

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 496**

51 Int. Cl.:

A61K 31/20 (2006.01)
A61K 31/201 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
C07C 59/42 (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: **13.02.2014 PCT/JP2014/053383**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14129384**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2014 E 14754333 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2959897**

54 Título: **Agente protector del tracto intestinal que comprende un ácido graso hidroxilado**

30 Prioridad:

21.02.2013 JP 2013031769

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2020

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 y
YONEJIMA, YASUNORI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 738 496 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 protector del tracto intestinal que comprende un ácido graso hidroxilado

Campo técnico

5 La presente invención hace referencia a un agente protector del tracto intestinal que comprende un ácido graso no saturado hidroxilado. Más particularmente, hace referencia a la mejora de la función de barrera del tracto intestinal con ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico.

Antecedentes de la técnica

10 Las células epiteliales del intestino están en contacto directo con los alimentos, bacterias entéricas, patógenos y similares. No solo funcionan como una barrera física, sino que también tienen un papel importante en la inducción y en la instrucción de respuestas inmunitarias en el intestino y similares. Las células epiteliales del intestino forman una estructura en donde los espacios intercelulares están adheridos por factores relacionados con la unión estrecha múltiple tal como ZO-1, Occludina y Claudina de manera firme. Cuando la expresión de tales factores disminuye y similares, en las células epiteliales del intestino debido a IL-6, TNF- α , insulina y similares, la función de barrera del tracto a veces se ve dañada (documento que no es patente 1). Además, cuando la capa de células epiteliales del
15 intestino se daña por patógenos y similares, se activan los inmunocitos periféricos para reparar la capa epitelial y eliminar las sustancias extrañas.

20 Sin embargo, cuando la respuesta inmunitaria es excesiva, puede haber inflamación en los tejidos intestinales y, como agente terapéutico para reprimir dicha inflamación, se ha informado sobre un agente terapéutico para las enfermedades inflamatorias intestinales, que contiene lactobacilos y similares (documento de patente 1). Como agente terapéutico que reprime la permeación de sustancias alergénicas y similares tomando nota de la permeación de sustancias mediante la unión estrecha y evitando la holgura de la unión estrecha, también se han informado agentes protectores del tracto intestinal que contienen proteína de suero de leche, caseína, albúmina de suero y similares como ingrediente activo y similares (documento de patente 2).

25 Si bien se han informado los agentes protectores del tracto intestinal antes mencionados, se desea desarrollar un nuevo agente protector del tracto intestinal, que se pueda usar para la profilaxis o tratamiento del daño en la función de la barrera del tracto intestinal o para enfermedades causadas por este.

30 Se han informado que los ácidos grasos conjugados representados por ácido linoleico conjugado (CLA, por su sigla en inglés) tienen varias actividades fisiológicas tales como un efecto que mejora el metabolismo lipídico, una acción antiarterioesclerótica, una acción que reduce la grasa corporal y similares (documentos que no son patentes 2-4) y es un lípido funcional que se desea poder aplicar a varios campos de medicamentos, alimentos funcionales y similares. Además, la acción en la protección del tracto intestinal ha atraído la atención y se ha informado la mejora de los síntomas de los pacientes con colitis ulcerosa tales como enfermedad de Crohn y similares, con el ácido linoleico conjugado y similares (<http://www.nimml.org/838/>).

35 El ácido linoleico conjugado como un intermedio del metabolismo de saturación de ácido graso no saturado por lactobacilos. Como un intermedio del metabolismo, por ejemplo, los ácidos grasos hidroxilados tales como ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-octadecanoico y similares, ácidos oxograsos tales como 10-oxo-12-octadecenoico, ácido 10-oxooctadecanoico, ácido 10-oxo-11-octadecenoico. Sin embargo, no hay informes de la acción y el efecto de un intermedio de metabolismo de saturación de ácidos grasos no saturados por lactobacilos en el intestino, en lo que respecta al solicitante.

40 [Lista de documentos]

[documentos de patente]

documento de patente 1: JP-A-2003-073286

documento de patente 2: JP-A-9-241177

45 El documento US 2005/032892 describe un método para tratar un trastorno gastrointestinal, tal como el síndrome de intestino irritable o enfermedad de intestino irritable con una composición que comprende éster de no glicerilo de ácido graso de cadena larga que se selecciona de entre otros ácido dihidroxiesteárico y ácido ricinoleico.

El documento WO 99/16435 describe composiciones farmacéuticas que contienen ácido ricinoleico y su uso en la inflamación enteral, irritabilidad de colon o rectocolitis ulcerativa.

50 El documento WO 2010/117194 describe una composición para proteger la pared del estómago y para prevenir o tratar trastornos gástricos que contienen ácidos grasos tales como ácido ricinoleico.

[documentos que no son patentes]

documento no patente 1: Nusrat A, (2000), Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., vol.279, no.5, p.G851-G857

documento no patente 2: Ha YL, (1987), Carcinogenesis, vol.8, no.12 p.1881-1887

documento no patente 3: Clement Ip, (1991), Cancer Res., (1991), vol.51, p.6118-6124

5 documento no patente 4: Kisun NL, (1994), Atherosclerosis, vol.108, p.19-25

KAMETANI SAEDA ET AL: "Chemical constituents of cape aloe and their synergistic growth-inhibiting effect on Ehrlich ascites tumor cells", BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY MAY 2007, vol. 71, no. 5 de mayo de 2007 (2007-05), páginas 1220-1229, ISSN: El documento 0916-8451 describe el ácido 10-hidroxi-octadecanoico (HYB) como un constituyente de Aloe del Cabo, que muestra un crecimiento significativo inhibiendo los efectos en las células EAT.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Problemas que debe resolver la invención

Un objetivo de la presente invención es presentar un fármaco protector del tracto intestinal, que se puede usar para la profilaxis o el tratamiento del daño en la función de barrera del tracto intestinal o enfermedades causadas por este.

15 Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han realizado estudios intensivos en vista del problema antes mencionado y han encontrado que los ácidos grasos no saturados hidroxilados que tienen 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 10 y un enlace cis doble en la posición 12 tal como ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico que es un intermedio del metabolismo de ácido graso no saturado por lactobacilos, tienen una acción protectora de la barrera del tracto intestinal, una acción supresora de la expresión de la citocina inflamatoria IL-8 y una acción que reduce la patología en el modelo de enteritis.

Por consiguiente, la presente invención es como sigue:

[1] Un ácido graso no saturado hidroxilado que tiene 18 átomos de carbono y que tiene un grupo hidroxilo en la posición 10, en donde el ácido graso no saturado hidroxilado tiene un enlace cis doble en la posición 12, para usar en la profilaxis o mejora de una enfermedad causada por el daño de la función de barrera del tracto intestinal.

[2] El ácido graso no saturado hidroxilado para usar según [1], en donde el ácido graso no saturado es ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico.

[3] El ácido graso no saturado hidroxilado para usar según [1] o [2], en donde la enfermedad causada por el daño en la función de la barrera del tracto intestinal es al menos un tipo de enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal, úlcera y síndrome del intestino irritable.

[4] El ácido graso no saturado hidroxilado para usar según cualquiera de [1] a [3] comprendido en un alimento o en un aditivo de alimento.

[5] El ácido graso no saturado hidroxilado para usar según cualquiera de [1] a [3] comprendido en un pienso o aditivo de pienso.

[6] Un producto farmacéutico que comprende un ácido graso no saturado hidroxilado que tiene 18 átomos de carbono y que tiene un grupo hidroxilo en la posición 10, en donde el ácido graso no saturado hidroxilado tiene un enlace cis doble en la posición 12, para usar en la profilaxis o mejora de una enfermedad causada por el daño de la función de barrera del tracto intestinal.

[7] El producto farmacéutico para usar según [6], en donde el ácido graso no saturado hidroxilado es ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico.

[8] El producto farmacéutico para usar según [6] o [7], en donde la enfermedad causada por el daño en la función de la barrera del tracto intestinal es al menos un tipo de enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal, úlcera y síndrome del intestino irritable.

Efecto de la invención

45 En la presente invención, se ha aclarado que los ácidos grasos no saturados hidroxilados que tienen 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 10 y un enlace cis doble en la posición 12 tal como ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico (en adelante también referido como HYA) tiene una acción protectora de la barrera del tracto intestinal que no se conoce convencionalmente. La presente invención puede proporcionar, según tal acción, un

agente protector del tracto intestinal que contiene el ácido graso. Como el agente se puede usar en varios campos tal como productos farmacéuticos, alimentos, pienso y similares, la presente invención es extremadamente útil en la industria.

Breve descripción de los dibujos

5 En las Figuras solo HYA es según la invención.

La Fig. 1 muestra las fórmulas estructurales de los ácidos grasos usados en los Ejemplos.

La Fig. 2 muestra los resultados del efecto de protección de la barrera del tracto intestinal de los ácidos grasos de prueba HYA, HYB, KetoA, KetoB y KetoC, usando resistencia eléctrica transepitelial (en adelante referida como TER) de la línea celular derivada de cáncer colorrectal humano Caco-2 como un índice. El eje vertical de la Fig. 2A muestra el valor de TER ($\Omega \text{ cm}^2$), y el eje horizontal muestra el tiempo del cultivo. Un pocillo sin la adición del ácido graso de prueba, IFN- γ y TNF- α (indicado como Ninguno en la Fig.), y un pocillo sin la adición de un ácido graso de prueba y al que se le agregó IFN- γ y TNF- α (indicado como (-) en la Fig.) se usaron como un control (en adelante lo mismo también en las Fig. 3 - 8 y 10). La Fig. 2B muestra valores relativos del valor de TER cuando el valor del grupo de control (Ninguno) a 6 h del cultivo en la Fig. 2A es 1. En la Figura, se muestran * en comparación con Ninguno, # en comparación con (-), \$ en comparación con HYA y dos marcas muestran $P < 0.01$ y una marca muestra $P < 0.05$ (los mismo en las Fig. 3 - 8 y 10).

