

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 723**

51 Int. Cl.:

A61K 31/20 (2006.01)
A61K 31/201 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A23K 20/158 (2006.01)
A23L 33/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2013 PCT/JP2013/077871**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14069227**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2013 E 13850683 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2913051**

54 Título: **Agente mejorador del metabolismo, que comprende un ácido graso raro**

30 Prioridad:

29.10.2012 JP 2012237933

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

04.12.2018

73 Titular/es:

KYOTO UNIVERSITY (50.0%)
36-1, Yoshida-honmachi Sakyo-ku Kyoto-shi
Kyoto 606-8501, JP y
NITTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
(50.0%)

72 Inventor/es:

OGAWA, JUN;
KISHINO, SHIGENOBU;
PARK, SI-BUM;
KAWADA, TERUO;
TAKAHASHI, NOBUYUKI;
GOTO, TSUYOSHI;
KIM, HIDEKAZU;
SUGAWARA, TATSUYA;
HIRATA, TAKASHI y
YONEJIMA, YASUNORI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

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

ES 2 692 723 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 mejorador del metabolismo, que comprende un ácido graso raro

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un agente mejorador del metabolismo que contiene un ácido graso raro. Más concretamente, la presente invención se refiere a un agente mejorador del metabolismo que utiliza la función fisiológica, por ejemplo el efecto de mejorar el metabolismo de lípidos, azúcar y energía, de ácidos grasos raros tales como oxo ácido graso, hidroxí ácido graso y similares. La presente invención también se refiere a un alimento, un producto farmacéutico, un pienso y similares que contienen el agente.

Fundamento de la técnica

10 En los últimos años, la obesidad debida a la sobrealimentación, la falta de ejercicio y similares, en particular la enfermedad relacionada con el estilo de vida que acompaña a la acumulación de grasa visceral, se ha convertido en un problema social. El síndrome metabólico se refiere a una condición en la que se complican al menos dos entre las enfermedades de hiperglucemia, hipertensión y trastorno de los lípidos, y la arteriosclerosis se desarrolla fácilmente debido a la obesidad de la grasa visceral. En la población japonesa entre los 40 y los 74 años de edad, se estima que
15 uno de cada dos varones y una de cada cinco hembras tienen, o posiblemente tienen, síndrome metabólico. Por tanto, se ha propuesto la importancia del ajuste de la ingesta de calorías mediante la terapia dietética con el fin de prevenir o resolver el progreso de la acumulación de lípidos en el síndrome metabólico.

Hay un interés considerable en la ingestión, en la comida, de lípidos funcionales que tienen un efecto mejorador del metabolismo lipídico, un efecto mejorador de la diabetes y similares, incluyendo ácidos grasos conjugados tales como
20 ácido linoleico conjugado y similares (documento no de patente 1), ácidos grasos poliinsaturados ω 3 tales como ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico y similares (documento de patente 1), ácido graso de cadena media (documento de patente 2), y similares.

El documento JP 2009-51732 (WO 2007/069758) describe ligandos PPAR- α o - γ para su uso en el tratamiento de la obesidad, la diabetes y la hiperlipidemia. En particular, dicha referencia describe composiciones farmacéuticas que
25 comprenden hidroxíácidos grasos para su uso en el tratamiento de la obesidad, la diabetes y la hiperlipidemia (véase Resumen; reivindicación 12^a). Los hidroxíácidos grasos incluyen ácido 10-hidroxiesteárico (ácido 10-hidroxi-octadecanoico) y ácido 12-hidroxiesteárico (ácido 12-hidroxi-octadecanoico). Las composiciones pueden presentarse como productos alimenticios, como fármacos o como productos para aplicación tópica. Se dice que los compuestos son activos como ligandos PPAR- α o - γ .

30 Además, se ha informado en los últimos años que una parte de los oxo ácidos grasos, como el ácido 9-oxo-octadecadienoico, el ácido 13-oxo-octadecadienoico y similares, contenidos en el tomate tienen actividad para mejorar las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, tales como la mejora del metabolismo lipídico y similares (documento de patente 3, documentos no de patente 2, 3). Por tanto, las funciones fisiológicas de ácidos grasos raros tales como oxo-ácido graso, hidroxí-ácido graso y similares también reclaman atención.

35 Sin embargo, no se conoce una función fisiológica más detallada de diversos ácidos grasos raros existentes.

[Lista de documentos]

[documentos de patente.]

documento de patente 1: JP-A-2006-521368

documento de patente 2: WO 2009/096570

40 documento de patente 3: JP-A-2011-184411

[documentos no de patente]

documento no de patente 1: Nagao K, (2005), J. Biosci. Bioeng., Vol. 100, nº 2, p. 152 - 157

documento no de patente 2: Kim Y-I, (2011), Mol. Nutr. Food Res., Vol. 55, p. 585 - 593

documento no de patente 3: Kim Y-I, (2012), PLoS ONE, vol. 7, no. 2, e31317

45 Compendio de la invención

Problemas técnicos

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo agente farmacéutico para su uso de la forma siguiente:

1. Un hidroxíácido graso y/o un oxoácido graso para su uso en la profilaxis o el tratamiento de al menos un tipo

seleccionado entre el grupo que consiste en obesidad, diabetes, hiperlipidemia e hígado graso, en donde el hidroxilácido graso es al menos un tipo seleccionado entre el grupo consistente en ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-cis-12, cis-15-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-12-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-12, cis-15-octadecatrienoico, ácido 10,12-dihidroxi-octadecanoico, ácido 10-hidroxi-cis-15-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-cis-6-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-15-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-trans-11-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-trans-11-cis-15-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-cis-6,trans-11-octadecadienoico, y ácido 10-hidroxi-cis-6, trans-11, cis-15-octadecatrienoico, y el oxoácido graso es al menos un tipo seleccionado entre el grupo consistente en ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico, ácido 10-oxo-cis-12, cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6, cis-12, cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6, cis-12-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6, cis-12, cis-15-octadecatrienoico, ácido 10-oxo-octadecanoico, ácido 10-oxo-cis-6-octadecenoico, ácido 10-oxo-cis-15-octadecenoico, ácido 10-oxo-cis-6, cis-15-octadecadienoico, ácido 12-oxo-octadecanoico, ácido 10-oxo-trans-11-octadecenoico, ácido 10-oxo-cis-6, trans-11-octadecadienoico, ácido 10-oxo-trans-11, cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6, trans-11, cis-15-octadecatrienoico, y ácido 12-oxo-cis-9-octadecenoico.

2. El hidroxilácido graso y/o el oxoácido graso para uso de acuerdo con [1], en donde el hidroxilácido graso es al menos un tipo seleccionado entre el grupo consistente en ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico y ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-12-octadecadienoico, y el oxoácido graso es al menos un tipo seleccionado entre el grupo consistente en ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico, ácido 10-oxo-cis-12, cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6, cis-12, cis-15-octadecadienoico y ácido 12-oxo-octadecanoico.

3. El hidroxilácido graso y/o el oxoácido graso para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los apartados [1] a [3], en donde el hidroxilácido graso es 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico, y el oxoácido graso es 10-oxo-cis-12-octadecenoico.

4. El hidroxilácido graso y/o el oxoácido graso para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los apartados [1] a [3] en forma de producto farmacéutico.

5. El hidroxilácido graso y/o el oxoácido graso para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los apartados [1] a [3] en forma de alimento o aditivo para alimentos.

6. El hidroxilácido graso y/o el oxoácido graso para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los apartados [1] a [3] en forma de cosmético o de aditivo para cosmético.

En la presente invención, "y/o" se usa para indicar cualquiera de ellos o ambos.

Efecto de la invención

En la presente invención, se encontró que los oxoácidos grasos o los hidroxilácidos grasos tales como KetoA o HYA (en adelante denominado también oxoácido u oxácido graso) tenían funciones fisiológicas convencionalmente desconocidas, por ejemplo, una acción activadora de PPAR (receptores activados por proliferadores de peroxisomas), una acción supresora del aumento del nivel de glucosa en sangre, una acción de disminución de la grasa neutra en sangre, una acción de mejora de la tolerancia a la glucosa, y una acción promotora del metabolismo de la energía. Además, también se ha encontrado que estos oxoácidos grasos tienen una fuerte acción supresora de la síntesis de lípidos debido a una acción antagonista sobre LXR.

Basándose en tales funciones, la presente invención proporciona un agente mejorador del metabolismo que contiene oxoácidos grasos raros. Como el agente se puede usar en diversos campos, tales como productos farmacéuticos, alimentos y piensos, la presente invención es extraordinariamente útil desde el punto de vista industrial.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los resultados de la actividad de reportero de PPAR α / γ de KetoA o HYA, en donde "cont." indica el control negativo (adición de etanol), "Posi" indica el control positivo (adición de agonista de PPAR) y el eje vertical indica la actividad relativa de luciferasa.

La Fig. 2 muestra los cambios en el peso corporal del ratón después de administrarle KetoA o HYA, en donde el eje vertical indica el peso corporal (g), y el eje horizontal muestra el tiempo transcurrido (semanas).

La Fig. 3 muestra los cambios en el nivel de glucosa en sangre del ratón después de alimentarlo con KetoA o HYA, en donde el eje vertical muestra la concentración de glucosa en plasma (mg/dL) y el eje horizontal muestra el tiempo transcurrido (semanas).

La Fig. 4 muestra el consumo de oxígeno del ratón después de ingerir KetoA o HYA, en donde el eje vertical muestra la cuantía del consumo de oxígeno (mL/kg/h), "oscuridad" indica el valor medido del período oscuro y "luz" indica el valor medido del período luminoso.

La Fig. 5 muestra la temperatura rectal después de alimentar el ratón con KetoA o HYA, en donde el eje vertical muestra la temperatura rectal (°C).

La Fig. 6 muestra el peso de la grasa blanca después de alimentar al ratón con KetoA o HYA, en donde el eje vertical muestra el peso de la grasa blanca intraperitoneal (mg).

La Fig. 7 muestra grasas neutras después de alimentar al ratón con KetoA o HYA, en donde el eje vertical muestra la concentración de triglicéridos en el plasma (mg/dL).

5 La Fig. 8 muestra la influencia de KetoA o HYA sobre la expresión de ARNm de SREBP-1c inducida por el agonista LXR, en donde el eje vertical muestra la expresión relativa del ARNm de SREBP-1c.

La Fig. 9 muestra la influencia de KetoA o HYA en la expresión de SREBP-1 inmaduro inducida por el agonista LXR, en donde el eje vertical muestra la expresión relativa de SREBP-1c inmaduro, y el gráfico superior muestra imágenes de transferencia Western.

10 La Fig. 10 muestra la influencia de KetoA o HYA sobre la expresión de SREBP-1 maduro inducida por el agonista de LXR, en donde el eje vertical muestra la expresión relativa de SREBP-1c maduro, y el gráfico superior muestra imágenes de transferencia Western.

La Fig. 11 muestra la influencia de KetoA o HYA sobre la expresión de ARNm de SCD-1 inducida por el agonista de LXR, en donde el eje vertical muestra la expresión relativa del ARNm de SCD-1.

15 La Fig. 12 muestra la influencia de KetoA o HYA sobre la expresión de ARNm de FAS inducida por el agonista de LXR, en donde el eje vertical muestra la expresión relativa del ARNm de FAS.

La Fig. 13 muestra la influencia de KetoA o HYA sobre la expresión de ARNm de ACC1 inducida por el agonista de LXR, en donde el eje vertical muestra la expresión relativa del ARNm de ACC1.

20 La Fig. 14 muestra la influencia de KetoA o HYA en la expresión de ARNm de ACC2 inducida por el agonista de LXR, en donde el eje vertical muestra la expresión relativa del ARNm de ACC2.

La Fig. 15 muestra la influencia de KetoA o HYA sobre la acumulación de triacilglicerol por el agonista LXR, en donde el eje vertical muestra el nivel de triacilglicerol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína).

La Fig. 16 muestra la evaluación de la acción antagonista sobre LXR mediante ensayo de luciferasa, en donde el eje vertical muestra la actividad relativa de luciferasa.

25 **Descripción de formas de realización**

La presente invención se explica a continuación con detalle.

30 En la presente invención, la "mejora del metabolismo" significa que se mejora el metabolismo de los lípidos y/o del azúcar y/o de la energía. Específicamente, por ejemplo, la mejora del metabolismo de los lípidos significa promover la descomposición de los lípidos presentes en el tejido corporal, la sangre o el tejido linfático, la supresión de la síntesis de lípidos, la prevención y/o supresión de la acumulación de lípidos en tejidos corporales tales como el tejido adiposo, o la reducción de lípidos acumulados en el tejido corporal. El "lípidos" es triglicérido y/o colesterol, que incluyen ácido graso.

35 La mejora del metabolismo del azúcar significa la supresión del aumento del azúcar y/o la hemoglobina glicosilada (HbA1c) presente en la sangre, del nivel de azúcar en sangre en ayunas o promoción del metabolismo post-prandial del azúcar. Además, la mejora del metabolismo del azúcar también incluye la mejora de la tolerancia a la glucosa alterada (patología no incluida en el tipo normal o tipo de diabetes, y prediabética). El "azúcar" se refiere a monosacáridos, disacáridos o polisacáridos.

40 La mejora del metabolismo energético significa llevar el estado del equilibrio anormal del nivel de energía ingerido y liberar el nivel de energía, o el estado del control inalcanzable del equilibrio del nivel de energía ingerido y liberar el nivel de energía, a un estado normal o más próximo a un estado normal.

