

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 323**

51 Int. Cl.:

A61K 31/20 (2006.01)

A61K 31/201 (2006.01)

A61K 31/202 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2015 PCT/JP2015/051844**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15111701**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2015 E 15740348 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3097910**

54 Título: **Agente antiinflamatorio que contiene ácido graso raro**

30 Prioridad:

24.01.2014 JP 2014011866

08.08.2014 JP 2014162982

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

08.03.2021

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;

KAWADA, TERUO;

TAKAHASHI, NOBUYUKI;

GOTO, TSUYOSHI;

SUGAWARA, TATSUYA y

YONEJIMA, YASUNORI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 810 323 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 antiinflamatorio que contiene ácido graso raro

Campo técnico

La presente invención se refiere a un agente que contiene un ácido graso raro como se define en el presente documento para uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, más particularmente en el que dicho agente utiliza la función fisiológica, por ejemplo, una acción para suprimir una reacción de inflamación *in vivo*, de ácidos grasos raros tales como el ácido graso oxo, el ácido graso hidroxilado y similares como se definen en el presente documento. La presente invención también se refiere a dicho agente para su uso, en el que dicho agente es un alimento, un producto farmacéutico, pienso y similares que contienen el agente.

Antecedentes de la técnica

La inflamación es una reacción de defensa de los organismos vivos que se observa cuando los tejidos biológicos sufren una lesión por una infección bacteriana, la acción de un factor físico-químico y similares, en donde la sustancia causal de la lesión y los tejidos lesionados se eliminan de ese modo. Con respecto a la reacción inflamatoria en organismos vivos, se sabe que el óxido nítrico (NO) producido por el macrófago M1 actúa como mediador. Si bien el NO actúa como un factor de defensa biológica, exacerba la inflamación cuando se produce en grandes cantidades durante la inflamación. Por ejemplo, en el tejido adiposo en estado obeso, la inflamación se promueve mediante la activación mutua de adipocitos y macrófagos M1 activados, y se induce un estado de enfermedad. Por lo tanto, se espera una acción antiinflamatoria de una sustancia que suprime la producción de NO por el macrófago M1.

Como un derivado de ácido graso que muestra una acción antiinflamatoria, se han descrito los ácidos grasos hidroxilados producidos por lipoxigenasa. Por ejemplo, cuando se usa una lipoxigenasa de origen vegetal, se producen ácido 9-hidroxi-trans-10,cis-12-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-cis-9,trans-11-octadecadienoico a partir de ácido linoleico; se producen además ácido 13-hidroxi-10-oxo-trans-11-octadecenoico, ácido 9-hidroxi-13-oxo-trans-10-octadecenoico, ácido 9-hidroxi-10-oxo-cis-12-octadecenoico, ácido 13-hidroxi-12-oxo-cis-9-octadecenoico mediante el uso combinado con la hidroxi peróxido isomerasa, y se describe que estos ácidos grasos hidroxilados y los ácidos grasos oxo tienen una acción antiinflamatoria (documento de patente 1). Además, como mediador lipídico antiinflamatorio endógeno en mamíferos, se han descrito la forma epoxi y la forma hidroxilada de ácidos grasos ω 3 como el ácido eicosapentaenoico (EPA), el ácido docosahexaenoico (DHA) y similares, que se producen por la acción de enzimas oxidantes como la lipoxigenasa, monooxigenasa y similares (documento de patente 2).

En cuanto a los ácidos grasos raros como el ácido graso hidroxilado, el ácido graso oxo y similares, dado que se ha descrito que una parte de los ácidos grasos oxo como el ácido 9-oxo-octadecadienoico, el ácido 13-oxo-octadecadienoico y similares contenidos en el tomate tienen una actividad para mejorar enfermedades relacionadas con el estilo de vida, como la mejora del metabolismo de los lípidos y similares (documento de patente 3, documentos no de patente 1, 2), las funciones fisiológicas de los ácidos grasos raros están llamando la atención.