La Fig. 3 muestra los resultados de los efectos de la protección de la barrera del tracto intestinal de HYA y HYB, examinado usando la producción de IL-8 en las células Caco (se midieron los niveles de proteína y genes) como un índice. El eje vertical de la Fig. 3A muestra la cantidad de producción IL-8 (pg/mL). El eje vertical de la Fig. 3B muestra la expresión de ARNm IL-8.

La Fig. 4 muestra los efectos de HYA y HYB en la expresión génica de los factores relacionados con las uniones estrechas.

La Fig. 5 muestra el efecto de la administración de HYA o HYB en los cambios en el curso del tiempo en el peso corporal de ratones de modelo de enteritis inducida con DSS (% de cambio relativo al peso corporal al inicio de la administración de HYA o HYB como 100 %).

La Fig. 6 muestra el efecto de la administración de HYA o HYB en una reducción del peso corporal de ratones de modelo de enteritis inducida por DSS (cantidad de disminución (g) desde el inicio de la administración de HYA o HYB al final de la administración del día 5 de DSS).

La Fig. 7 muestra el efecto de la administración de HYA o HYB en los cambios en el curso del tiempo en los puntajes de heces de los ratones de modelo de enteritis inducida por DSS.

La Fig. 8 muestra el efecto de la administración de HYA o HYB en la longitud del intestino grueso de ratones de modelo de enteritis inducida por DSS.

La Fig. 9 muestra el efecto de la administración de HYA o HYB en el daño celular del intestino grueso de ratones de modelo de enteritis inducida por DSS.

La Fig. 10 muestra el efecto de HYA y HYB en la expresión génica de los factores relacionados con las uniones estrechas en los tejidos del intestino grueso de ratones de modelo de enteritis inducida por DSS.

Descripción de las realizaciones

La presente invención se explica en detalle a continuación. La presente invención proporciona un agente protector del tracto intestinal que contiene ácidos grasos no saturados hidroxilados que tienen 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 10 y un enlace cis doble en la posición 12 tal como ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico (en adelante también referido como "ácido graso hidroxilado de la presente invención").

En la presente invención, "protección del tracto intestinal" significa reparar la función de la barrera del tracto intestinal dañada y/o la mejora de la función de barrera del tracto intestinal. En cuanto al daño, su alcance no es significativo e incluye desde un nivel grave a un nivel leve. La reparación de la función significa llevar un estado anormal al estado original y/o un estado cercano al estado original. La mejora de la función incluye aplicar la función y, en algunos casos, reprimir una disminución en la función también.

En la presente invención, "la (función) de barrera de tracto intestinal" significa físicamente prevenir la permeación de sustancias que no sean moléculas bajas formando una estructura en donde los espacios intracelulares entre las células epiteliales intestinales están adheridas de manera fuerte y estrecha por factores relacionados con las uniones estrechas. Biológicamente, significa la descarga extracorporal de sustancias extrañas a través de un transportador y similares presentes en las células epiteliales intestinales o la defensa de la mucosa intestinal por IgA secretado en la mucosa intestinal después de la estimulación del antígeno.

En la presente invención, la función de barrera del tracto intestinal se puede evaluar mediante un método conocido. Por ejemplo, se pueden confirmar cambios en las heces, cambios en el peso corporal y similares cuando el ácido graso hidroxilado de la presente invención se administra a animales con enteritis transferida por los linfocitos T (modelos animales de enfermedad de Crohn y similares). De manera alternativa, como se describe en los Ejemplos antes mencionados, las células Caco-2 de la línea celular del tracto gastrointestinal humano que se usan ampliamente como modelo epitelial del intestino delgado se pueden estimular externamente por las citocinas tales como TNF- α y/o IFN- γ para dañar las células, se administra el ácido graso hidroxilado de la presente invención y se mide el valor de resistencia eléctrica transepitelial (TER), el nivel de expresión de citocinas tales como IL-8, o nivel de expresión del factor relacionado con la unión estrecha y similares. Sin embargo, estos métodos no son limitantes. Los factores relacionados con la unión estrecha también incluye factores desconocidos y/o conocidos, tales como ZO-1, Ocludina, Claudina, MLCK (cinasa de la cadena ligera de miosina) y similares. El nivel de expresión del factor se puede medir mediante un método conocido como PCR en tiempo real, método ELISA y similares.

En la presente invención, la "profilaxis o mejora de daño en la función de la barrera de tracto intestinal" que proporciona el efecto de "proteger el tracto intestinal" significa que la evaluación de la función de la barrera del tracto por al menos uno de los métodos antes mencionados se mejora significativamente mediante la administración del ácido graso hidroxilado de prueba.

Los ejemplos más específicos incluyen ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico (HYA), ácido 10-hidroxi-cis-12,cis-15-octadecadienoico (en adelante también referido como " α HYA"), ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-12-octadecadienoico (en adelante también referido como " γ HYA"), ácido 10-hidroxi-cis-6,cis-12,cis-15-octadecatrienoico (en adelante también referido como "sHYA"), se prefiere particularmente HYA. En la presente también se hace referencia pero no según la invención a ácido 10,12-dihidroxi-octadecanoico (en adelante también referido como "rHYA"), ácido 10-hidroxi-octadecanoico (en adelante también referido como "HYB"), ácido 10-hidroxi-cis-15-octadecenoico (en adelante también referido como " α HYB"), ácido 10-hidroxi-cis-6-octadecenoico (en adelante también referido como " γ HYB"), ácido 10-hidroxi-cis-6,cis-15-octadecadienoico (en adelante también referido como "sHYB"), ácido 12-hidroxi-octadecanoico (en adelante también referido como "rHYB"), ácido ricinoleico (en adelante también referido como "RA"), ácido 10-hidroxi-trans-11-octadecenoico (en adelante también referido como "HYC"), ácido 10-hidroxi-trans-11,cis-15-octadecadienoico (en adelante también referido como " α HYC"), ácido 10-hidroxi-cis-6,trans-11-octadecadienoico (en adelante también referido como " γ HYC"), ácido 10-hidroxi-cis-6,trans-11,cis-15-octadecatrienoico (en adelante también referido como "sHYC") y similares.

Una parte del ácido graso del "ácido graso hidroxilado de la presente invención" se puede obtener usando el ácido graso oxo como material de partida o intermedio. En la presente memoria descriptiva, el ácido graso oxo se refiere a un ácido graso oxo que tiene 18 átomos de carbono y un grupo carbonilo en la posición 10 (en adelante a veces abreviado como "10-ácido graso oxo")

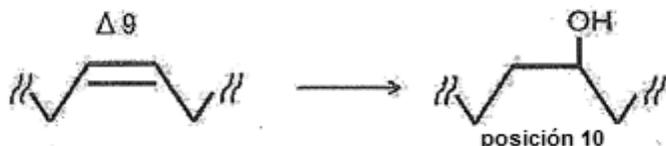
El ácido graso 10-hidroxi,trans-11 y 10-hidroxi,11,12-ácido graso saturado antes mencionados se pueden producir mediante una reacción deshidrogenasa (las reacciones antes mencionadas 5, 6) usando un ácido graso oxo que tiene 18 átomos de carbono y que tiene un grupo carbonilo en la posición 10 y un enlace trans doble en la posición 11 (a veces en adelante se abrevia como "ácido graso 10-oxo,trans-11") y un ácido graso oxo que tiene 18 átomos de carbono y que tiene un grupo carbonilo en la posición 10 y libre de un enlace doble en las posiciones 11 y 12 (en adelante a veces abreviado como "ácido graso saturado 10-oxo,11,12"), respectivamente, como materiales de partida.

El ácido graso 10-oxo,trans-11 se puede producir a partir de un ácido graso hidroxilado que tiene 18 átomos de carbono y que tiene un grupo carbonilo en la posición 10 y un enlace cis doble en la posición 12 (en adelante a veces abreviado como "ácido graso 10-oxo,cis-12") por una reacción de isomerasa (la reacción antes mencionada 3). El ácido graso saturado 10-oxo,11,12 se puede producir a partir de ácido graso 10-oxo,trans-11 mediante una reacción de enzima saturada (la reacción 4 mencionada a continuación).

Más específicamente, como el material de partida de producción o el intermedio del ácido graso hidroxilado de la presente invención, se pueden usar los ácidos grasos 10-oxo,cis-12 tales como ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico (también referido como "KetoA"). También referido en la presente pero no según la invención se pueden usar ácido 10-oxo cis-12,cis-15-octadecadienoico (en adelante también referido como " α KetoA"), ácido 10-oxo-cis-6,cis-12-octadecadienoico (en adelante también referido como " γ KetoA"), ácido 10-oxo-cis-6,cis-12,cis-15-octadecatrienoico (en adelante también referido como "sKetoA") y similares, ácidos grasos saturados 10-oxo,11,12 tales como ácido 10-oxo octadecanoico (también referido como "KetoB"), ácido 10-oxo-cis-6-octadecenoico (en adelante también referido como " γ KetoB"), ácido 10-oxo-cis-15-octadecenoico (en adelante también referido como " α KetoB"), ácido 10-oxo-cis-6,cis-15-octadecadienoico (en adelante también referido como "sKetoB") y similares, ácidos grasos 10-oxo,trans-11 tales como ácido 10-oxo-trans-11-octadecenoico (también referido como "KetoC"), ácido 10-oxo-cis-6,trans-11-octadecadienoico (en adelante también referido como " γ KetoC"), ácido 10-oxo-trans-11,cis-15-octadecadienoico (en adelante también referido como " α KetoC"), ácido 10-oxo-cis-6,trans-11,cis-15-octadecatrienoico (en adelante también referido como "sKetoC") y similares.