45 Como índice de la mejora del metabolismo antes mencionada, puede medirse la actividad de PPAR. Se sabe que PPAR incluye al menos 3 tipos de subtipos: PPAR α , PPAR δ (igual que β) y PPAR γ . PPAR α se expresa principalmente en el hígado, el corazón, riñón, músculo esquelético, adipocitos marrones y similares, y está implicado en el control de muchos genes relacionados con la oxidación β de ácidos grasos. El PPAR δ se expresa en comparativamente todo el cuerpo (cerebro, tejido adiposo, piel). El PPAR γ tiene al menos 3 tipos de isoformas, se expresa principalmente en adipocitos blancos y macrófagos, y está implicado en la diferenciación de adipocitos y similares. Cuando se confirma la presencia o ausencia de actividad de ligando (agonista, antagonista) para al menos un tipo de estos PPARs y se encuentra una actividad agonista, se considera que la posibilidad de tener un efecto mejorador del metabolismo es alta, o que está presente un efecto que mejora el metabolismo. Como ejemplo, se puede realizar el ensayo del PPAR reportero descrito en FEBS Letters 514 (2002) p. 315 - 322.

50 Alternativamente, se pueden administrar oxoácidos grasos y similares a un modelo animal de obesidad o diabetes, se miden el peso corporal, el peso del órgano, el nivel de glucosa en sangre, el índice de grasas neutras, el nivel de

consumo de oxígeno, la temperatura rectal y similares, y puede confirmarse la presencia o ausencia de los cambios en los mismos. El modelo animal de obesidad o diabetes no está limitado siempre y cuando sea un animal que muestre las propiedades. Por ejemplo, como modelo animal mencionado anteriormente cabe citar el ratón KKAY, el ratón NOD, el ratón NSY, el ratón TSOD, la rata ZDF/Cri-Leprfa, la rata SDT/Jcl y similares, disponibles comercialmente. El peso corporal, el peso del órgano, el nivel de glucosa en sangre, el índice de grasas neutras, el nivel de consumo de oxígeno, la temperatura rectal y similares se pueden medir mediante un método conocido. Utilizando estos como índices, cuando se observa una disminución del peso corporal o del órgano, o del nivel de glucosa en sangre, se observa el índice de grasas neutras, o cuando se observa un aumento en el nivel de consumo de oxígeno o de la temperatura rectal, se considera que es alta la posibilidad de tener un efecto de mejora del metabolismo, o que hay un efecto de mejora del metabolismo.

Alternativamente, como se describe en los Ejemplos que siguen, se puede confirmar si una acción de promoción de la síntesis de lípidos inducida por el agonista de LXR se suprime por la adición de oxoácido graso. Como método para ello, por ejemplo, cabe mencionar el Journal of Lipid Research 47 (2006) 2712 - 2717. El método descrito en el documento mencionado anteriormente incluye añadir un agonista de LXR y (1) medir el nivel de expresión de ARNm y/o proteína de factores relacionados con la síntesis de lípidos, por ejemplo, SREBP-1c, SREBP-1 maduro e inmaduro, SCD-1, FAS, ACC1 y/o ACC2 maduro e inmaduro, (2) medir el nivel de triacilglicerol intracelular, o (3) realizar un ensayo de luciferasa usando una secuencia que responde a LXR. Los ejemplos del agonista de LXR incluyen, pero sin limitarse a ellos, T0901317, 22(R)-hidroxicolesterol, 24(S)-hidroxicolesterol y similares. Cuando disminuye el nivel de expresión y similares del ARNm y/o proteína del factor relacionado con la síntesis de lípidos, se considera que la síntesis de lípidos se ha suprimido, y que la posibilidad de tener un efecto mejorador del metabolismo es alta, o que existe un efecto de mejora del metabolismo.

En la presente descripción, el oxoácido graso es un oxoácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo carbonilo en la posición 10 o 12 (en lo sucesivo se abrevia a veces como "10-oxo-ácido graso" o "12-oxo-ácido graso"). Incluye además un grupo carbonilo en la posición 10 y un doble enlace cis en la posición 12 (en lo sucesivo abreviado a veces como "10-oxo, cis-12-ácido graso"), un oxoácido graso que tiene 18 átomos de carbono, un grupo carbonilo en la posición 10 y un doble enlace trans en la posición 11 (de aquí en adelante abreviado como "10-oxo-trans-11-ácido graso"), y un ácido graso oxo que tiene 18 átomos de carbono y un grupo carbonilo en la posición 10 y que no tiene un doble enlace en las posiciones 11 y 12 (en lo sucesivo abreviado algunas veces como "10-oxo-ácido graso 11,12-saturado"). Más específicamente, de acuerdo con la presente invención, estos oxoácidos grasos se eligen entre ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico (KetoA), ácido 10-oxo-cis-12,cis-15-octadecadienoico (en lo sucesivo también denominado "αKetoA"), ácido 10-oxo-cis-6, cis-12-octadecadienoico (en lo sucesivo también denominado "γKetoA"), ácido 10-oxo-cis-6, cis-12, cis-15-octadecatienoico (en lo sucesivo también denominado "sKetoA"), ácido 10-oxo-octadecanoico (en lo sucesivo también denominado "KetoB"), ácido 10-oxo-cis-6-octadecenoico (en lo sucesivo también denominado "γKetoB"), ácido 10-oxo-cis-15-octadecenoico (en lo sucesivo también denominado "αKetoB"), ácido 10-oxo-cis-6, cis-15-octadecadienoico (en lo sucesivo también denominado "sKetoB"), ácido 12-oxo-octadecanoico (en lo sucesivo, también denominado como "rKetoB"), ácido 10-oxo-trans-11-octadecenoico (en lo sucesivo también denominado "KetoC"), ácido 10-oxo-cis-6, trans-11-octadecadienoico (en lo sucesivo también denominado "αKetoC"), ácido 10-oxo-cis-6, trans-11, cis-15-octadecatienoico (en lo sucesivo también denominado "sKetoC"), y ácido 12-oxo-cis-9-octadecanoico (en lo sucesivo también denominado "KetoRA").

De acuerdo con la presente descripción, hidroxíácido graso se refiere a un hidroxíácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 10 (en adelante abreviado a veces como "10-hidroxi ácido graso"), o un hidroxíácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 12 (de aquí en adelante se abreviará a veces como "12-hidroxi ácido graso"). Aquí, un "10,12-dihidroxi ácido graso" que tiene un grupo hidroxilo en las posiciones 10 y 12 también se incluye como una realización de "10-hidroxi ácido graso", "12-hidroxi ácido graso". Además, un hidroxíácido graso que tiene 18 átomos de carbono, un grupo hidroxilo en la posición 10 y un doble enlace cis en la posición 12 (en lo sucesivo abreviado a veces como "10-hidroxi ácido graso cis-12"), hidroxíácido graso que tiene 18 átomos de carbono, un grupo hidroxilo en la posición 10 y un doble enlace trans en la posición 11 (en adelante abreviado como "10-hidroxi ácido graso, trans-11") y un hidroxilo ácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 10 y libre de doble enlace en las posiciones 11 y 12 (de aquí en adelante a veces abreviado como "10-hidroxi ácido graso 11,12-saturado") también están comprendidos. Más específicamente, de acuerdo con la presente invención, estos hidroxíácidos grasos se seleccionan entre ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico (HYA), ácido 10-hidroxi-cis-12, cis-15-octadecadienoico (en lo sucesivo también se hará referencia al mismo como "αHYA"), ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-12-octadecadienoico (en lo sucesivo también denominado "γHYA"), ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-12, cis-15-octadecatienoico (en lo sucesivo también denominado "sHYA"), ácido 10,12-dihidroxi-octadecanoico (en lo sucesivo también denominado "rHYA"), ácido 10-hidroxi-cis-15-octadecenoico (en lo sucesivo también denominado "αHYB"), ácido 10-hidroxi-cis-6-octadecenoico (en lo sucesivo también denominado "γHYB"), ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-15-octadecadienoico (en lo sucesivo también denominado "sHYB"), ácido 10-hidroxi-trans-11-octadecenoico (en lo sucesivo también denominado "HYC"), ácido 10-hidroxi-trans-11, cis-15-octadecadienoico (en lo sucesivo, también se denomina "αHYC"), ácido 10-hidroxi-cis-6,trans-11-octadecadienoico (en lo sucesivo también denominado "γHYC"), y ácido 10-hidroxi-cis-6, trans-11, cis-15-octadecatienoico (en lo sucesivo también denominado "sHYC").

El oxoácido graso y el hidroxíácido graso para uso en la presente invención pueden prepararse por el método descrito

en la solicitud de patente japonesa No. 2012-108928, y HYA puede prepararse por referencia a Biochemical and Biophysical Research Communications 416 (2011) p. 188 - 193. KetoRA, rKetoB pueden prepararse utilizando la oxidación de ácido crómico que sigue.

El método específico descrito en la solicitud de patente japonesa nº 2012-108928 es como sigue.

5 (reacción 1)



10 El ácido graso 10-oxo se produce a partir de un ácido graso insaturado que tiene 18 átomos de carbono y un doble enlace cis en la posición 9 (en lo sucesivo abreviado a veces como "ácido graso insaturado cis-9") mediante una reacción en dos etapas. En la primera reacción (reacción 1), se produce 10-hidroxiácido graso a partir de ácido graso insaturado cis-9 mediante una reacción de hidratasa.

15 El sustrato en la "reacción 1" no está particularmente limitado siempre y cuando sea un ácido graso insaturado que tiene 18 átomos de carbono y un doble enlace cis en la posición 9, y los ejemplos del mismo incluyen ácido monoenoico (18:1), ácido dienoico (18:2), ácido trienoico (18:3), ácido tetraenoico (18:4) y ácido pentanoico (18:5). Más preferidos son el ácido dienoico, ácido trienoico y ácido tetraenoico, y son particularmente preferidos los ácidos dienoicos y los ácidos trienoicos. En la presente memoria descriptiva, "ácido graso" comprende no solo ácidos libres sino también la forma éster, sal con un compuesto básico.

Los ejemplos del ácido monoenoico incluyen ácido oleico y ácido ricinoleico.

Los ejemplos de ácido dienoico incluyen ácido linoleico y ácido cis-9, trans-11-octadecadienoico.

Un ejemplo de ácido trienoico es el ácido α -linolénico y el ácido γ -linolénico.

20 Un ejemplo de ácido tetraenoico incluye ácido estearidónico.

25 Aunque la hidratasa que cataliza la reacción 1 no está particularmente limitada siempre y cuando sea una enzima capaz de utilizar el ácido graso cis-9 insaturado mencionado anteriormente como sustrato y capaz de convertirse en 10-hidroxi ácido graso, por ejemplo, es preferible la hidratasa de ácido graso derivada de bacterias ácido lácticas (CLA-HY). Más preferida es CLA-HY derivada de Lactobacillus plantarum, y es particularmente preferida CLA-HY derivada de la cepa FERM BP-10549 de L. plantarum. CLA-HY puede obtenerse por el método descrito en el documento JP-A-2007-259712.

La cantidad de hidratasa a añadir es, por ejemplo, de 0,001 - 0,10 mg/ml, preferiblemente de 0,1 - 5 mg/ml, más preferiblemente de 0,2 - 2 mg/ml.

30 Puede usarse un "cofactor" para la reacción 1 y, por ejemplo, se puede usar NADH, NADPH y FADH₂. La concentración de la adición puede ser cualquiera siempre y cuando la reacción de hidratación tenga lugar eficientemente. Es preferiblemente 0,001 - 20 mM, más preferiblemente 0,01 - 10 mM.

35 Además, se puede usar un "activador" para la reacción enzimática y, por ejemplo, cabe mencionar uno o más compuestos elegidos entre el grupo que consiste en molibdato potásico, molibdato disódico (VI) anhídrido, molibdato disódico (VI) dihidrato, ortovanadato sódico (V), metavanadato sódico (V), wolframato potásico (VI), wolframato sódico (VI) anhídrido y wolframato sódico (VI) dihidrato. La concentración de adición de la misma puede ser cualquiera siempre y cuando la reacción de hidratación tenga lugar de manera eficiente. Es preferiblemente 0,1 - 20 mM, más preferiblemente 1 - 10 mM.

40 Por ejemplo, se puede obtener rHYA añadiendo tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 6,5) que contiene enzima de hidratación (peso corporal de las bacterias húmedas de 0,7 g) expresada en Escherichia coli, NADH (33 mg), FAD (0,8 mg), ácido ricinoleico (1 g), BSA (0,2 g) a RA hasta una cantidad total de 10 ml, y realizando una reacción de agitación anaeróbicamente a 37°C durante 63 horas, a 225 rpm.

Por otra parte, se puede obtener 12-hidroxi ácido graso, por ejemplo, mediante hidrólisis de aceite natural que contiene, como componente principal, éster de triglicérido que contiene 12-hidroxiácido graso como ácido graso constituyente.

(reacción 2)



En la segunda reacción (reacción 2), se produce 10-oxo-ácido graso a partir de 10-hidroxi ácido graso mediante una reacción de deshidrogenasa u oxidación química usando ácido crómico.

