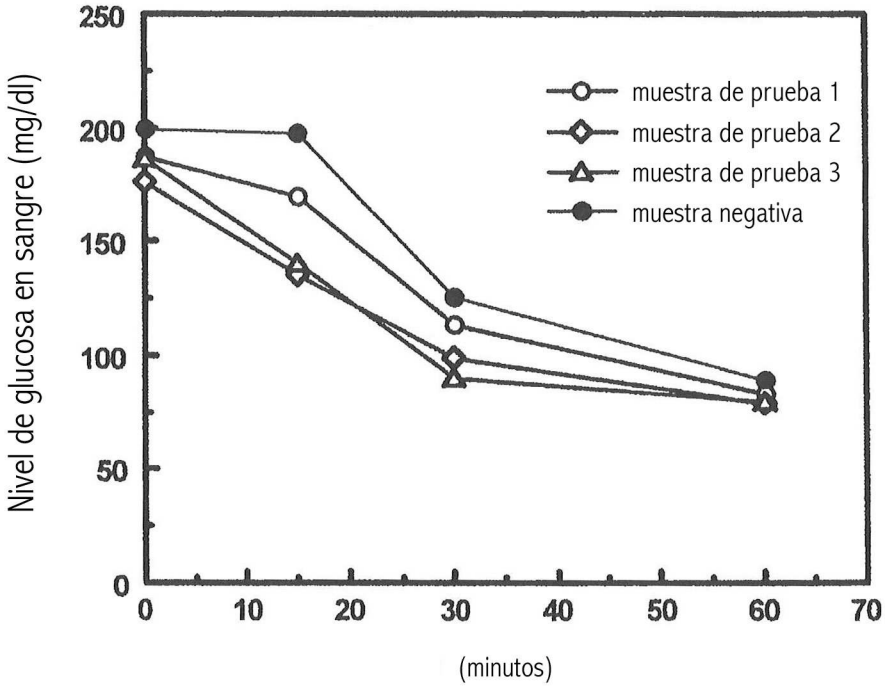
2. Agente para su utilización, según la reivindicación 1, en el que dicho agente contiene, como mínimo, el 0,001% en masa del compuesto.

3. Alimento o bebida para su utilización en el tratamiento de una enfermedad, mediante la mejora de la resistencia a la insulina, en el que dicha enfermedad se selecciona entre tolerancia anormal a la glucosa e hiperinsulinemia, en el que dicho alimento o bebida contiene un compuesto seleccionado del grupo que comprende 4-metilcolest-7-en-3-ol, 4-metilergost-7-en-3-ol y 4-metilestigmast-7-en-3-ol.

4. Alimento o bebida para su utilización, según la reivindicación 3, en el que dicho alimento o bebida contiene, como mínimo, el 0,001% en masa del compuesto.

5. Utilización de un compuesto seleccionado del grupo que comprende 4-metilcolest-7-en-3-ol, 4-metilergost-7-en-3-ol y 4-metilestigmast-7-en-3-ol, en la producción de un agente para el tratamiento de una enfermedad, mediante la mejora de la resistencia a la insulina, en el que dicha enfermedad se selecciona entre tolerancia anormal a la glucosa e hiperinsulinemia, en el que dicho agente contiene, como mínimo, el 0,001% en masa seca del compuesto.

[Fig. 1]


250
200
150
100
50
0
Nivel de glucosa en sangre (mg/dl)
0
10
20
30
40
50
60
70
(minutos)
muestra de prueba 1
muestra de prueba 2
muestra de prueba 3
muestra negativa