El ácido graso hidroxilado de la presente invención se puede preparar mediante un método descrito en la solicitud de patente japonesa n.º 2012-108928, y HYA se puede preparar por la referencia a Biochemical and Biophysical Research Communications 416 (2011) p.188-193 y similares. Como RA, rHYB y similares, se pueden usar productos comercialmente disponibles.

(reacción 1)



El ácido graso 10-oxo se produce a partir de un ácido graso no saturado que tiene 18 átomos de carbono y un enlace cis doble en la posición 9 (en adelante a veces abreviado como "ácido graso no saturado cis-9") mediante una reacción de dos pasos. En la primera reacción (reacción 1), el ácido graso hidroxilado 10 se produce a partir del ácido graso no saturado cis-9 mediante una reacción de hidrataza.

El sustrato en la "reacción 1" no está particularmente limitado mientras sea un ácido graso no saturado que tiene 18 átomos de carbono y un enlace cis doble en la posición 9, y los ejemplos de esto incluyen ácido monoenoico (18:1), ácido dienoico (18:2), ácido trienoico (18:3), ácido tetraenoico (18:4), ácido pentaenoico (18:5) y similares. Se prefieren más el ácido dienoico, ácido trienoico y ácido tetraenoico, y particularmente se prefieren los ácidos dienoicos y ácidos trienoicos. En la presente memoria descriptiva, "ácido graso" comprende no solo ácidos libres sino también la forma éster, sal con compuestos básicos y similares.

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

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

Los ejemplos ácidos trienoicos incluyen ácido α -linolenico, ácido γ -linolenico y similares.

Los ejemplos de ácido tetraenoico incluyen ácido estearidónico y similares.

Mientras que la hidrataza que cataliza la reacción 1 no está particularmente limitada siempre que sea una enzima capaz de usar el ácido graso no saturado cis-9 antes mencionado como un sustrato y sea capaz de convertirse a ácido graso hidroxilado 10, por ejemplo, se prefiere el ácido graso derivado de lactobacilos - hidrataza (CLA-HY). Se prefiere más el CLA-HY derivado de *Lactobacillus plantarum* y se prefiere particularmente el CLA-HY derivado de la cepa *L. plantarum* FERM BP-10549. CLA-HY se puede obtener mediante el método descrito en JP-A-2007-259712o similares.

La cantidad de hidrataza a agregar 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 1 y, por ejemplo, se pueden usar NADH, NADPH, FADH₂ y similares. La concentración de adición puede ser cualquiera siempre que la reacción de hidratación se haga de manera eficiente. Es preferible 0.001 - 20 mM, más preferiblemente 0.01 - 10 mM.

Además, se puede usar un "activador" para la reacción enzimática y, por ejemplo, se pueden mencionar uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en molibdato de potasio, anhídrido de molibdato de disodio (VI), dihidrato de molibdato de sodio (VI), ortovanadato de sodio (V), metavanadato de sodio (V), tungstato de potasio (VI), anhídrido de tungstato de sodio (VI) y dihidrato de tungstato de sodio (VI). La concentración de la adición de este puede ser cualquiera siempre que la reacción de hidratación se haga de manera eficiente. Es preferible 0.1 - 20 mM, más preferiblemente 1 - 10 mM.

Por ejemplo, se puede obtener rHYA agregando amortiguador de fosfato de potasio (pH 6.5) 100 mM que contiene una enzima de hidratación (peso corporal de la bacteria húmeda 0.7 g) expresada en *Escherichia coli*, NADH (33 mg), FAD (0.8 mg), ácido ricinoleico (1 g), BSA (0.2 g) a RA a una cantidad total de 10 ml, y haciendo una reacción de agitación de manera anaeróbica a 37 °C por 63 h, 225 rpm.

Por otro lado, se puede obtener el ácido graso hidroxilado 12, por ejemplo, mediante hidrólisis del aceite natural que contiene, como componente principal, el éster triglicérido que contiene ácido graso hidroxilado 12 como un ácido graso constituyente. Por ejemplo, se puede obtener RA mediante hidrólisis de aceite de ricino y se puede obtener rHYB mediante hidrólisis de aceite de ricino hidrogenado.

(reacción 2)



En la segunda reacción (reacción 2), el ácido graso 10-oxo se produce de ácido graso hidroxilado 10 mediante una reacción deshidrogenasa o oxidación química usando ácido crómico.

5 Si bien la deshidrogenasa que cataliza la reacción 2 no está limitada particularmente siempre que sea una enzima capaz de usar el ácido graso hidroxilado 10 como un sustrato y capaz de convertirse a ácido graso 10-oxo, por ejemplo, se prefiere el ácido graso hidroxilado derivado de lactobacilo - deshidrogenasa (CLA-DH). Se prefiere más el CLA-DH derivado de *Lactobacillus plantarum* y se prefiere particularmente el CLA-DH derivado de la cepa *L. plantarum* FERM BP-10549. CLA-DH se puede obtener mediante el método descrito en JP-A-2007-259712o similares.

10 La cantidad de deshidrogenasa a agregar es, por ejemplo, 0.001 - 10 mg/ml, preferiblemente 0.1 - 5 mg/ml, más preferiblemente 0.2 - 2 mg/ml.

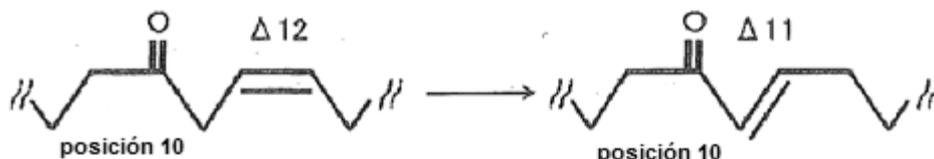
Se puede usar un "cofactor" para la reacción 2 y, por ejemplo, NAD, NADP, FAD y similares. La concentración de adición puede ser cualquiera siempre que la reacción de oxidación se haga de manera eficiente. Es preferible 0.001 - 20 mM, más preferiblemente 0.01 - 10 mM.

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

La segunda reacción se puede realizar mediante oxidación química.

Como la oxidación química, se pueden mencionar los métodos conocidos, por ejemplo, la oxidación ácida crómica, preferiblemente la oxidación de Jones y similares. Como el ácido crómico, se pueden usar sales y complejos tales como ácido crómico anhidro CrO_3 , ácido crómico H_2CrO_4 y ácido dicrómico $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

(reacción 3)



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

25 El "sustrato" de la reacción 3 no está particularmente limitado siempre que sea un ácido graso 10-oxo,cis-12 inducido a partir de un ácido graso no saturado que tiene 18 átomos de carbono y un enlace cis doble en las posiciones 9 y 12, mediante las reacciones 1 y 2 antes mencionadas. Los ejemplos de estos incluyen KetoA inducido de ácido linoleico, α KetoA inducido de ácido α -linolenico, γ KetoA inducido de ácido γ -linolenico, sKetoA inducido de ácido estearidónico y similares. El sustrato se puede obtener mediante un método que no sea según las reacciones 1 y 2.

30 Si bien la isomerasa que cataliza la reacción 3 no está particularmente limitada mientras sea una enzima capaz de usar el ácido graso 10-oxo,cis-12 antes mencionado como un sustrato y sea capaz de convertirse a ácido graso 10-oxo,trans-11, por ejemplo, se prefiere el ácido graso oxo derivado de lactobacilos - isomerasa (CLA-DC). Se prefiere más el CLA-DC derivado de *Lactobacillus plantarum* y se prefiere particularmente el CLA-DC derivado de la cepa *L. plantarum* FERM BP-10549. CLA-DC se puede obtener mediante el método descrito en JP-A-2007-259712, o similares.

35 La cantidad de isomerasa a agregar 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 "activador" para la reacción de isomerasa y, por ejemplo, se pueden usar compuestos similares a los indicados como ejemplos en la reacción 1 antes mencionada a una concentración de adición similar.

(reacción 4)

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

- 5 El "sustrato" de la reacción 4 no está particularmente limitado siempre que sea un ácido graso 10-oxo,trans-11 producido por la reacción 3 antes mencionada. Los ejemplos de estos 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 y similares. El sustrato se puede obtener mediante un método que no sea la reacción 3.

- 10 Si bien la saturasa que cataliza la reacción 4 no está particularmente limitada mientras sea una enzima capaz de usar el ácido graso 10-oxo,trans-11 antes mencionado como un sustrato y capaz de convertirse a el ácido graso saturado 10-oxo,11,12, por ejemplo, se prefiere el ácido graso oxo - enona (CLA-ER) derivado de lactobacilos. Se prefiere más el CLA-ER derivado de *Lactobacillus plantarum* y se prefiere particularmente el CLA-ER derivado de la cepa *L. plantarum* FERM BP-10549.

La enzima "CLA-ER" antes mencionada es

- 15 (a) una proteína de enzima que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2,
 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 donde uno o más aminoácidos se eliminan y/o sustituyen y/o introducen y/o agregan, y que tienen una actividad enzimática de catalizar la reacción 4 antes mencionada, o
 20 (c) una proteína codificada por una secuencia base que se hibrida a un ácido nucleico que consiste en una secuencia de cadena complementaria de la secuencia base mostrada en la SEQ ID NO: 1 en condiciones rigurosas y con una actividad enzimática para catalizar la reacción 4 antes mencionada.