- 5 Aunque la deshidrogenasa que cataliza la reacción 2 no está particularmente limitada siempre y cuando sea una enzima capaz de utilizar 10-hidroxi ácido graso como sustrato y capaz de convertirse en 10-oxo ácido graso, por ejemplo, es preferible una hidroxi ácido graso-deshidrogenasa derivada de bacterias acidolácticas (CLA-DH). Más preferida es CLA-DH derivada de *Lactobacillus plantarum*, y particularmente preferida es CLA-DH derivada de la cepa FERN BP-10549 de *L. plantarum*. La CLA-DH puede obtenerse mediante el método descrito en el documento JP-A-2007-259712.

La cantidad de deshidrogenasa a añadir es, por ejemplo, de 0,001 - 10 mg/ml, preferiblemente de 0,1 - 5 mg/ml, más preferiblemente de 0,2 - 2 mg/ml.

- 15 Se puede usar un "cofactor" para la reacción 2 y, por ejemplo, se pueden usar NAD, NADP y FAD. La concentración de la adición puede ser cualquiera siempre y cuando la reacción de oxidación tenga lugar de manera eficiente. Es preferiblemente de 0,001 - 20 mM, más preferiblemente de 0,01 - 10 mM.

Además, se puede usar un "activador" para la reacción enzimática y, por ejemplo, se pueden usar compuestos similares a los citados como ejemplos en la reacción 1 mencionada anteriormente a una concentración de adición similar.

La segunda reacción puede realizarse mediante oxidación química.

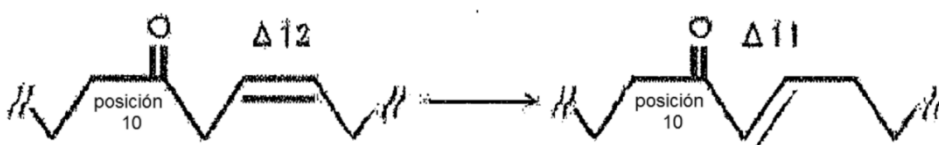
- 20 Como oxidación química, pueden mencionarse los métodos conocidos *per se*, por ejemplo la oxidación con ácido crómico, preferiblemente la oxidación de Jones y similares. Como ácido crómico se pueden usar sales y complejos del compuesto tales como ácido crómico anhidro CrO_3 , ácido crómico H_2CrO_4 y ácido dicrómico $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

De manera similar, se puede obtener 12-oxo-ácido graso a partir de 12-hidroxi ácido graso. Por ejemplo, puede obtenerse KetoRA mediante el método siguiente.

- 25 Concretamente, se añaden ácido sulfúrico (2,3 ml) y agua (7,7 ml) al ácido crómico anhidro (2,67 g), y se añade acetona (90 ml) a la mezcla para dar una solución de ácido crómico. Se agregan 5 g de RA y 100 ml de acetona en un matraz Erlenmeyer, y la solución de ácido crómico mencionada anteriormente se añade a gotas mientras se agita en un agitador sobre hielo. Cuando la solución cambia de verde azulado a naranja pálido, se detiene la adición gota a gota de la solución de ácido crómico, y la reacción se interrumpe con alcohol isopropílico. El sedimento precipitado se elimina por centrifugación, y el sobrenadante centrifugado obtenido se coloca en un embudo de separación y se mezcla bien con hexano (100 ml) y agua Milli-Q (100 ml). La capa de hexano se recupera por centrifugación, se lava varias veces con agua Milli-Q, y se concentra mediante un evaporador rotatorio para extraer el producto de reacción y los sustratos no reaccionados. Se puede confirmar que aproximadamente el 98% del extracto es KetoRA. Gel de sílice (Wakogel (r)C-100) en un peso de 20 a 30 veces el peso del extracto (mezcla que contiene KetoRA) se hincha con hexano, se empaqueta en una columna de vidrio, y se pone sulfato sódico (anhidro) sobre el mismo. El extracto obtenido anteriormente (mezcla que contiene KetoRA) se suspende en eluyente de hexano:éter dietílico 8:2 y se aplica a la columna. El eluyente se deja fluir a un caudal de aproximadamente 2 ml y la solución descargada de la columna se fracciona y se recupera. Cada fracción recuperada se analiza mediante LC/MS y cromatografía de gases. Las fracciones que contienen solo KetoRA se recogen y se concentran mediante un evaporador rotatorio para dar KetoRA que tiene una pureza de no menos del 99%.

También, se puede obtener rKetoB por oxidación con ácido crómico de la misma manera que en rHYB.

(reacción 3)



- 45 El ácido graso 10-oxo, trans-11 se produce a partir de un oxo ácido graso que tiene 18 átomos de carbono, un grupo carbonilo en la posición 10 y un doble enlace cis en la posición 12 mediante una reacción de isomerasa (reacción 3).

El "sustrato" de la reacción 3 no está particularmente limitado siempre y cuando sea 10-oxo ácido graso, cis-12 inducido a partir de un ácido graso insaturado que tenga 18 átomos de carbono y un doble enlace cis en las posiciones 9 y 12, por las reacciones 1 y 2 mencionadas anteriormente. Los ejemplos de las mismas incluyen KetoA inducido a partir de ácido linoleico, α KetoA inducido a partir de ácido α -linolénico, γ KetoA inducido a partir de ácido γ -linolénico, y sKetoA inducido a partir de ácido estearidónico. El sustrato se puede obtener por un método distinto de las reacciones 1 y 2.

Aunque la isomerasa que cataliza la reacción 3 no está particularmente limitada siempre que sea una enzima capaz de utilizar el 10-oxo ácido graso, cis-12 mencionado anteriormente como sustrato y capaz de convertirse en 10-oxo, ácido graso trans-11, por ejemplo, es preferible la oxo-ácido-isomerasa derivada de bacterias ácidolácticas (CLA-DC). Más preferido es CLA-DC derivado de *Lactobacillus plantarum*, y particularmente preferido es CLA-DC derivado de la cepa FERM BP-10549 de *L. plantarum*. CLA-DC puede obtenerse mediante el método descrito en el documento JP-A-2007-259712.

La cantidad de isomerasa a añadir es, por ejemplo, de 0,001 - 10 mg/ml, preferiblemente de 0,1 - 5 mg/ml, más preferiblemente de 0,2 - 2 mg/ml.

Se puede usar un "activador" para la reacción de isomerasa y, por ejemplo, se pueden usar compuestos similares a los citados como ejemplos en la reacción 1 anteriormente mencionada, a una concentración de adición similar.

(reacción 4)



El 10-Oxo, ácido graso saturado 11,12 se produce a partir de un oxo ácido graso que tiene 18 átomos de carbono, un grupo carbonilo en la posición 10 y un doble enlace trans en la posición 11 (10-oxo ácido graso, trans-11) mediante una reacción de saturasa (reacción 4).

El "sustrato" de la reacción 4 no está particularmente limitado siempre que sea 10-oxo ácido graso, trans-11 producido por la reacción 3 mencionada anteriormente. Los ejemplos de los mismos incluyen KetoC inducido a partir de KetoA, α KetoC inducido a partir de α KetoA, γ KetoC inducido a partir de γ KetoA, sKetoC inducido a partir de sKetoA. El sustrato puede obtenerse por un método distinto al de la reacción 3.

Aunque la saturasa que cataliza la reacción 4 no está particularmente limitada siempre y cuando sea una enzima capaz de utilizar el ácido graso 10-oxo, trans-11 mencionado anteriormente como sustrato y capaz de convertirse en ácido graso 10-oxo, 11,12-saturado, por ejemplo, es preferible oxo ácido graso-enona reductasa (CLA-ER) derivada de bacterias ácidolácticas. Más preferido es CLA-ER derivada de *Lactobacillus plantarum*, y es particularmente preferido CLA-ER derivada de la cepa FERM BP-10549 de *L. plantarum*.

La enzima "CLA-ER" anteriormente mencionada es

(a) una proteína enzimática que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2,

(b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°: 2 en la que uno o varios aminoácidos están borrados y/o sustituidos y/o insertados, y tienen la actividad enzimática de catalizar la reacción 4 mencionada anteriormente, o

(c) una proteína codificada por una secuencia de bases que hibrida con un ácido nucleico que consiste en una secuencia de cadena complementaria de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1 bajo condiciones rigurosas, y que tiene una actividad enzimática para catalizar la reacción 4 mencionada anteriormente.

Ejemplos más específicos de los (b) mencionados anteriormente incluyen una proteína que contiene (i) una secuencia de aminoácidos que es la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, en donde se eliminan de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a varios (5, 4, 3 o 2) aminoácidos, (ii) una secuencia de aminoácidos que es la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N°: 2, en la que se añaden de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a varios aminoácidos (5, 4, 3 o 2), (iii) una secuencia de aminoácidos que es la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N°: 2, en la que se insertan de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a varios (5, 4, 3 o 2) aminoácidos, (iv) una secuencia de aminoácidos que es la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N°: 2, en donde de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a varios (5, 4, 3 o 2) aminoácidos están sustituidos por otros aminoácidos, o (v) una secuencia de aminoácidos obtenida combinándolos. Cuando aminoácidos con propiedades similares (p. ej. glicina y alanina, valina y leucina e isoleucina, serina y treonina, ácido aspártico y ácido glutámico, asparagina y glutamina, lisina y arginina, cisteína y metionina, fenilalanina y tirosina) se intercambian entre ellos, es posible un mayor número de sustituciones.

Cuando los aminoácidos se borran, se sustituyen o se insertan como se mencionó anteriormente, las posiciones de deleción, sustitución e inserción no están particularmente limitadas siempre que se mantenga la actividad enzimática mencionada anteriormente.

5 En la (c) mencionada anteriormente, las "condiciones rigurosas" son condiciones bajo las cuales las secuencias de nucleótidos que tienen una identidad elevada, por ejemplo, identidad de 70, 80, 90, 95 o 99% o más, se hibridan entre sí y las secuencias de nucleótidos que tienen una identidad menor que esa no se hibridan; específicamente, condiciones de lavado una vez, más preferiblemente 2 - 3 veces, a la concentración de sal y a la temperatura correspondientes a las condiciones de lavado de hibridación Southern general (60°C, 1 x SSC, 0,1% SDS, preferiblemente, 0.1 x SSC, 0,1% SDS, más preferiblemente, 68°C, 0,1 x SSC, 0,1% SDS).

10 La CLA-ER puede aislarse, por ejemplo, del hongo y medio de cultivo de la cepa FERM BP-10549 de *L. plantarum* mediante una técnica de separación y purificación de proteínas conocida *per se*, por ejemplo, usando como índice la actividad enzimática que cataliza la reacción 4 mencionada anteriormente. Alternativamente, también puede producirse por recombinación sintetizando la secuencia de bases total de la región de codificación de CLA-ER basándose en la información de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID N°: 1, o diseñando un cebador capaz de amplificar el segmento génico CLA-ER que contiene la región codificante, realizando PCR usando ADNc o ADN genómico preparado a partir de la cepa mencionada anteriormente como molde, clonando el fragmento de amplificación obtenido en un vector de expresión adecuado e introduciendo al mismo en una célula huésped, y cultivando la célula.

20 Como vector que contiene un ácido nucleico que codifica la CLA-ER mencionada anteriormente, se puede seleccionar apropiadamente uno adecuado para que una célula hospedadora se introduzca con el vector de acuerdo con el objeto (por ejemplo, expresión de proteína), y puede ser usado. El vector de expresión puede contener un promotor apropiado, una señal de terminación de la transcripción y un gen marcador de selección (gen de resistencia a un fármaco, gen que complementa la mutación auxotrófica). Además, puede contener una secuencia que codifica una secuencia etiqueta útil para la separación y purificación de la proteína expresada. Alternativamente, el vector puede incorporarse en el genoma de una célula huésped diana. El vector puede introducirse en una célula huésped diana mediante un método de transformación conocido *per se*, tal como un método de célula competente, un método de protoplasto, un método de coprecipitación de fosfato de calcio.

30 La "célula huésped" mencionada anteriormente puede ser cualquier célula, siempre y cuando pueda expresar un vector que contiene un ácido nucleico que codifica la CLA-ER mencionado anteriormente, y pueden mencionarse bacterias, levaduras, hongos, y células eucarióticas superiores. Los ejemplos de bacteria incluyen bacterias gram-positivas tales como bacilos, *Streptomyces* y similares y bacterias gram-negativas tales como *Escherichia coli*. Puede cultivarse una célula recombinante introducida con un vector que contiene un ácido nucleico que codifica CLA-ER, mediante un método conocido *per se* que sea adecuado para la célula huésped.

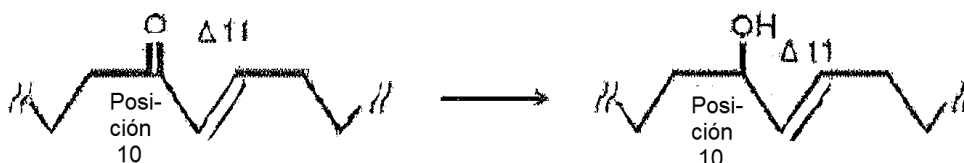
35 La "purificación" de la CLA-ER anteriormente mencionada puede realizarse mediante un método conocido *per se*, por ejemplo hongos recogidos por centrifugación se rompen mediante ultrasonificación o perlas de vidrio, y sólidos tales como restos celulares se eliminan por centrifugación, para dar una solución de enzima cruda que se somete a un procedimiento de precipitación salina usando sulfato de amonio, sulfato sódico, cromatografías tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis en gel.