- Los ejemplos más específicos de (b) antes mencionado incluyen una proteína que contiene (i) una secuencia de aminoácidos que es la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2, donde 1 - 20, preferiblemente 1 - 10, más preferiblemente 1 - varios (5, 4, 3 o 2) aminoácidos se eliminan, (ii) una secuencia de aminoácidos que es la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2, donde 1 - 20, preferiblemente 1 - 10, más preferiblemente 1 - varios (5, 4, 3 o 2) aminoácidos se agregan, (iii) una secuencia de aminoácidos que es la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2, donde 1 - 20, preferiblemente 1 - 10, más preferiblemente 1 - 25 varios (5, 4, 3 o 2) aminoácidos se introducen, (iv) una secuencia de aminoácidos que es la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2, donde 1 - 20, preferiblemente 1 - 10, más preferiblemente 1 - 30 aminoácidos se sustituyen por otro aminoácido, o (v) una secuencia de aminoácidos obtenida mediante su combinación. Cuando los 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, etc.) se sustituyen entre sí y similares, hay una mayor cantidad de sustituciones y similares posibles.

- 35 Cuando los aminoácidos se eliminan, se sustituyen o se introducen como se mencionó anteriormente, las posiciones de eliminación, sustitución e introducción son están particularmente limitadas siempre que se mantenga la actividad enzimática antes mencionada.

- En (c) antes mencionado, las "condiciones rigurosas" son condiciones mediante las cuales las secuencias de nucleótidos que tienen una identidad alta, por ejemplo, identidad de 70, 80, 90, 95 o 99% o superior, se hibridan entre sí y las secuencias de nucleótidos que tienen una identidad menor que no se hibridan; específicamente, condiciones de lavar una, más preferiblemente 2 - 3 veces, en la concentración de sal y temperatura que corresponde a aquellas en las condiciones de lavado de la hibridación general de Southern (60 °C, 1xSSC, 0.1% SDS, preferiblemente, 40 0.1xSSC, 0.1% SDS, más preferiblemente, 68 °C, 0.1xSSC, 0.1% SDS) y similares.

- CLA-ER se puede aislar de, por ejemplo, el hongo y el medio de cultivo de la cepa de *L. plantarum* FERM BP-10549, por ejemplo, mediante el uso de la actividad enzimática que cataliza la reacción 4 antes mencionada como un índice. De manera alternativa, también se puede producir mediante la recombinación de la secuencia base total de la región codificante de CLA-ER basada en la información de la secuencia base mostrada en la SEQ ID NO: 45

1, o el diseño de un cebador capaz de amplificar el segmento del gen CLA-ER que contiene la región codificante, realizando PCR usando el ADNc o ADN de genoma preparado a partir de la cepa antes mencionada como una plantilla, clonando el fragmento de amplificación obtenido a un vector de expresión adecuado e introduciéndolo en una célula hospedadora, y cultivando la célula.

5 Como un vector con un ácido nucleico que codifica el CLA-ER antes mencionado, uno adecuado para que una célula hospedadora se introduzca con el vector se puede seleccionar de manera adecuada según el objeto (p. ej., expresión de proteínas) y se puede usar. El vector de expresión puede contener un promotor adecuado, una señal de terminación de transcripción y un gen marcador de selección (gen de resistencia al fármaco, gen que complementa la mutación auxotrófica, etc.). Además, puede contener una secuencia que codifica una secuencias de etiquetas útiles para la separación y purificación de la proteína expresada y similares. De manera alternativa, el vector se puede incorporar en el genoma de una célula hospedadora objetivo. El vector se puede introducir en una célula hospedadora objetivo mediante un método de transformación conocido tal como un método de células competentes, un método de protoplastos, un método de coprecipitación de fosfato de calcio y similares.

15 La "célula hospedadora" antes mencionada puede ser cualquier célula siempre que pueda expresar un vector que contiene un ácido nucleico que codifica el CLA-ER antes mencionado y se pueden mencionar bacterias, levaduras, hongos, células eucariotas superiores y similares. Los ejemplos de bacterias incluyen bacterias gram positivas, tales como bacilos, Estreptomicina y similares y bacterias gram negativas, tales como Escherichia coli y similares. Una célula recombinante introducida con un vector que contiene un ácido nucleico que codifica CLA-ER se puede cultivar mediante un método conocido que es adecuado para la célula hospedadora.

20 La "purificación" de CLA-ER antes mencionado se puede hacer mediante un método conocido, por ejemplo, los hongos recolectados mediante la centrifugación y similares se rompen con ultrasonido o perlas de vidrio y similares, los sólidos tales como los residuos celulares se eliminan mediante centrifugación y similares, para proporcionar una solución enzimática bruta, que se somete a un método de precipitación salina usando sulfato de amonio, sulfato de sodio y similares, cromatografías tales como cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de filtración de gel, cromatografía por afinidad y similares, electroforesis en gel y similares.

La cantidad de saturasa a agregar es, por ejemplo, 0.001 - 10 mg/ml, preferiblemente 0.1 - 5 mg/ml, más preferiblemente 0.2 - 2 mg/ml.

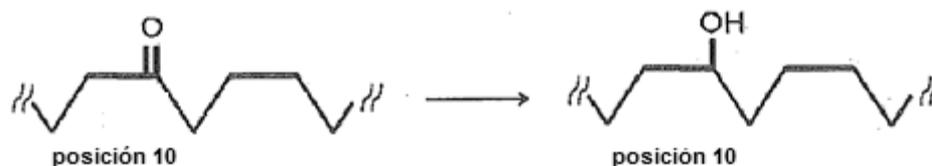
30 Se puede usar un "cofactor" para la reacción 4 y por ejemplo, se puede usar NADH y similares. La concentración de adición puede ser cualquiera siempre que la reacción de oxidación se haga de manera eficiente. Es preferible 0.001 - 20 mM, más preferiblemente 0.01 - 10 mM.

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

(reacción 5)



(reacción 6)



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

El "sustrato" de la reacción 5 no está particularmente limitado siempre que sea un ácido graso 10-oxo,trans-11 producido por la reacción 3 antes mencionada. Los ejemplos de estos 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 y similares. El sustrato se puede obtener mediante un método que no sea la reacción 3.

5 Por el otro lado, el "sustrato" de la reacción 6 no está particularmente limitado siempre que sea un ácido graso saturado 10-oxo,trans-11,12 producido por la reacción 4 antes mencionada. Los ejemplos de estos incluyen KetoB inducido a partir de 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 se puede obtener mediante un método que no sea la reacción 4.

10 Si bien la deshidrogenasa que cataliza la reacción 5 o la reacción 6 no está particularmente limitada siempre que la enzima sea capaz de usar un ácido graso 10-oxo,trans-11 o ácido graso saturado 10-oxo,11,12 como un sustrato y capaz de convertirse a un ácido graso 10-hidroxi,trans-11 o ácido graso saturado 10-hidroxi,11,12, por ejemplo, ácido graso hidroxilado derivado de lactobacilos - deshidrogenasa (CLA-DH) es preferible. Se prefiere más el CLA-DH derivado de Lactobacillus plantarum y se prefiere particularmente el CLA-DH derivado de la cepa L. plantarum FERM BP-10549. Si bien el CLA-DH cataliza la reacción de oxidación en la reacción 2 antes mencionada, también puede catalizar la reacción de reducción en la reacción 5 o la reacción 6 como una reacción inversa.

15 La cantidad de deshidrogenasa a agregar es, por ejemplo, 0.001 - 10 mg/ml, preferiblemente 0.1 - 5 mg/ml, más preferiblemente 0.2 - 2 mg/ml.

20 Se puede usar un "cofactor" para la reacción 5 y la reacción 6 y, por ejemplo, se pueden usar NADH, NADPH, FADH₂ y similares. La concentración de adición puede ser cualquiera siempre que la reacción de reducción se haga de manera eficiente. Es preferible 0.001 - 20 mM, más preferiblemente 0.01 - 10 mM.

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

25 En lo que se mencionó anteriormente, cada reacción, las enzimas (hidratasa, deshidrogenasa, isomerasa, enzima de saturación) están sujetas al sistema de reacción en la forma de células recombinantes (p. ej., Escherichia coli, Bacillus subtilis, levadura, célula de insecto, célula animal, etc.) introducida con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que lo codifica. En este caso, la reacción también se puede hacer cultivando las células en un medio líquido adecuado para el cultivo de las células y agregado con un sustrato y, cuando sea necesario, un cofactor y un activador. Además, cualquiera de las enzimas antes mencionadas puede ser una purificada o una purificada de manera bruta. De manera alternativa, la hidratasa se puede expresar en los hongos como Escherichia coli y similares y se puede usar el hongo o el medio de cultivo de este. Además, la enzima puede ser de un tipo libre, o inmovilizada por varios portadores.

30 El agente protector del tracto intestinal que comprende ácido graso hidroxilado de la presente invención se puede aplicar para el daño de la función de barrera del tracto intestinal o las enfermedades causadas por esta. Los ejemplos de la enfermedad causados por el daño de la función de la barrera de tracto intestinal incluyen, pero no se limitan a, enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa como ejemplos representativos), úlcera y patología de síndrome de intestino irritable.

Los ejemplos de la causa del daño de la función de barrera del tracto intestinal incluyen, pero no se limitan a, estrés, causas quirúrgicas tales como la operación y similares, drogas, toxinas y similares.

40 El agente protector del tracto intestinal de la presente invención se puede usar para la profilaxis o tratamiento de enfermedades causadas por el daño de la función de barrera del tracto intestinal en humanos, o animales de sangre caliente que no sean humanos (p. ej., perros, gatos, ratones, ratas, hámsters, cobayos, conejos, chanchos, bovinos, gallinas, periquitos, miná religioso, cabras, caballos, ovejas, monos, etc.) administrando el agente a ellos.

Se puede usar un agente protector del tracto intestinal que contiene el ácido graso hidroxilado de la presente invención como, por ejemplo, un producto farmacéutico, un alimento, un pienso y similares, o agregando el agente a estos.

45 El formulario de dosificación del producto farmacéutico incluye dispersión, gránulos, píldoras, cápsulas blandas, cápsulas duras, comprimidos, comprimidos masticables, comprimidos de integración rápida, jarabes, líquidos, suspensiones, supositorios, ungüentos, cremas, geles, adhesivos, inhaladores, inyecciones y similares. Una preparación de estos se hace según un método convencional. Como el ácido graso hidroxilado y similares son poco solubles en agua, se disuelven en un solvente orgánico no hidrofílico tal como un aceite vegetal, aceite animal y similares o dispersado o emulsionado en una solución acuosa junto con un emulsionante, un agente dispersante, un tensoactivo y similares mediante un homogeneizador (homogeneizador de presión alta) y se usan.

55 Los ejemplos de aditivos que se pueden usar para la 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 res, aceite de sardinas y similares, polialcoholes tales como polietilenglicol, propilenglicol, glicerol, sorbitol y similares, tensoactivos tales como éster de sorbitán de ácido graso, éster de sacarosa de ácido graso, éster de ácido graso de glicerina, éster de poliglicerol de ácido graso y similares, excipientes tales como agua purificada, lactosa, almidón, celulosa cristalina, D-

manitol, lecitina, goma arábica, solución de sorbitol, solución de carbohidrato y similares, endulzante, colorante, ajustador de pH, varios aminoácidos y similares. Una preparación líquida se puede disolver o suspender en agua u otro medio adecuado cuando está en uso. Además, los comprimidos y gránulos se pueden recubrir con un método bien conocido.

- 5 Para la administración, se prefiere en forma de inyección, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intraperióstica, sublingual, orales y similares y se prefiere particularmente la administración intravenosa o intraperitoneal. La administración intravenosa puede ser administración en gotas y administración en forma de bolo.

- 10 Cuando el agente protector del tracto intestinal de la presente invención se usa como un alimento o aditivo de alimento, la forma del alimento no está particularmente limitada siempre que permita la ingestión oral, tal como solución, suspensión, polvo, artículo sólido y similares. Los ejemplos específicos incluyen suplementos (polvo, gránulos, cápsulas blandas, cápsulas duras, comprimidos, comprimido masticable, comprimido de integración rápida, jarabe, líquido, etc.), bebidas (bebidas ácidas carbonatadas, bebidas de ácido láctico, bebidas deportivas, bebidas de jugos de frutas, bebidas vegetales, bebidas de soja, bebidas de café, bebidas de té, bebidas de polvo, bebidas concentradas, bebidas nutritivas, bebidas alcohólicas, etc.) golosinas (caramelos de goma, gelatina, goma de mascar, chocolate, galletitas, caramelos, golosinas japonesas, refrigerios, etc.) comida instantánea (pasta instantánea, alimento de retorta, alimentos en lata, para microondas, sopa instantánea, sopa de miso, alimentos liofilizados, etc.) aceites, grasas y alimentos de aceite (mayonesa, aderezo, manteca, crema, margarina, etc.), productos de polvo de trigo (pan, pasta, fideos, mezcla de torta, migajas de pan, etc.), aderezo (salsa, aderezo de tomate procesado, condimentos, mezclas para cocinar, sopas, etc.), productos de carne procesada (carne, salchichas, etc.).

- 15 Los alimentos antes mencionados pueden contener, cuando sea 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, cinc, hierro, sodio, potasio, selenio, etc.), nutrientes, fibras, agentes dispersantes, estabilizadores tales como emulsionantes y similares, endulzantes, componentes de sabor (ácido cítrico, ácido málico, etc.), saborizantes, jalea real, propóleo, agárlicos y similares.

25 Cuando el agente protector del tracto intestinal de la presente invención se usa como un pienso o aditivo de pienso, el pienso es, por ejemplo, alimento para mascotas, aditivos de pienso para el ganado o la acuicultura y similares.

Solo un tipo del ácido graso hidroxilado de la presente invención se puede mezclar con el producto farmacéutico, alimento, pienso y similares de la presente invención o se pueden usar dos o más tipos de estos combinados.

- 30 La dosis del producto farmacéutico de la presente invención o la cantidad de ingestión de alimento de la presente invención se puede determinar de manera adecuada según la edad y el peso corporal de los pacientes o quienes la ingieran, los síntomas, tiempo de administración, forma de dosificación, método de administración, combinación de medicamentos y similares. Por ejemplo, cuando el producto farmacéutico de la presente invención se administra por vía oral, la cantidad total del ácido graso hidroxilado de la presente invención como ingrediente activo es de 0.02 - 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente 0.2 - 50 mg/kg de peso corporal, por día para un adulto, o 0.002 mg - 50 mg/kg de peso corporal, preferiblemente 0.02 - 50 mg/kg de peso corporal, mediante administración parenteral, que se puede administrar una vez al día o en varias partes (2 - 5) por día. Cuando se ingiere como alimento, se puede agregar a un alimento de manera que la cantidad de ingestión total del ácido graso hidroxilado de la presente invención como ingrediente activo sea de 1 - 6000 mg, preferiblemente 10 - 3000 mg, por día por adulto. La cantidad de ingestión del pienso de la presente invención se puede determinar adecuadamente de acuerdo con la cantidad de ingestión antes mencionada del alimento y la dosis antes mencionada del producto farmacéutico.

La presente invención se explica en más detalle en lo que sigue con referencia a los Ejemplos. Los ejemplos son solo ejemplificaciones de la presente invención.

Ejemplos

45 Células y reactivos

Células Caco-2: Se usaron ATCC con n.º de acceso HTB-37, después de 40 - 60 pasajes.

medio: Medio Eagle modificado de Dulbecco con suero fetal bovino al 10 %, aminoácido no esencial al 1 %, penicilina 100 IU/mL, estreptomycin 100 µg/mL, y gentamicina 50 µg/mL (ambos medios y aditivos fabricados por Life Technologies)

50 Preparación de células Caco-2

- Las células caco-2 se colocaron en un matraz de cultivo tisular de 75 cm² y se cultivaron a alrededor del 80 % de confluencia a 37 °C. Las células se inocularon en un transwell de 12 pocillos (cámara de cultivo celular Transwell (marca registrada) (membrana permeable, diámetro de 12 mm, tamaño del poro de 0.4 µm) a una concentración de 2x10⁵ células/cm², y cultivado a 37°C durante 14 días en una atmósfera de 5% CO₂ para proporcionar células monocapa Caco-2. Además, para verificar si la unión estrecha está suficientemente formada o no, se usaron células

monocapa Caco-2 con una resistencia eléctrica transepitelial (TER) de alrededor de 900 - 1,000Ω cm² o más para el ensayo. Cada pocillo se colocó en una placa de grupos, y se llenó con un medio de cultivo lateral externo (lado basal, 1.5 mL) y un medio de cultivo lateral interno (lado luminal, 0.5 mL). El medio se intercambiaba con un medio fresco cada 48 horas y se cultivaron las células monocapa Caco-2.

5 Adición de agente de estimulación y solución de ácido graso de prueba

Al medio de cultivo lateral interior de cada pozo de las células monocapa Caco-2 preparadas por el método antes mencionado se agregó una solución de HYA, HYB, KetoA, KetoB o KetoC (cada concentración de 50 μM, 500 μL), y la mezcla se cultivó por 24 h. Luego, se agregó IFN-γ al medio de cultivo lateral externo a una concentración final de 50 ng/mL y, después del cultivo por 24 h, se retiró el medio lateral externo. Se agregó TNF-α a 50 ng/mL, la mezcla se cultivó adicionalmente durante 6 h, y se evaluó el efecto de protección de barrera del tracto intestinal antes mencionado. Además, se prepararon un pocillo sin el ácido graso de prueba y se agregó IFN-γ y TNF-α, y un pocillo libre de solución de ácido graso de prueba, IFN-γ y TNF-α (en adelante también referido como control).

[Ejemplo 1]

Comparación del efecto de protección de barrera del tracto intestinal

Se comparó el efecto de protección de la barrera del tracto intestinal con la solución de ácido graso de prueba usando el valor de resistencia eléctrica transepitelial (TER) (Q·cm²) y la producción de IL-8 (pg/mL) como índices. Con un sistema de medición de valor de resistencia (Millicell-ERS, Millipore) usando un electrodo Ag/AgCl, se midió cada valor de TER 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 hr después de la adición de TNF-α. Además, se calculó el valor relativo de TER (TER relativo) dividiendo el valor de TER de cada pocillo con el de control. En cuanto a la cantidad de producción de IL-8, el medio de cultivo lateral externo obtenido después del cultivo se sometió al método de ELISA y el valor se midió 6 h después de la adición de TNF-α.