40 La cantidad de saturasa a añadir es, por ejemplo, de 0,001 a 10 mg/ml, preferiblemente de 0,1 a 5 mg/ml, más preferiblemente de 0,2 a 2 mg/ml.

Se puede usar un "cofactor" para la reacción 4 y, por ejemplo, puede usarse NADH. La concentración de adición puede ser cualquiera siempre que la reacción de oxidación tenga lugar de manera eficiente. Es preferiblemente de 0,001 a 20 mM, más preferiblemente de 0,01 a 10 mM.

45 Además, se puede usar un "activador" para la reacción enzimática y, por ejemplo, compuestos similares a los citados como ejemplos en la reacción 1 mencionada anteriormente pueden usarse a una concentración de adición similar.

(reacción 5)



(reacción 6)



El 10-hidroxi ácido graso, trans-11 se produce a partir de un oxo ácido graso que tiene 18 átomos de carbono, un grupo carbonilo en la posición 10 y un doble enlace trans en la posición 11 (10-oxo ácido graso trans-11) mediante una reacción de deshidrogenasa (reacción 5) o 10-hidroxi-ácido graso, 11,12 saturado se produce a partir de un oxo ácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo carbonilo en la posición 10 y que no tiene doble enlace en las posiciones 11 y 12 (ácido graso 10-oxo, 11,12-saturado) mediante una reacción con deshidrogenasa (reacción 6).

El "sustrato" de la reacción 5 no está particularmente limitado siempre y cuando sea ácido graso 10-oxo, trans-11 producido por la reacción 3 mencionada anteriormente. Los ejemplos de esto incluyen KetoC inducido a partir de KetoA, α KetoC inducido a partir de α KetoA, γ KetoC inducido a partir de γ KetoA, sKetoC inducido a partir de sKetoA. El sustrato se puede obtener por un método distinto de la reacción 3.

Por otra parte, el "sustrato" de la reacción 6 no está particularmente limitado siempre que sea ácido graso 10-oxo-11,12- saturado producido por la reacción 4 mencionada anteriormente. Los ejemplos de los mismos incluyen KetoB inducido por KetoC, α KetoB inducido a partir de α KetoC, γ KetoB inducido a partir de γ KetoC, sKetoB inducido a partir de sKetoC y similares. El sustrato puede obtenerse por un método diferente a la reacción 4.

Aunque la deshidrogenasa que cataliza la reacción 5 o la reacción 6 no está particularmente limitada siempre y cuando sea una enzima capaz de utilizar 10-oxoácido graso trans-11 o 10-oxo-ácido graso, 11,12 saturado como sustrato y capaz de convertirse en 10-hidroxiácido graso trans-11 o 10-hidroxiácido graso saturado 11,12, por ejemplo, es preferible hidroxilácido derivado de bacterias acidolácticas - deshidrogenasa (CLA-DH). Más preferido es CLA-DH derivado de *Lactobacillus plantarum*, y particularmente preferido es CLA-DH derivado de cepa FERM BP-10549 de *L. plantarum*. Aunque CLA-DH cataliza la reacción de oxidación en la reacción 2 mencionada anteriormente, también puede catalizar la reacción de reducción en la reacción 5 o reacción 6 como reacción inversa.

La cantidad de deshidrogenasa a añadir es, por ejemplo, 0,001 - 10 mg/ml, preferiblemente 0,1 - 5 mg/ml, más preferiblemente 0,2 - 2 mg/ml.

Se puede usar un "cofactor" para la reacción 5 y la reacción 6 y, por ejemplo, NADH, NADPH, FADH₂ y similares. La concentración de adición puede ser cualquiera siempre y cuando la reacción de reducción proceda de manera eficiente. Es preferiblemente de 0,001 a 20 mM, más preferiblemente de 0,01 a 10 mM.

Además, se puede usar un "activador" para la reacción enzimática y, por ejemplo, se pueden usar compuestos similares a los citados como ejemplos en la reacción 1 anteriormente mencionada a una concentración de adición similar.

En cada una de las reacciones mencionadas anteriormente, las enzimas (hidratasa, deshidrogenasa, isomerasa, saturasa) se someten al sistema de reacción en forma de células recombinantes (p. ej. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, levadura, células de insectos, células animales) introducidas con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que las codifica. En este caso, la reacción también se puede realizar cultivando las células en un medio líquido adecuado para el cultivo de las células y añadiendo un sustrato y, cuando sea necesario, un cofactor y un activador. Además, cualquiera de las enzimas mencionadas anteriormente puede ser una enzima purificada o una purificada groseramente. Alternativamente, la hidratasa se puede expresar en hongos tales como *Escherichia coli* y similares, y se puede usar el propio hongo o se puede usar un medio de cultivo del mismo. Además, la enzima puede ser de tipo libre o inmovilizada por diversos vehículos.

El agente mejorador del metabolismo que contiene oxoácidos grasos y/o los hidroxilácidos grasos puede aplicarse al tratamiento de las enfermedades relacionadas con el estilo de vida. La "enfermedad relacionada con el estilo de vida" es la obesidad, tal como la obesidad adulta y la obesidad infantil.

El agente mejorador del metabolismo puede usarse para la profilaxis o mejora de la diabetes (diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes del embarazo), hiperlipidemia e hígado graso. De acuerdo con la presente invención, el agente mejorador del metabolismo se puede usar para la profilaxis o el tratamiento de al menos un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en obesidad, diabetes, hiperlipidemia e hígado graso, mediante administración a seres humanos, o a un animal no humano (p. ej., perro, gato, ratón, rata, hámster, conejo de Indias, conejo, cerdo, bovino, pollo, periquito, pájaro mina de monte, cabra, caballo, oveja, mono).

El agente mejorador del metabolismo de la presente invención que contiene los oxo ácidos grasos y/o los hidroxil ácidos grasos se puede usar, por ejemplo, como producto farmacéutico, alimento, pienso o cosmético, o añadiéndole el agente.

La forma de dosificación del producto farmacéutico incluye dispersión, gránulos, píldoras, cápsulas blandas, cápsulas duras, comprimidos, comprimidos masticables, comprimidos de integración rápida, jarabes, líquidos, suspensión, supositorios, pomadas, cremas, gel, adhesivos, inhalante e inyección. Una preparación de los mismos se prepara de acuerdo con un método convencional. Dado que el oxo ácido graso es poco soluble en agua, se disuelve en un disolvente orgánico no hidrófilo tal como aceite derivado de plantas, aceite derivado de animales, o se dispersan o emulsionan en una solución acuosa junto con un emulsionante, un agente dispersante, un agente tensioactivo mediante un homogeneizador (homogeneizador de alta presión) y se utilizan.

Los ejemplos de aditivos que pueden usarse para formulación incluyen aceites animales y vegetales tales como aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de germen, aceite de girasol, grasa de vacuno, aceite de sardina, polialcoholes tales como polietilenglicol, propilenglicol, glicerol, sorbitol, agentes tensioactivos tales como éster de sorbitán de ácido graso, éster de sacarosa de ácido graso, éster de glicerina de ácido graso, éster de poliglicerol de ácido graso, excipientes tales como agua purificada, lactosa, almidón, celulosa cristalina, D-manitol, lecitina, goma arábiga, solución de sorbitol, solución de carbohidratos, edulcorante, colorante, agente de ajuste del pH, y agente saborizante. Un preparado líquido puede disolverse o suspenderse en agua u otro medio adecuado cuando se usa. Además, el comprimido y los gránulos pueden estar recubiertos por un método bien conocido.

Para la administración en forma de inyección, son preferibles las administraciones intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intraperiosteal, sublingual, oral, y es preferible en particular la administración intravenosa o la administración intraperitoneal. La administración intravenosa puede ser administración por goteo y administración en bolo.

Cuando el agente mejorador del metabolismo se usa como alimento o como aditivo alimentario, la forma del alimento no está particularmente limitada siempre que permita la ingestión oral, tal como una solución, suspensión, polvo, artículo sólido conformado. Los ejemplos específicos incluyen suplementos (polvo, gránulos, cápsulas blandas, cápsulas duras, comprimidos, comprimidos masticables, comprimidos de integración rápida, jarabe, líquido), bebidas (bebidas de ácido carbónico, bebidas de ácido láctico, bebidas deportivas, bebidas con zumos de fruta, bebidas vegetales, bebidas de leche de soja, café, te, bebidas en polvo, bebidas concentradas, bebidas nutritivas, bebidas alcohólicas), confitería (dulces de goma, jaleas, chicles, chocolates, galletas, caramelos, confitería japonesa, *snacks*), comida rápida (fideos instantáneos, comida retorta, latas, alimentos para microondas, sopa instantánea, sopas miso, comida liofilizada), aceite, alimentos con grasas y aceites (mayonesa, aliños, mantequilla, crema, margarina), productos de trigo en polvo (pan, pasta, fideos, mezcla para pasteles, pan rallado), condimentos (salsa, condimento para el procesamiento del tomate, sazónador de sabor, mezcla para cocinar, sopa), productos cárnicos procesados (jamón, salchichas).

Los alimentos antes mencionados pueden contener, en caso necesario, varios nutrientes, varias vitaminas (vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina K, etc.), varios minerales (magnesio, zinc, hierro, sodio, potasio, selenio), fibra dietética, agente dispersante, estabilizante tal como emulsionante, edulcorante, componentes aromatizantes (ácido cítrico, ácido málico), saborizante, jalea real, propóleo, Agaricus.

Cuando el agente mejorador del metabolismo de la presente invención se usa como pienso o aditivo para piensos, el pienso es, por ejemplo, pienso para mascotas, cría de ganado o aditivo para piensos de acuicultura.

Cuando el agente mejorador del metabolismo de la presente invención se usa como cosmético o aditivo para cosméticos, el cosmético es, por ejemplo, crema, gel, leche para la piel, suero, tóner, esencia de microemulsión, máscara facial, base, barra labial, sombra de ojos, champú, acondicionador y aditivo para el baño, y se puede mezclar con el mismo un sabor.

Puede mezclarse solo un tipo de oxo ácido graso con el producto farmacéutico, alimento, pienso y cosmético, o pueden usarse en combinación dos o más tipos de los mismos.

La dosis del producto farmacéutico o la cantidad de ingestión de alimento pueden determinarse apropiadamente de acuerdo con la edad y el peso corporal de los pacientes o de aquellos que ingieren dicho alimento, los síntomas, el tiempo de administración, la forma de dosificación, el método de administración y la combinación de medicamentos. Por ejemplo, cuando el producto farmacéutico se administra por vía oral, la cantidad total de oxo ácido graso como ingrediente activo es de 0,02 a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 0,2 a 50 mg/kg de peso corporal, por día para un adulto, o de 0,002 mg a 50 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 0,02 a 5,0 mg/kg de peso corporal, por administración parenteral, que se puede administrar una vez al día o en varias porciones (2 - 5) diarias. Cuando se ingiere como un alimento, se puede añadir a un alimento de manera que la cantidad total de ingesta de oxoácido graso como ingrediente activo sea de 1 a 6000 mg, preferiblemente de 10 a 3000 mg, por día para un adulto. La cantidad de ingestión de pienso y la cantidad de uso del cosmético se pueden determinar apropiadamente de acuerdo con la cantidad de ingestión del alimento mencionada anteriormente y la dosis anteriormente mencionada del producto farmacéutico.

La presente invención se explica con más detalle a continuación haciendo referencia a los ejemplos. Los ejemplos son meras ejemplificaciones de la presente invención.

Ejemplos

Los ácidos grasos raros tales como KetoA, HYA, γ HYA, γ KetoA y rHYA usados en la presente invención se prepararon basándose en el método mencionado anteriormente (el método descrito en la solicitud de patente japonesa No. 2012-108928). Se preparó KetoRA a partir de ácido ricinoleico (RA) basándose en el método mencionado anteriormente.

5 Se adquirieron GW7647 (agonista de PPAR α) y Troglitazone (agonista de PPAR γ) de Sigma-Aldrich, T0901317 (agonista de LXR) se adquirió de Cayman Chemical, RA se adquirió de NU-CHEK PREP, INC. (EE. UU.) (número de producto: U-50-A), EPA se adquirió de NU-CHEK PREP, INC. (EE. UU.) (número de producto: U-99-A), se adquirió LA de Sigma-Aldrich (número de producto: L1376) y se adquirieron otros reactivos de Wako Pure Chemical Industries, Ltd. o Nacalai Tesque.

10 [Ejemplo 1]

Medida de la actividad de ligando PPAR α , γ .

Para evaluar la función del hidroxilo ácido graso u oxo ácido graso, se midió primero la acción PPAR α , γ -activadora. La medida se realizó en referencia a Nobuyuki Takahashi et al., FEBS Letters 514 (2002) p. 315 - 322, "Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPAR γ and PPAR α in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes", la sección de Materiales y Métodos "Reporter plasmids and luciferase assays". Para ser específico, un plásmido que contiene ADN que codifica una proteína fusionada de la región de unión del ligando PPAR α , γ y la región de unión al ADN GAL4 (pM-hPPAR α o pM-hPPAR γ), un plásmido reportero que contiene la secuencia de ADN de unión de GAL4 ligada a luciferasa (p4xUASg-tk-luc), y el control interno (pRL-CMV) para estandarizar la eficacia de la transfección, se introdujeron en células CV-1 derivadas del riñón del mono verde africano. El ligando descrito más adelante fue añadido a las células y, después de la incubación durante 24 horas, se midió la actividad de la luciferasa. Como ligando, se añadieron KetoA y HYA a razón de 30 μ M.