Los resultados de la medición del valor relativo de TER se muestran en las Fig. 2A y B. Las figuras muestran el error promedio ± estándar (SE) (lo mismo en los siguientes resultados de medición). La adición de IFN-γ y TNF-α al sistema de cultivo celular monocapa de Caco-2 redujo el valor relativo de TER. Cuando se agregó una solución de ácido graso de prueba, solo HYA mostró la supresión de una disminución en el valor relativo de TER. Los resultados de la medición de IL-8 se muestran en la Fig. 3A. La adición de IFN-γ and TNF-α al sistema de cultivo celular monocapa de Caco-2a aumentó la concentración de IL-8 en el medio de cultivo. Cuando se agregó HYA y HYB, se observó la supresión de la producción de IL-8.

[Ejemplo 2]

30 Efecto de HYA en la expresión génica del factor relacionado con la unión estrecha

De la misma manera que en el Ejemplo antes mencionado, se agregó HYA y, 6 h después, las células monocapa Caco-2 se lavaron 3 veces con PBS, y se extrajo el ARN con TRIzol (marca registrada) (fabricado por Life Technologies) a partir de células. Se hizo la transcripción inversa del ARN usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Life Technologies) para proporcionar un análisis de ADNc y de PCR en tiempo real usando el kit KAPA SYBR FAST ABI PRISM qPCR (Kapa Biosystems). Como el cebador, se usaron pares de oligoADN de secuencias de nucleótidos: SEQ ID NO.: 3 y 4 para IL-8, SEQ ID NO.: 5 y 6 para Claudina-1, SEQ ID NO.: 7 y 8 para ZO-1, SEQ ID NO.: 9 y 10 para Ocludina, y SEQ ID NO.: 11 y 12 para MLCK.

Los resultados del análisis de expresión génica se muestran en la Fig. 4. La adición de IFN-γ y TNF-α al sistema de cultivo celular monocapa de Caco-2 aumentó la expresión de ARNm de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), y redujo la expresión de ARNm de ocludina. Las células a las que se agregó HYA mostraron una supresión de un aumento en la expresión de ARNm de MLCK y una reducción en la expresión de ARNm de ocludina. Como se muestra en la Fig. 3B, la adición de IFN-γ y TNF-α aumentó la expresión de ARNm de IL-8; sin embargo, la adición de HYA y HYB suprimió dicho aumento en la expresión.

[Ejemplo 3]

45 Efecto de HYA en el modelo de ratón de enteritis inducida con sulfato de sodio de dextrano

Se compraron ratones BALB/c (♀, de 6 semanas de edad) de Charles River Japan (Kanagawa, Japan), y todos los experimentos se llevaron a cabo según la Norma de experimentos en animales de la Hiroshima University (No. C10-17). Se indujo una colitis aguda permitiendo la ingesta libre de 3.5% (p/v) de DSS (peso molecular 36000-50000; MP Biomedicals, Aurora, OH, USA) por 5 días. Para evaluar el efecto de HYA y HYB en el intestino grueso, se administraron por vía oral 100 μL de una suspensión de HYA o HYB (cada 100 nmol) a los ratones. Esta administración se realizó todos los días por un total de 10 días, por 5 días antes de la administración de DSS y 5 días después del inicio de la administración. Los síntomas de colitis se evaluaron todos los días según una reducción en el peso corporal, la condición de las heces y el sangrado anal. Después de la administración de DSS por 5 días, el ratón fue sacrificado, y se midió la longitud del intestino grueso. Después, se extrajo el ARN del tejido del intestino grueso usando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Maryland, MD, EE. UU.). Se produjo una sección en parafina (7 μm) del tejido del intestino

grueso, se tiñó con hematoxilina-eosina y se evaluó histoquímicamente. Se hizo la transcripción inversa del ARN extraído usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Life Technologies) para proporcionar un análisis de ADNc y de PCR en tiempo real usando el kit KAPA SYBR FAST ABI PRISM qPCR (Kapa Biosystems). Como el cebador, se usaron pares de oligoADN de secuencias de nucleótidos: SEQ ID NO.: 5 y 6 para Claudina-1, SEQ ID NO: 13 y 14 para Claudina-3, SEQ ID NO: 15 y 16 para Claudina-4, SEQ ID NO: 7 y 8 para ZO-1, SEQ ID NO.: 17 y 18 para ZO-2, SEQ ID NO.: 9 y 10 para Ocludina, y SEQ ID NO.: 11 y 12 para MLCK.

En cuanto a los ratones en cada grupo de tratamiento, se muestran los cambios en el transcurso del tiempo en el peso corporal en la Fig. 5, la pérdida de peso se muestra en la Fig. 6, el puntaje de heces se muestra en la Fig. 7 y la longitud del intestino grueso se muestra en la Fig. 8. La administración de HYA fue eficaz para la supresión de la pérdida de peso, recuperación del puntaje de heces y la protección del intestino grueso.

Los resultados de la evaluación histoquímica de la sección del intestino grueso (tinción H&E) se muestran en la Fig. 9. Si bien el tratamiento con DSS indujo notablemente el daño de las células epiteliales del intestino grueso y la reducción de las criptas, el ratón que recibió HYA mostró una recuperación de los daños en el tejido.

La expresión de ARNm de claudina-1, -3, y -4, ocludina, MLCK, ZO-1 y ZO-2 se muestra en la Fig. 10. El ratón DSS indujo de forma notable la expresión de ARNm anormal de claudina-1, 3, 4, ocludina, ZO-1 y ZO-2 (MLCK tendió a aumentar). Sin embargo, los ratones que recibieron HYA por vía oral mostraron una recuperación importante de la expresión de ARNm de ocludina y MLCK en comparación con el ratón DSS. Por otro lado, HYB no mostró una recuperación de la expresión anormal de los factores asociados con TJ.

Aplicación industrial

La presente ha aclarado que el ácido graso hidroxilado no saturado de la invención tiene un efecto de barrera del tracto intestinal desconocido convencionalmente como una función fisiológica. Un agente protector del tracto intestinal que contiene dicho ácido graso hidroxilado no saturado y similares es aplicable a varios campos de productos farmacéuticos, alimentos, piensos y similares y la presente invención es extremadamente útil para la industria.

Listado de secuencias

<110> Kyoto University NITTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Agente protector del tracto intestinal que comprende ácidos grasos hidroxilados

<130> 092124

<150> JP 2013-031769

<151> 2013-02-21

<160> 18

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 654

<212> DNA

<213> Lactobacillus plantarum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(654)

<400> 1

ES 2 738 496 T3

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 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 2 738 496 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> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

10 <400> 3
atgactcca agctggccgt ggct 24

<210> 4
<211> 25
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador
 <400> 4
 tctcagccct ctcaaaaac ttctc 25
 5 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 5
 ccctatgacc ccagtcaatg 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
 aaggcagaga gaagcagcag 20
 20 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador
 <400> 7
 ggatgatgcc tcgttctacc 20
 <210> 8
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8
 35 tccgtgtgt ggatacctg 20
 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 9
 aagagttgac agtcccatgg catac 25
 45 <210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 10

atccacaggc gaagtaatg gaag 24
 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 11
 aacgagatca acatcatgaa cca 23
 10 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 12
 cagctgtgct tgctctgaa 20
 <210> 13
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 13
 25 aaggtgtacg actcgctgct 20
 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador
 <400> 14
 gaagtcccgg ataatggtg t 21
 <210> 15
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 15
 40 tatggatgaa ctgcgtggtg 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 16
 ccacgatgat gctgatgatg 20
 50 <210> 17

ES 2 738 496 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 17
aaagcagagc gaacgaagag 20

<210> 18
<211> 20
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

15 <400> 18
tttagtgcc agaccggtc 20

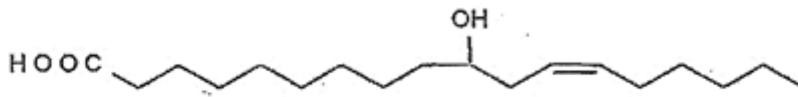
REIVINDICACIONES

- 1.** Un ácido graso no saturado hidroxilado que tiene 18 átomos de carbono y que tiene un grupo hidroxilo en la posición 10, en donde el ácido graso no saturado hidroxilado tiene un enlace cis doble en la posición 12, para usar en la profilaxis o mejora de una enfermedad causada por el daño de la función de barrera del tracto intestinal.
- 5 **2.** El ácido graso no saturado hidroxilado para usar según la reivindicación, en donde el ácido graso no saturado es ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico.
- 3.** El ácido graso no saturado hidroxilado para usar según la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad causada por el daño en la función de la barrera del tracto intestinal es al menos un tipo de enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal, úlcera y síndrome del intestino irritable.
- 10 **4.** El ácido graso no saturado hidroxilado para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 comprendido en un alimento o en un aditivo de alimento.
- 5.** El ácido graso no saturado hidroxilado para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 comprendido en un pienso o en un aditivo de pienso.
- 15 **6.** Un producto farmacéutico que comprende un ácido graso no saturado hidroxilado que tiene 18 átomos de carbono y que tiene un grupo hidroxilo en la posición 10, en donde el ácido graso no saturado hidroxilado tiene un enlace cis doble en la posición 12, para usar en la profilaxis o mejora de una enfermedad causada por el daño de la función de barrera del tracto intestinal.
- 7.** El producto farmacéutico para usar según la reivindicación 6, en donde el ácido graso no saturado hidroxilado es ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico.
- 20 **8.** El producto farmacéutico para usar según la reivindicación 6 o 7, en donde la enfermedad causada por el daño en la función de la barrera del tracto intestinal es al menos un tipo de enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal, úlcera y síndrome del intestino irritable.

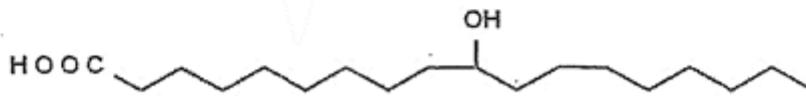
FIG. 1

A: Ácidos grasos de hidroxilo

HYA: 10-hidroxi-12(Z)-18:1



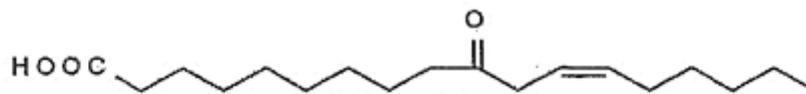
HYB: 10-hidroxi-18:0



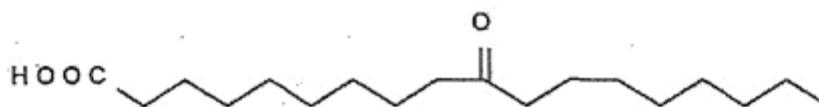
OXO

B: Ácidos grasos de cetona

Keto A: 10-oxo-12(Z)-18:1



Keto B: 10-oxo-18:0



Keto C: 10-oxo-11(E)-18:1

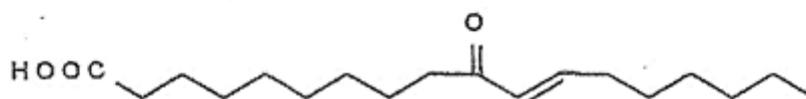


FIG. 2

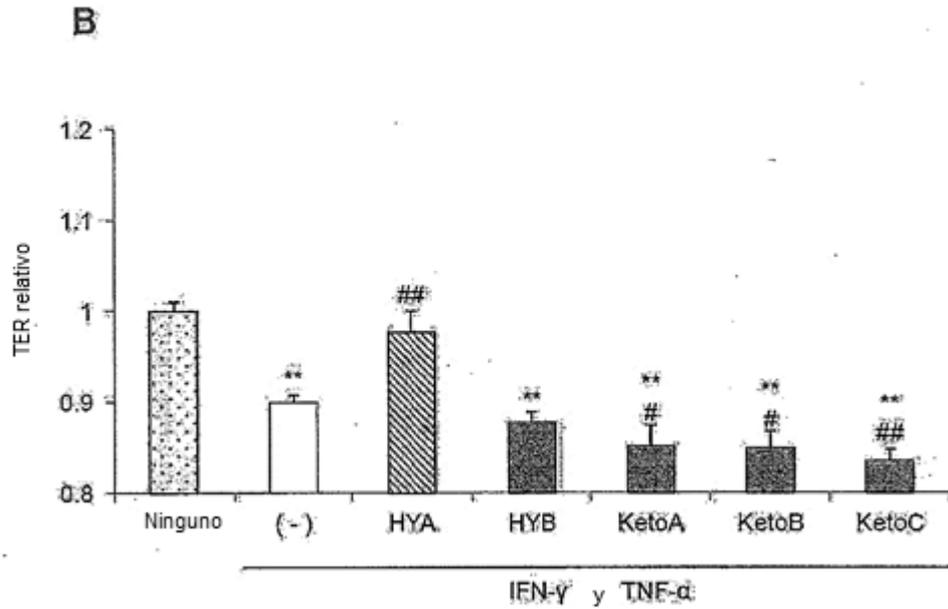
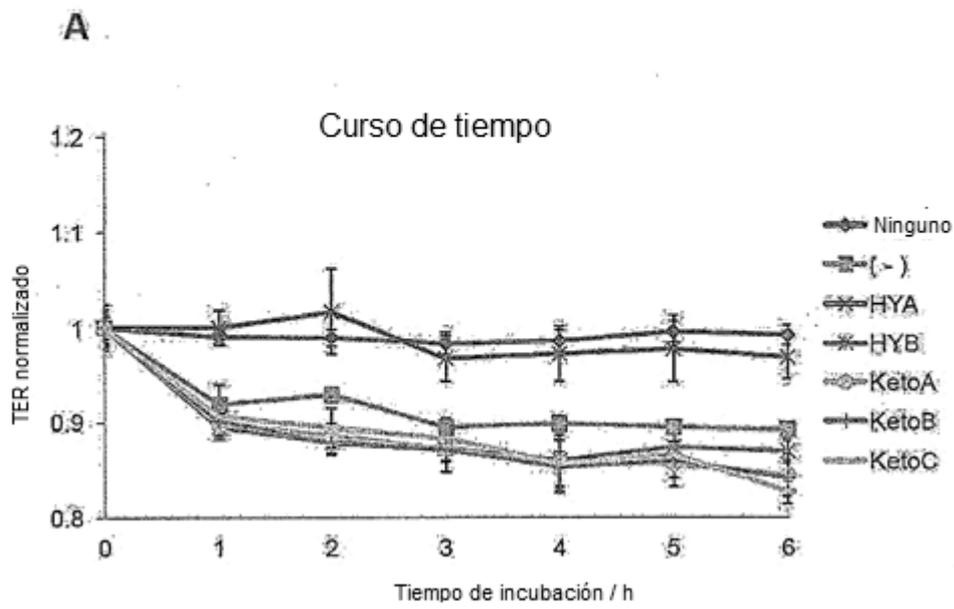