15

20 La concentración de la muestra se ajustó con etanol. Se usó etanol como control negativo, se usó PPAR α como control positivo y GW7647 (10 nM) y Troglitazone (5 μ M) como agonistas γ . Los resultados se muestran en la fig. 1.

25 De la Fig. 1, se encontró una fuerte actividad agonista de PPAR α y γ en KetoA, y se encontró actividad agonista de PPAR α y algo de actividad agonista de PPAR γ en HYA.

Por un método similar, también se midió la actividad de luciferasa para α KetoA, γ KetoA, sKetoA, KetoB, γ KetoB, α KetoB, sKetoB, rKetoB, KetoC, γ KetoC, α KetoC, sKetoC, KetoRA, α HYA, γ HYA, sHYA, rHYA, α HYB, γ HYB, sHYB, HYC, α HYC, γ HYC y sHYC. Como resultado, KetoC, α KetoC, KetoRA y γ KetoC mostraron actividad agonista de PPAR α y γ , KetoB, α HYA, γ HYA, rKetoB y rHYA mostraron actividad agonista de PPAR α , y α KetoA y γ KetoA mostraron actividad agonista de PPAR γ .

30

[Ejemplo 2]

Efecto en ratones modelo de obesidad o diabetes.

(1) Usando el ratón KKAY como ratón modelo de obesidad o diabetes, se evaluó el efecto de KetoA, HYA. Ratones KKAY (KKAY/TaJcl, macho, de 4 semanas de edad, adquiridos de CLEA Japón, Inc. y criados individualmente) se criaron preliminarmente en una dieta normal (ND) comercial durante 1 semana, divididos en 5 grupos, y cada grupo fue criado en una dieta alta en grasas (HFD) como alimento básico y se le dio un alimento sin adición (grupo de control), o un alimento al que se añadió diferentes cantidades de KetoA y HAY, durante 4 semanas. El alimento con adición de KetoA, HYA se preparó añadiendo KetoA, HYA a HFD de modo que la cantidad a añadir fuera 0,05% (p/p) (grupo de 0,05%) o 0,1% (p/p) (grupo de 0,1%).

35

(2) Se midió el perfil del peso corporal y el nivel de glucosa en sangre del ratón KKAY. Después del comienzo de la cría de alimentación de prueba, se midió el nivel de consumo de oxígeno el día 16 - 19, se realizó una prueba de carga oral de glucosa el día 24 y se midió la temperatura rectal el día 26. El siguiente día de la finalización de la crianza experimental, se sometió a disección el ratón KKAY, y se midieron el peso del órgano y el nivel de grasa neutro en el plasma.

(3) El perfil del peso corporal del ratón KKAY se muestra en la Fig. 2. En el grupo de alimentación al que se ha añadido KetoA, se encontró una tendencia a la supresión del aumento de peso corporal en el grupo del 0,05%, y se encontró una supresión significativa del aumento del peso corporal en el grupo del 0,1%. En el grupo de alimentación al que se ha añadido HYA, se encontró una supresión significativa del aumento de peso corporal en el grupo del 0,05%. En la Figura, la señal * indica $P < 0,05$, y la señal ** indica $P < 0,01$ (en adelante lo mismo para las Figuras 3 a 7).

El perfil del nivel de glucosa en sangre del ratón KKAY se muestra en la Fig. 3. A las 4 semanas de la ingestión de la dieta de prueba, se encontró una tendencia a la supresión del aumento de glucosa en sangre en el grupo KetoA del 0,05% en comparación con el grupo de control. Además, se encontró una acción hipoglucemiante más fuerte y significativa en el grupo del 0,1% de KetoA. Por otra parte, el grupo HYA mostró una tendencia a la supresión del aumento del nivel de glucosa en sangre, a pesar de que no se encontró una diferencia significativa. El nivel de consumo de oxígeno del ratón KKAY se muestra en la Fig. 4. Además, los resultados de la temperatura rectal del ratón KKAY se

55

muestran en la Fig. 5. En comparación con el grupo de control, se encontró un aumento del nivel de consumo de oxígeno en el grupo KetoA, y también se encontró un aumento de la temperatura rectal. Los resultados muestran que la generación de calor se promueve en el grupo KetoA. Los resultados del peso del órgano (peso de grasa blanca intraperitoneal) del ratón KKAY se muestran en la Fig. 6, y los resultados de las grasas neutras en plasma se muestran en la Fig. 7. Se confirmó una disminución significativa tanto del peso de la grasa blanca intraperitoneal como del nivel de grasa neutra en el plasma, en el grupo del 0,1% KetoA.

(4) De los resultados anteriores, la anomalía del metabolismo asociada con la obesidad mejoró en el grupo de ingestión de KetoA. Como se encontró un aumento en el nivel de consumo de oxígeno y una elevación de la temperatura rectal, se considera que la generación de calor promovida contribuye a la mejora de la anomalía del metabolismo mediante KetoA.

[Ejemplo 3]

Efecto sobre la inducción de la síntesis de ácidos grasos por el agonista de LXR.

Usando células HepG2 derivadas de cáncer de hígado humano (célula nº JCRB1054, Health Science Research Resources Bank), se evaluó el efecto supresor sobre la promoción de la síntesis de ácidos grasos inducida por el agonista de LXR mediante referencia al método de Zaima et al. (Journal of Lipid Research 47, 2712 - 2717, 2006).

Se cultivaron células HepG2 ($2,0 \times 10^5$ células/ml) en medio DMEM que contenía 10% de FES durante 24 horas, y el medio se intercambió con medio DMEM que contiene 0,1% BSA que contiene 10 nM de agonista de LXR T0901317 (Cayman Chemicals) y 60 μ M de diversos ácidos grasos. Después de cultivar durante 24 horas, se recuperaron las células, y se extrajo el ARN total usando reactivo Sepasol (Nacalai Tesque). Después del tratamiento con ADNasa, se realizó la transcripción inversa usando SuperScriptII (Invitrogen) para dar una solución de ADNc. Utilizando SYBR Green Mix (Bio-Rad, Richmond, California) y cebador específico del gen (Tabla 1), se realizó la PCR en tiempo real del modo que sigue.

Tabla 1

mRNA	secuencia de bases del cebador	referencia
SREBP-1c	5'-GGAGGGGTAGGGCCAACGGCCT-3' (SEQ ID NO: 3) 5'-CATGTCTTCGAAAGTGCAATCC-3' (SEQ ID NO: 4)	Field et al., 2002 *
SCD-1	5'-TGGTTTCACTTGGAGCTGTG-3' (SEQ ID NO: 5) 5'-GGCCTTGGAGACTTTCTTCC-3' (SEQ ID NO: 6)	NM_005063
FAS	5'-ACAGGGACAACCTGGAGTTCT-3' (SEQ ID NO: 7) 5'-CTGTGGTCCCCTTGATGAGT-3' (SEQ ID NO: 8)	Field et al., 2002
ACC1	5'-ATCCCGTACCTTCTTCTACTG-3' (SEQ ID N°: 9) 5'-CCCAAACATAAGCCTTCACTG-3' (SEQ ID N°: 10)	NM_198834
ACC2	5'-CTCTGACCATGTTTCGTTCTC-3' (SEQ ID N°: 11) 5'-ATCTTCATCACCTCCATCTC-3' (SEQ ID N°: 12)	NM_001093
18S	5'-TAAGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3' (SEQ ID NO: 13) 5'-GATCCGAGGGCCTCACTAAAC-3' (SEQ ID NO: 14)	Field et al., 2002

* Field et al., 2002; Biochem J. 368: 855 – 864.

1. Reacción a 96°C, 15 minutos, 2. reacción a 96°C, 15 s, 3. reacción a 60°C durante 30 s, 4. medida de la fluorescencia, 5. 2 - 4 se repitieron 40 veces, 6. la curva de fusión se midió de 65°C a 95°C en intervalos de 0,4°C. Como patrón interno se utilizó el ARNr 18S. Los genes implicados en la síntesis de ácidos grasos medidos fueron proteína-1c de unión al elemento regulador de colesterol (SREBP-1c), esteroil coenzima A desaturasa-1 (SCD-1), sintasa de ácidos grasos (FAS) y acetil CoA carboxilasa-1 y -2 (ACC-1,2). En cuanto a la cantidad de TG intracelular acumulado, el lípido se extrajo con cloroformo-metanol y se cuantificó mediante E Test Wako de triglicéridos (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Además, se midió el nivel de expresión de proteína de SREBP-1c inmaduro y maduro. Las células tratadas como se menciona anteriormente se dispersaron en tampón A (sacarosa 250 mM, HEPES-KOH 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA-Na 1 mM, EGTA-Na 1 mM, pH 7,6) que contiene un inhibidor de proteasa, se pasaron 20 veces a través de una aguja de inyección de calibre 23 y se centrifugaron (1000 x g, 4°C, 5 min) para separarse en sobrenadante 1 y

precipitado 1. El precipitado 1 se re-disolvió en tampón B (HEPES-KOH 20 mM, NaCl 0,42 M, 2,5% de glicerol, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA-Na 1 mM, EGTA-Na 1 mM, pH 7,6) y se centrifugó (10⁵ x g, 4°C, 15 min). El sobrenadante 2 obtenido se usó como fracción nuclear (que incluye la forma madura). El sobrenadante 1 se siguió centrifugando (10⁵ x g, 4°C, 15 min) y el precipitado 2 obtenido se disolvió en lisado celular (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, SDS 1%, EDTA-Na 1 mM), EGTA-Na 1 mM) y se usó como fracción de membrana (incluyendo la forma inmadura). Usando esto como muestras, la medida se realizó por el método de transferencia Western usando anticuerpo policlonal anti-SREBP-1 (Santa Cruz). Utilizando el sistema de luciferasa Dual (Promega), se evaluó la acción antagonista en LXR mediante un ensayo de luciferasa. Se introdujeron p3xIR1-tk-Luc, pCMX-hLXRa, pRL-CMX en la célula HepG2. Después del cultivo en un medio libre de suero que contiene BSA al 0,1% que contiene diversos ácidos grasos y T0901317 durante 24 horas, se midió la actividad de la luciferasa.

La Fig. 8 muestra la variación de la expresión del ARNm de SREBP-1c. T0901317 aumentó la expresión a aproximadamente 7 veces, pero se encontró una fuerte acción supresora en HYA y KetoA. Los resultados de la transferencia Western también muestran que HYA y KetoA suprimieron fuertemente la promoción de la expresión de SREBP-1 maduro e inmaduro inducido por T0901317 (Figuras 9, 10). También se demostró que los genes relacionados con la síntesis de lípidos (SCD-1, FAS, ACC1, 2) bajo regulación transcripcional mediante SREBP-1c también muestran una regulación a la baja por estos ácidos grasos (Figuras 11 a 14). Aunque el nivel de triacilglicerol intracelular también fue aumentado por T0901317 (Figura 15), el aumento fue reprimido significativamente por la presencia conjunta de estos ácidos grasos. Se examinó una acción antagonizante sobre el receptor nuclear LXR que regula SREBP-1c mediante un ensayo de luciferasa para encontrar que estos ácidos grasos suprimen significativamente la acción de T0901317, antagonizando así a LXR (Figura 16).

En las Figs. 8 a 16, la señal * indica P < 0,05, la señal ** indica P < 0,001, y la señal *** indica P < 0,0001 (frente a la adición T0901317, no adición de ácidos grasos).

Por un método similar, se midieron también αKetoA, γKetoA, sKetoA, KetoB, γKetoB, αKetoB, sKetoB, rKetoB, KetoC, κKetoC, αKetoC, sKetoC, KetoRA, αHYA, γHYA, sHYA, rHYA, αHYB, γHYB, sHYB, rHYB, RA, HYC, αHYC, γHYC y sHYC para SREBP-1c, expresión madura e inmadura de SREBP-1, SCD-1, FAS, ACC1, 2, nivel de triacilglicerol intracelular y acción antagonista sobre LXR mediante ensayo de luciferasa. Como resultado, γHYA, γKetoA, αKetoA, rKetoB también mostraron una acción supresora de la síntesis de lípidos por la acción antagonizante sobre LXR.

De los resultados anteriores, se demostró que HYA y KetoA de los ácidos grasos examinados en este momento tienen una fuerte acción supresora de la síntesis de lípidos por una acción antagonizante en LXR. De manera similar, se ha demostrado también que ácidos grasos raros tales como γHYA, γKetoA, αKetoA y rKetoB tienen una acción supresora de la síntesis de lípidos.

Aplicabilidad industrial

La presente invención ha dejado claro que oxoácidos grasos y/o hidroxiácidos grasos específicos tienen un efecto de mejora del metabolismo de los lípidos y/o del azúcar y/o de la energía convencionalmente desconocido como una función fisiológica de los mismos. Un agente mejorador del metabolismo de lípidos y/o azúcar y/o energía que contiene el oxoácido graso es aplicable a diversos campos tales como productos farmacéuticos, alimentos y piensos, y la presente invención es de una gran utilidad industrial.

Listado de secuencias

<110> Kyoto University
Nitto Pharmaceutical Industries, Ltd.

<120> Agente mejorador del metabolismo que comprende ácidos grasos raros

<130> 092100

<150> JP 2012-237933

<151> 2012-10-29

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 654

<212> ADN

<213> Lactobacillus plantarum

<220>

<221> CDS

<222> (1).(654)

ES 2 692 723 T3

```

<400> 1
atg tca gaa gca gtg aaa aat ttg gtg aac aat gat tta gca gac gtg      48
Met Ser Glu Ala Val Lys Asn Leu Val Asn Asn Asp Leu Ala Asp Val
1          5          10          15

atg ttt aac cgc cat tca gtt cgg cag ttt gac ccg aac gtt aaa att      96
Met Phe Asn Arg His Ser Val Arg Gln Phe Asp Pro Asn Val Lys Ile
          20          25          30

gga cgt gat gag tta caa aag atg att gcg gaa gca gcc acc gcg cca      144
Gly Arg Asp Glu Leu Gln Lys Met Ile Ala Glu Ala Ala Thr Ala Pro
          35          40          45

tcg gca tgt aat tta cag tca tgg cac ttt gtc gtc gtg gat acc ccc      192
Ser Ala Cys Asn Leu Gln Ser Trp His Phe Val Val Val Asp Thr Pro
          50          55          60

gag gca aag gct aag ttc aaa caa gcc gtg atg aaa ttc aac tac cca      240
Glu Ala Lys Ala Lys Phe Lys Gln Ala Val Met Lys Phe Asn Tyr Pro
65          70          75          80

cag gtc gac agt gca tcg gcc atc gtc ttt att gcc ggt gac acc cag      288
Gln Val Asp Ser Ala Ser Ala Ile Val Phe Ile Ala Gly Asp Thr Gln
          85          90          95

tcg cat tat gtt tat cgc gat gtc tgg aac aaa gtt tat gag gat ggg      336
Ser His Tyr Val Tyr Arg Asp Val Trp Asn Lys Val Tyr Glu Asp Gly
          100          105          110

aat att acg aag gaa cgc ttg gat cag att ctg gga acc ttc tta cca      384
Asn Ile Thr Lys Glu Arg Leu Asp Gln Ile Leu Gly Thr Phe Leu Pro
          115          120          125

tta tat gaa aat gcc aca cca gat ttc ttg aaa ttc gat gcg acg att      432
Leu Tyr Glu Asn Ala Thr Pro Asp Phe Leu Lys Phe Asp Ala Thr Ile
          130          135          140

gat tgt tcc gtt gtc ggg atg cag ttg ctg cta gtg gca cgg gct cat      480
Asp Cys Ser Val Val Gly Met Gln Leu Leu Leu Val Ala Arg Ala His
145          150          155          160

ggg tat gat gcc aat gcg ttc tcc gga att gac ttt gaa aag atg att      528
Gly Tyr Asp Ala Asn Ala Phe Ser Gly Ile Asp Phe Glu Lys Met Ile
          165          170          175

ccg acg ctg ggt ctt gat cct aaa cga tac gtg cca gta atg ggg atc      576
Pro Thr Leu Gly Leu Asp Pro Lys Arg Tyr Val Pro Val Met Gly Ile
          180          185          190

gca atc ggg aaa gca gcg caa gaa ccg ctc cat acg act cgg tac gat      624
Ala Ile Gly Lys Ala Ala Gln Glu Pro Leu His Thr Thr Arg Tyr Asp
          195          200          205

gcc aaa aca cag act gat ttc tta gcc taa      654
Ala Lys Thr Gln Thr Asp Phe Leu Ala
          210          215

```

5 <210> 2
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus plantarum
 <400> 2

ES 2 692 723 T3

Met Ser Glu Ala Val Lys Asn Leu Val Asn Asn Asp Leu Ala Asp Val
1 5 10 15

Met Phe Asn Arg His Ser Val Arg Gln Phe Asp Pro Asn Val Lys Ile
20 25 30

Gly Arg Asp Glu Leu Gln Lys Met Ile Ala Glu Ala Ala Thr Ala Pro
35 40 45

Ser Ala Cys Asn Leu Gln Ser Trp His Phe Val Val Val Asp Thr Pro
50 55 60

Glu Ala Lys Ala Lys Phe Lys Gln Ala Val Met Lys Phe Asn Tyr Pro
65 70 75 80

Gln Val Asp Ser Ala Ser Ala Ile Val Phe Ile Ala Gly Asp Thr Gln
85 90 95

Ser His Tyr Val Tyr Arg Asp Val Trp Asn Lys Val Tyr Glu Asp Gly
100 105 110

Asn Ile Thr Lys Glu Arg Leu Asp Gln Ile Leu Gly Thr Phe Leu Pro
115 120 125

Leu Tyr Glu Asn Ala Thr Pro Asp Phe Leu Lys Phe Asp Ala Thr Ile
130 135 140

Asp Cys Ser Val Val Gly Met Gln Leu Leu Leu Val Ala Arg Ala His
145 150 155 160

Gly Tyr Asp Ala Asn Ala Phe Ser Gly Ile Asp Phe Glu Lys Met Ile
165 170 175

Pro Thr Leu Gly Leu Asp Pro Lys Arg Tyr Val Pro Val Met Gly Ile
180 185 190

Ala Ile Gly Lys Ala Ala Gln Glu Pro Leu His Thr Thr Arg Tyr Asp
195 200 205

Ala Lys Thr Gln Thr Asp Phe Leu Ala
210 215

5 <210> 3
<211> 22
<212> ADN
<213> Cebador

<400> 3
ggaggggtag ggccaacggc ct 22

10 <210> 4
<211> 22
<212> ADN
<213> Cebador

15 <400> 4
catgtctcg aaagtcaat cc 22

<210> 5

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Cebador

 <400> 5
 5 tggtttcaact tggagctgtg 20

 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Cebador
 10 <400> 6
 ggccctggag actttctcc 20

 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Cebador

 <400> 7
 acagggacaa cctggagttc t 21

 <210> 8
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Cebador

 <400> 8
 ctgtgtgcc acttgatgag t 21

 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Cebador
 25 <400> 9
 atcccgtacc ttcttact g 21

 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Cebador
 30 <400> 10
 cccaaacata agccttcaact g 21

 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Cebador
 40 <400> 11
 ctctgacat gttcgttctc 20

 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Cebador
 45 <400> 12
 atcttcatca cctccatctc 20

 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Cebador
 50 <400> 113

ES 2 692 723 T3

taagtcctg cccttgta caca 23
<210> 14
<211> 21
<212> ADN
5 <213> Cebador

<400> 14
gatccgaggg cctcactaaa c 21

REIVINDICACIONES

1. Un hidroxiácido graso y/o un oxoácido graso para su uso en la profilaxis o el tratamiento de al menos una condición seleccionada entre el grupo que consiste en obesidad, diabetes, hiperlipidemia e hígado graso, en donde el hidroxiácido graso es al menos un compuesto seleccionado entre el grupo consistente en ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-cis-12, cis-15-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-12-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-12, cis-15-octadecatrienoico, ácido 10,12-dihidroxi-octadecanoico, ácido 10-hidroxi-cis-15-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-cis-6-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-15-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-trans-11-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-trans-11, cis-15-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-cis-6, trans-11-octadecadienoico, y ácido 10-hidroxi-cis-6, trans-11, cis-15-octadecatrienoico, y el oxoácido graso es al menos un compuesto seleccionado entre el grupo consistente en ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico, ácido 10-oxo-cis-12, cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6, cis-12-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6, cis-12, cis-15-octadecatrienoico, ácido 10-oxo-octadecanoico, ácido 10-oxo-cis-6-octadecenoico, ácido 10-oxo-cis-15-octadecenoico, ácido 10-oxo-cis-6, cis-15-octadecadienoico, ácido 12-oxo-octadecanoico, ácido 10-oxo-trans-11-octadecenoico, ácido 10-oxo-cis-6, trans-11-octadecadienoico, ácido 10-oxo-trans-11, cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6, trans-11, cis-15-octadecatrienoico, y ácido 12-oxo-cis-9-octadecenoico.
2. El hidroxiácido graso y/o el oxoácido graso para uso según la reivindicación 1, en donde el hidroxiácido graso es al menos un compuesto seleccionado entre el grupo consistente en ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico y ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-12-octadecadienoico, y el oxoácido graso es al menos un tipo seleccionado entre el grupo consistente en ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico, ácido 10-oxo-cis-12, cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6, cis-12-octadecadienoico y ácido 12-oxo-octadecanoico.
3. El hidroxiácido graso y/o el oxoácido graso para su uso según la reivindicación 1, en donde el hidroxiácido graso es ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico, y el oxoácido graso es ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico.
4. El hidroxiácido graso y/o el oxoácido graso para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en forma de producto farmacéutico.
5. El hidroxiácido graso y/o el oxoácido graso para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en forma de pienso o aditivo para pienso.
6. El hidroxiácido graso y/o el oxoácido graso para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en forma de cosmético o de aditivo para cosmético.