FIG. 3

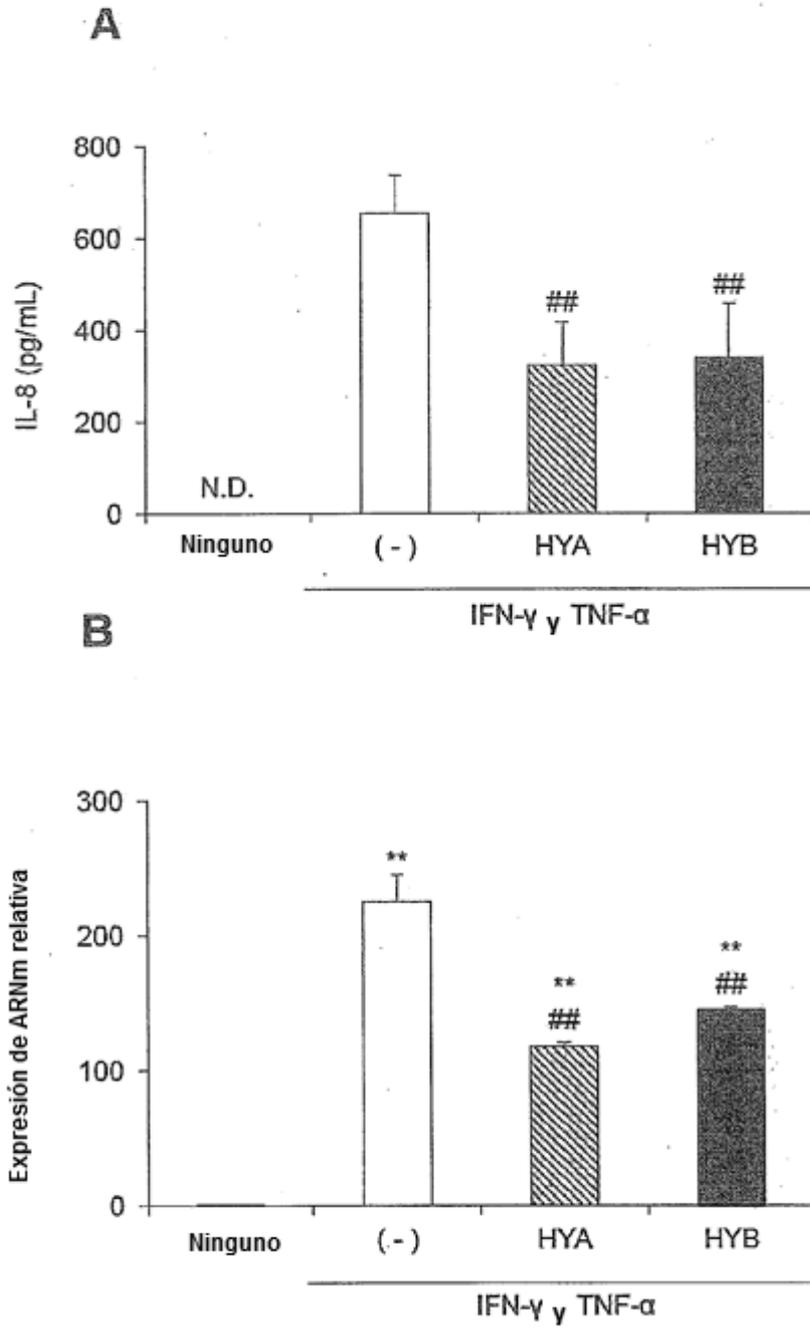


FIG. 4

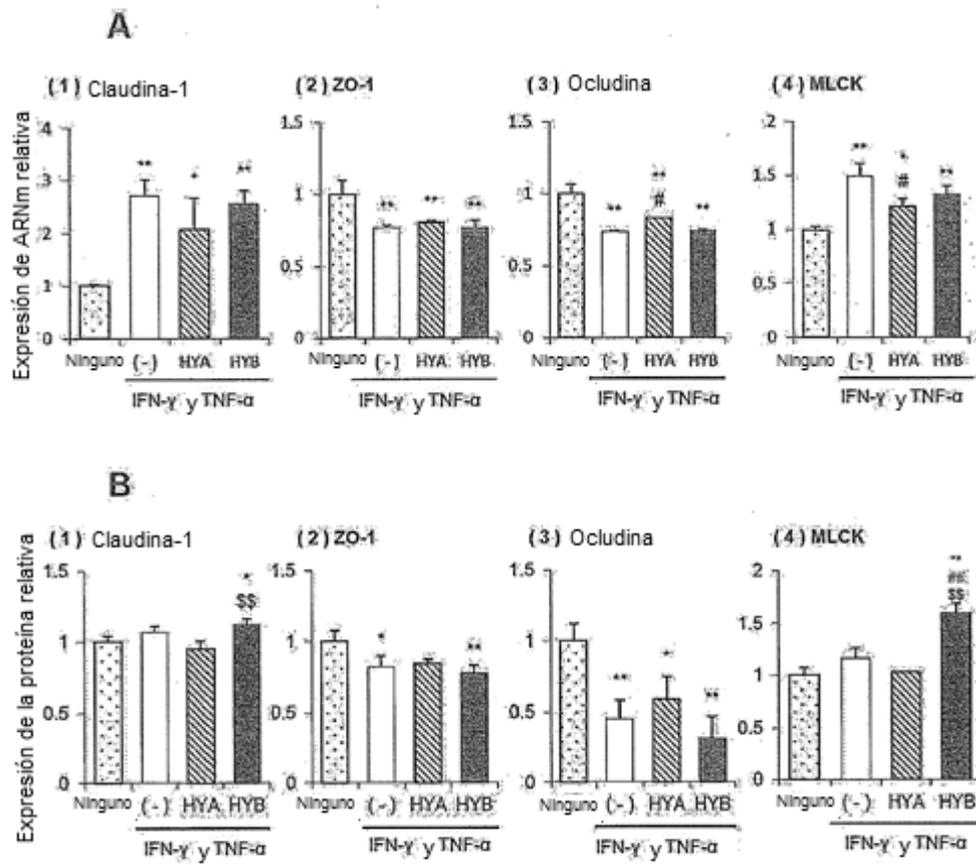


FIG. 5

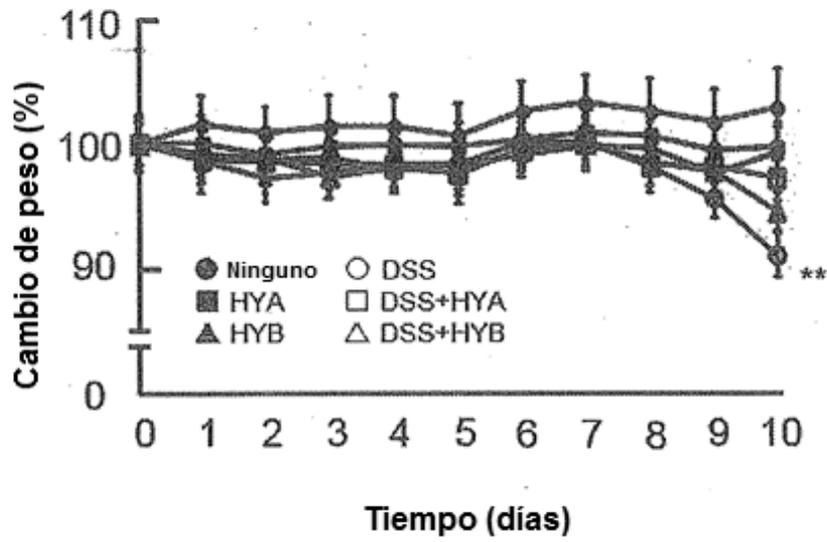


FIG. 6

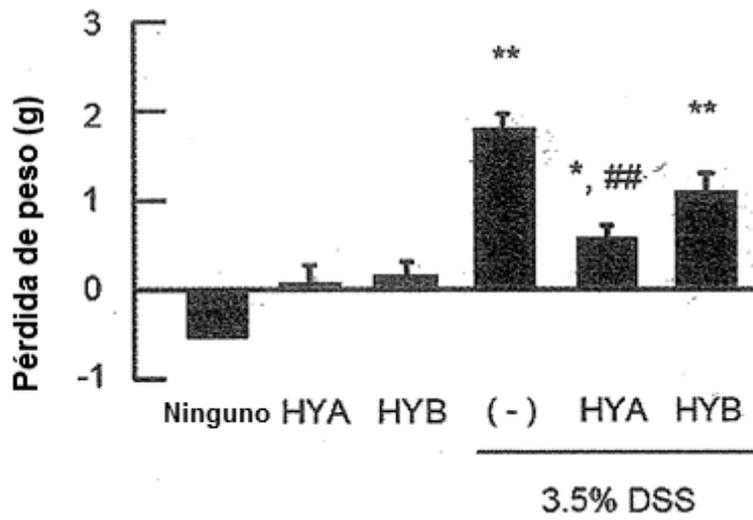


FIG. 7

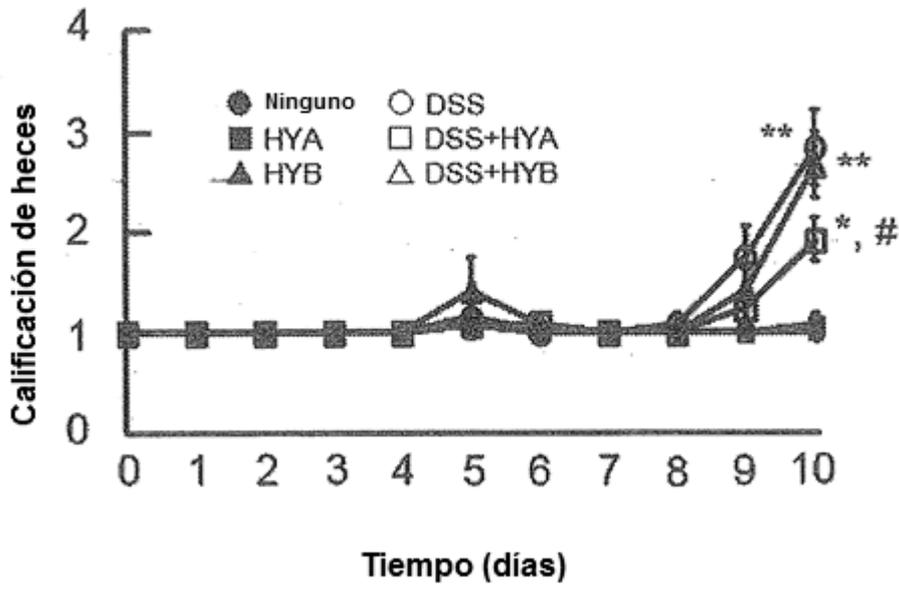


FIG. 8

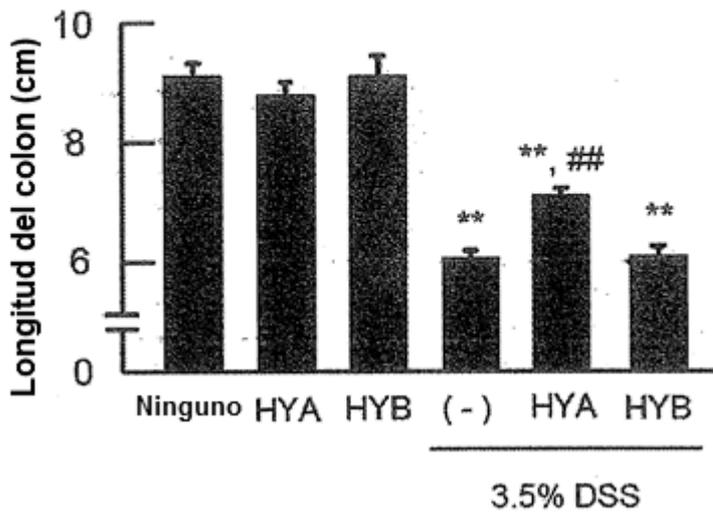


FIG. 9

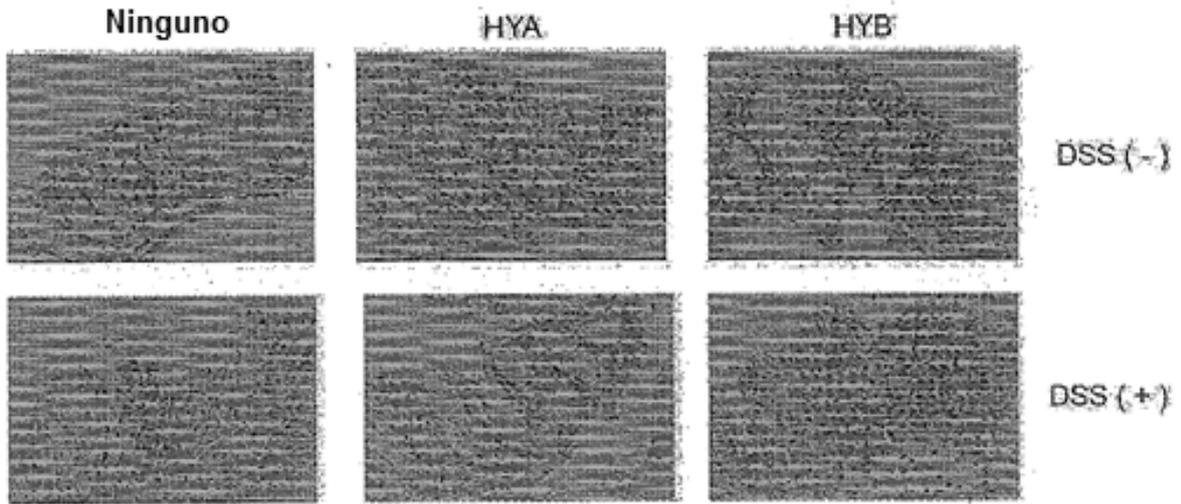


FIG. 10