Fig. 1

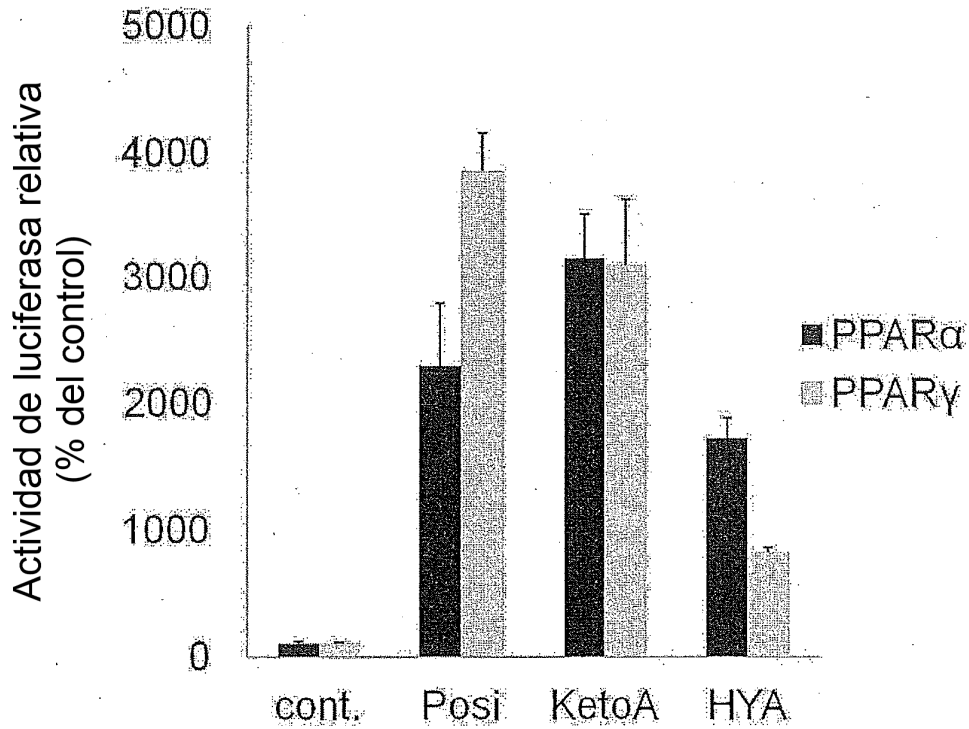


Fig. 2

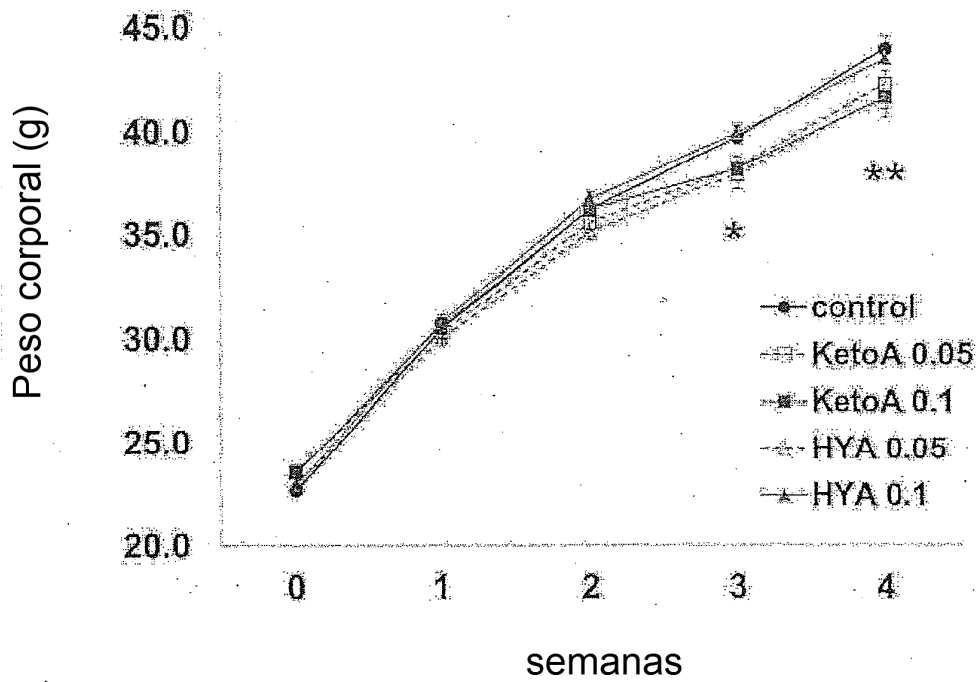


Fig. 3

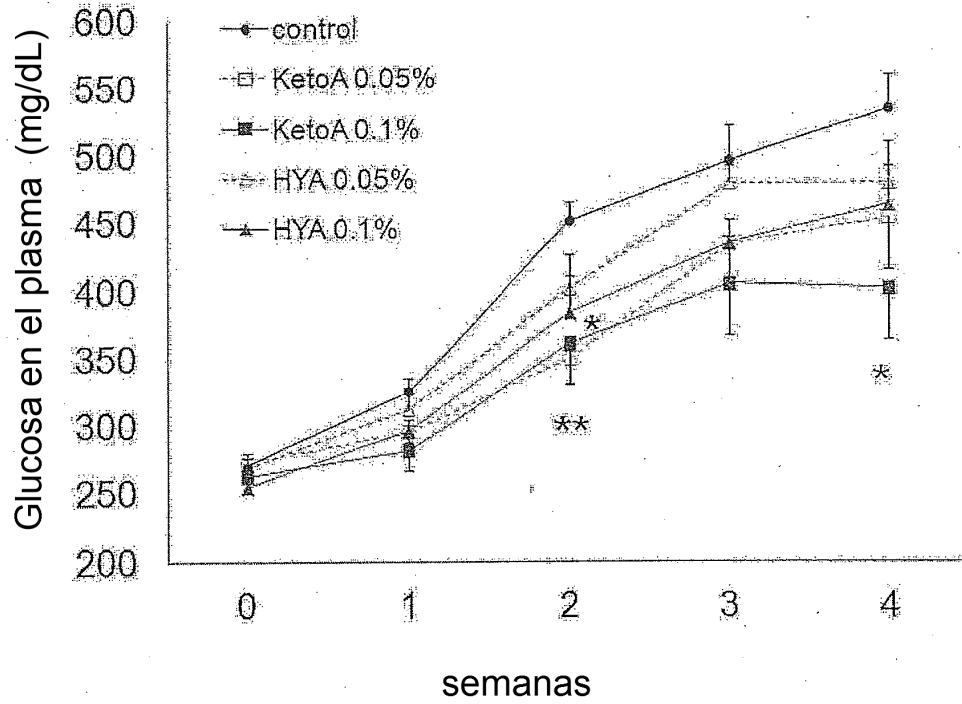


Fig. 4

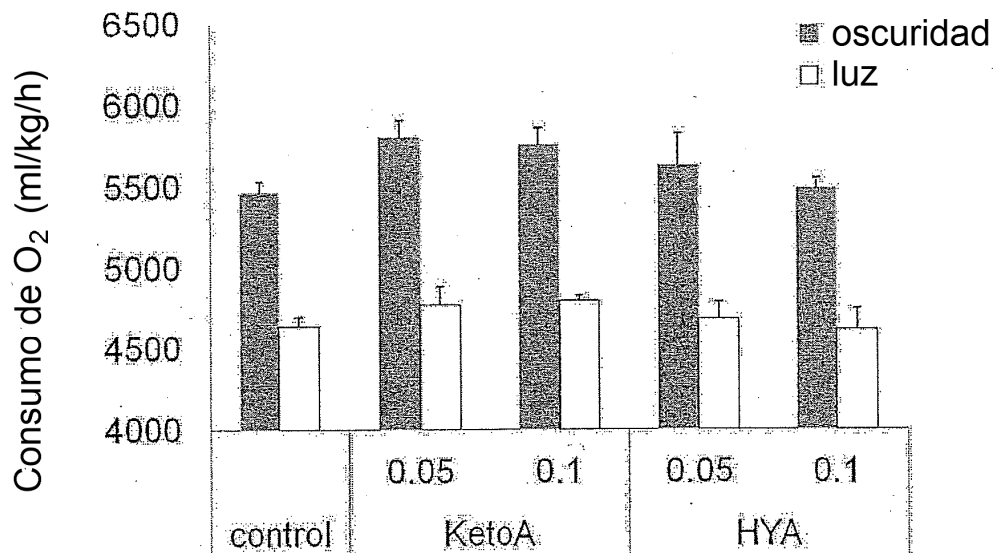


Fig. 5

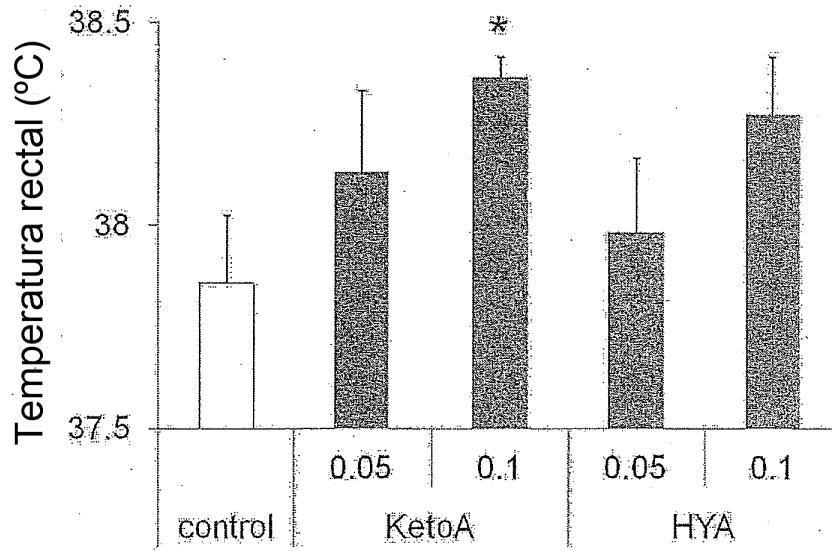


Fig. 6

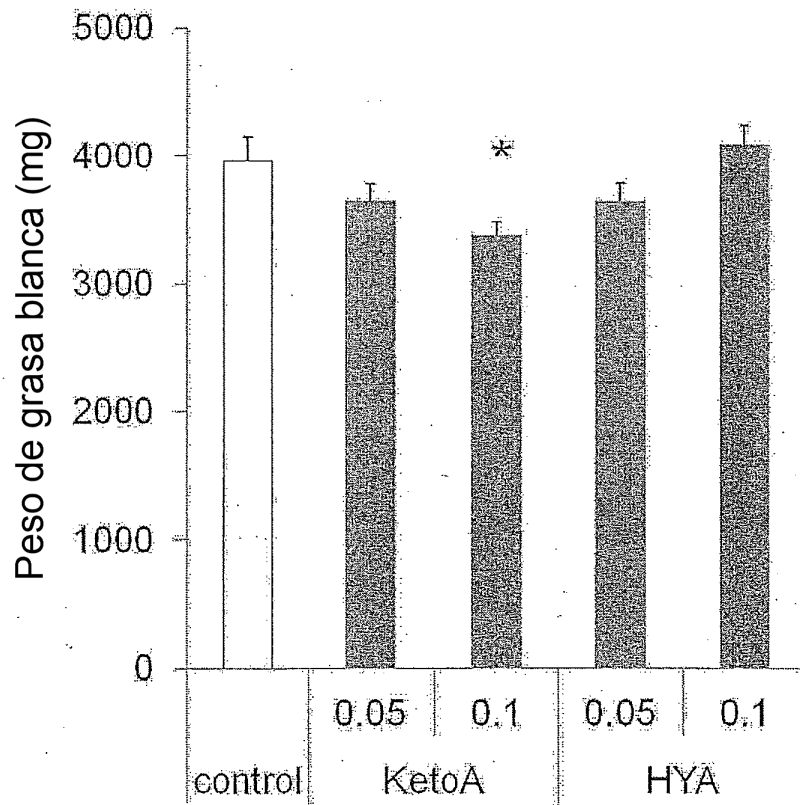


Fig. 7

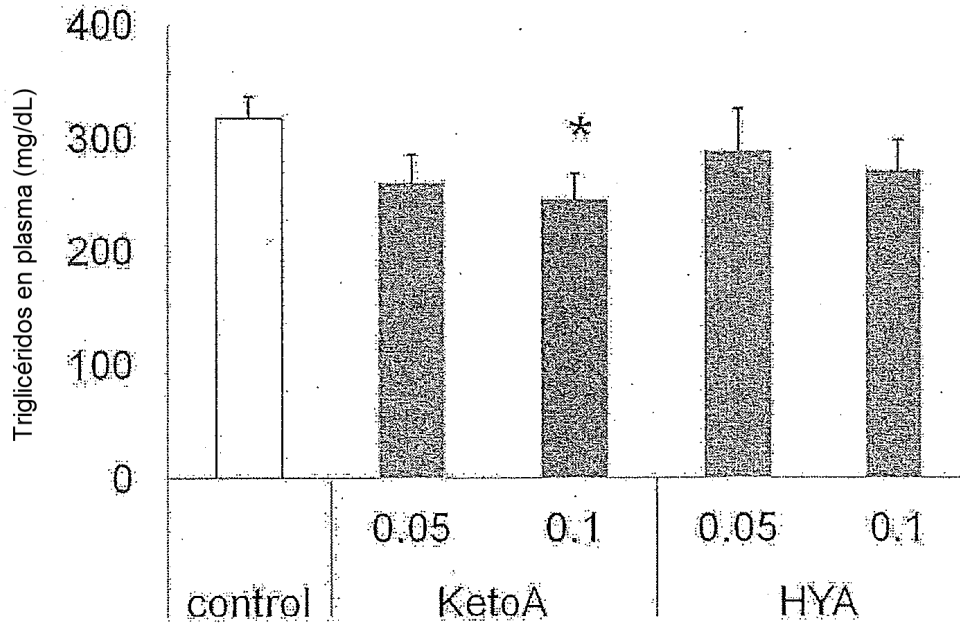


Fig. 8

influencia sobre la expresión de mRNA de SREBP-1c inducida por el agonista LXR

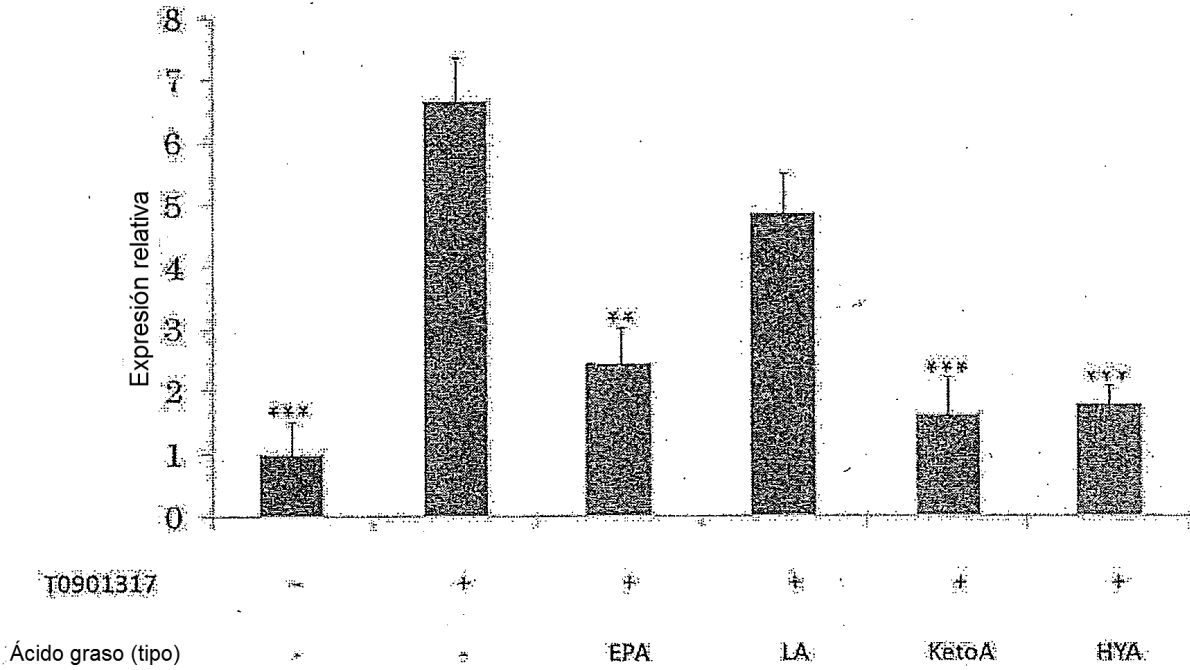


Fig. 9

Influencia sobre la expresión de SREB-1 inmaduro inducida por el agonista LXR

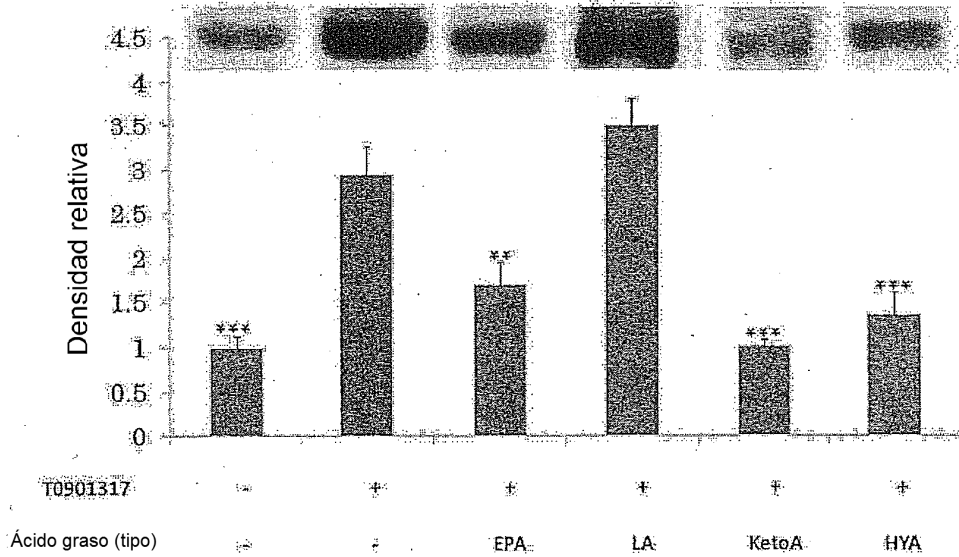


Fig. 10

Influencia sobre la expresión de SREB-1 maduro inducida por el agonista LXR

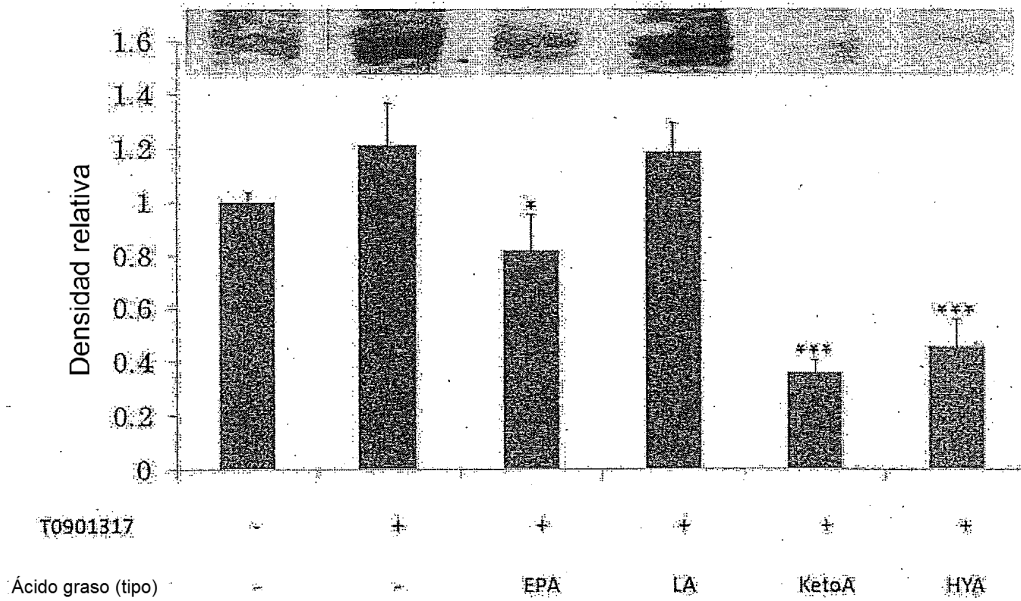


Fig. 11

Influencia sobre la expresión de mRNA de SCD-1 inducida por el agonista LXR

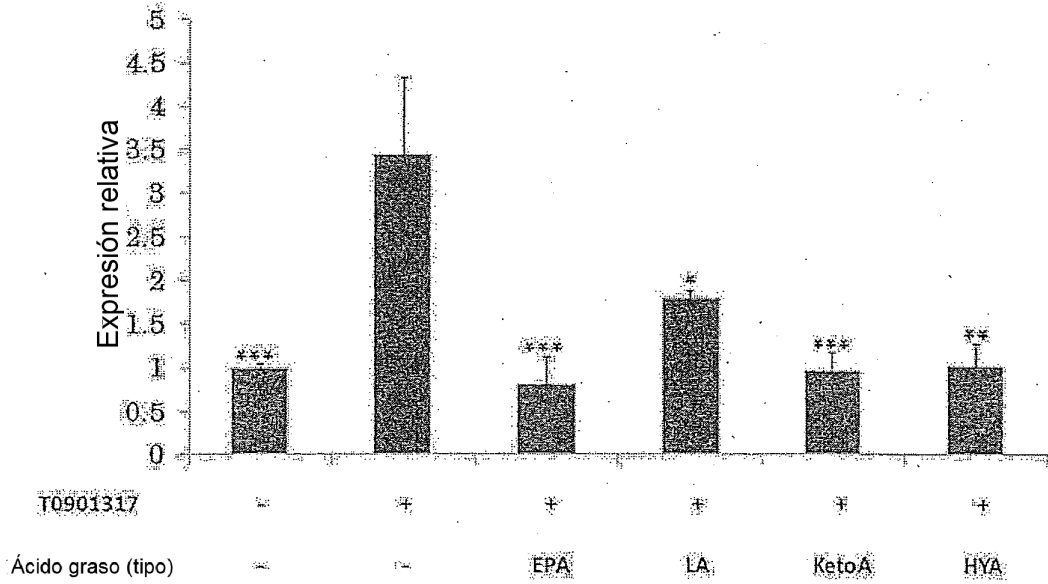


Fig. 12

Influencia sobre la expresión de mRNA de FAS inducida por el agonista LXR

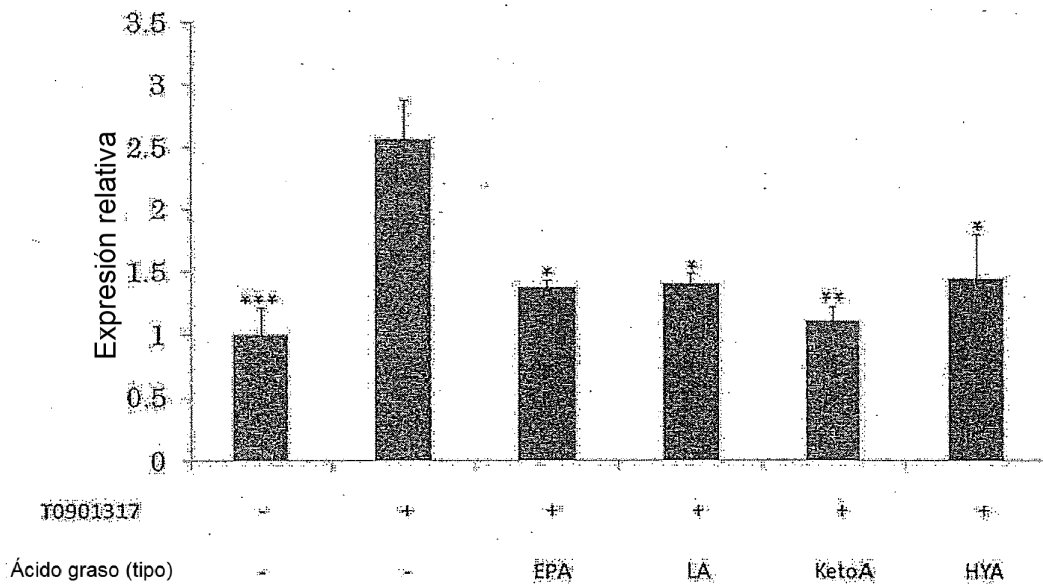


Fig. 13

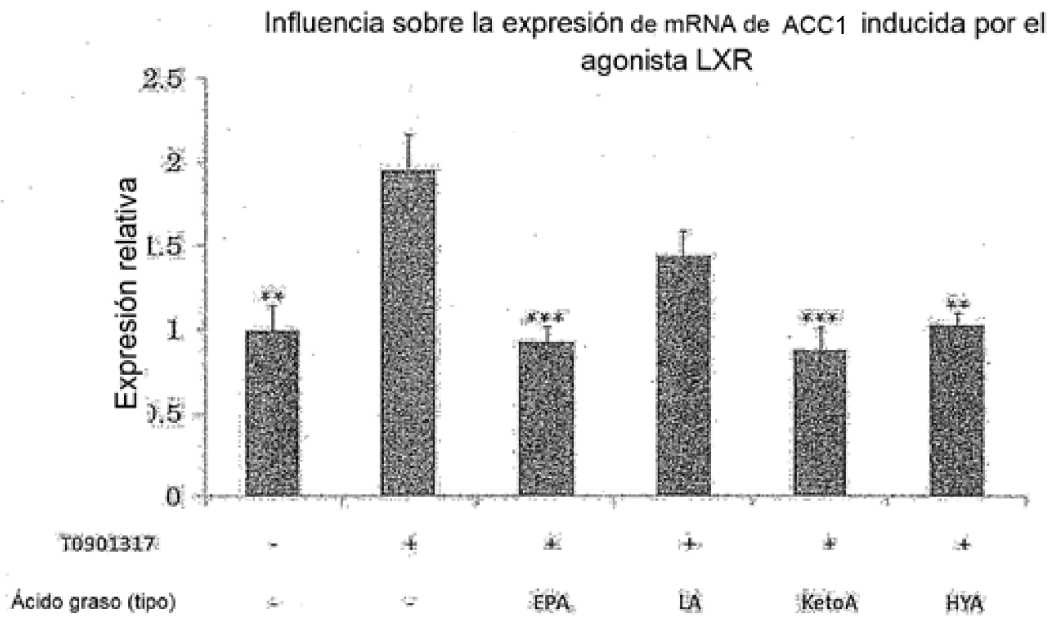


Fig. 14

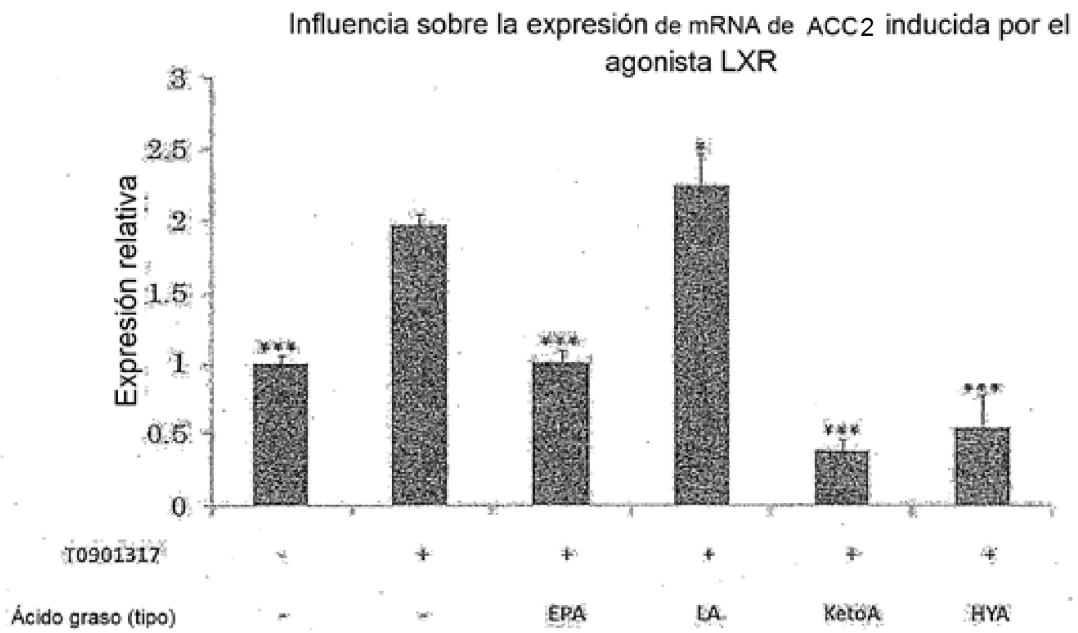


Fig. 15

influencia sobre la acumulación de triacilglicerol por el antagonista LXR

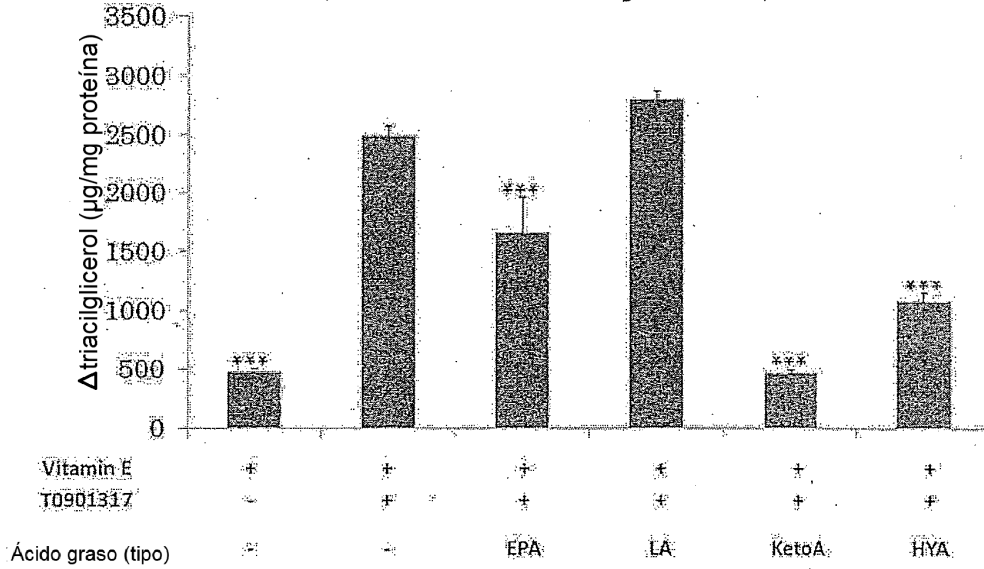


Fig. 16

evaluación de la acción antagonista de LXR por el ensayo de luciferasa