Con respecto a la producción de ácidos grasos raros, tales como ácido graso oxo, ácido graso hidroxilado y similares, se ha descrito un método de producción de ácido graso hidroxilado en posición C10 y ácido graso oxo en posición C10, cada uno con 18 átomos de carbono, que utiliza deshidrasa de hidratación derivada de *Lactobacillus plantarum*, y que fue descubierto por los inventores (documento de patente 4). Además, también se ha descrito un efecto de mejora del metabolismo (documento de patente 5) y una acción protectora del intestino (documento de patente 6) relacionados con estos ácidos grasos hidroxilados en posición C10 y ácido graso oxo en posición C10. Sin embargo, se desconocen las funciones fisiológicas distintas de la mejora del metabolismo y la protección intestinal, por ejemplo, funciones fisiológicas como la acción antiinflamatoria y similares, de estos ácidos grasos hidroxilados, ácidos grasos oxo, así como ácidos grasos hidroxilados y ácidos grasos oxo, en donde cada uno tiene un número de átomos de carbono distinto de 18 o ácido graso hidroxilado y ácido graso oxo, en donde cada uno tiene un grupo hidroxilo, un grupo carbonilo en una posición distinta de la posición C10.

[Lista de documentos]**[Documentos de patentes]**

documento de patente 1: JP-A-2005-008594

documento de patente 2: WO 2012/023254

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

documento de patente 4: WO 2013/168310

documento de patente 5: WO 2014/069227

documento de patente 6: WO 2014/129384

[documentos no de patente]

documento no de patente 1: Kim Y-I, (2011), Mol. Nutr. Food Res., Vol.55, pág. 585-593

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

Compendio de la invención**5 Problemas a resolver por la invención**

Un objeto de la presente invención es dar a conocer un agente antiinflamatorio que contiene un ácido graso raro como se define en el presente documento, que suprime una reacción inflamatoria, para uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

Medios de resolver los problemas

10 Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos en vista de los problemas mencionados anteriormente y encontraron que los ácidos grasos raros tales como un ácido graso hidroxilado en posición C10 que tiene 18 átomos de carbono y un ácido graso oxo en posición C10 que tiene 18 átomos de carbono como se define aquí, obtenido usando un grupo de enzimas saturantes de ácido graso derivado de *Lactobacillus plantarum* y una reacción de oxidación química, y un ácido graso hidroxilado en posición C13 que tiene 18 átomos de carbono y un ácido graso oxo en posición C13 que tiene 18 átomos de carbono como se define aquí, obtenido usando una hidratación enzima derivada de *Lactobacillus acidophilus* y una reacción de oxidación química y similares, que fueron descubiertos por los inventores, tienen una acción antiinflamatoria convencionalmente desconocida basada en una acción para suprimir la producción de NO por el macrófago M1. Además, los presentes inventores han descubierto que los ácidos grasos raros mencionados anteriormente tienen un efecto de aumentar la resistencia de las células al estrés por H₂O₂ y un efecto de aumentar la expresión de ARNm de la enzima antioxidante HO-1. Además, los presentes inventores han encontrado que los ácidos grasos raros mencionados anteriormente suprimen la diferenciación de monocitos y macrófagos en macrófagos M1 induciendo directa o indirectamente la diferenciación de monocitos y macrófagos en macrófagos M2.

La presente invención se ha completado en base a los hallazgos anteriores.

25 Por consiguiente, la presente invención da a conocer lo siguiente:

[1] Un agente que comprende el siguiente ácido graso:

(1) un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene un doble enlace trans en la posición 11 o al menos un doble enlace cis en la posición 6, la posición 12, la posición 15, que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 10 seleccionado del grupo que consiste en ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-cis-12,cis-15-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-cis-6,cis-12-ácido octadecadienoico, 10-hidroxi-cis-6, cis-12, ácido cis-15-octadecatrienoico, ácido 10,12-dihidroxi-octadecanoico, ácido 10-hidroxi-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, ácido 10-hidroxi-cis-6, trans-11,cis-15-octadecatrienoico, 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 10-oxo-cis-6,trans-11-octadecadienoico, ácido 10-oxo-trans-11,cis-15-octadecadienoico o ácido 10-oxo-cis-6, trans-11,cis-15-octadecatrienoico,

40 (2) un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 6, la posición 9, la posición 15, que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 13 seleccionado del grupo que consiste en ácido 13-hidroxi-cis-9-octadecenoico, ácido 13-hidroxi-cis-6,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-cis-9,cis-15-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-cis-6, cis-9,cis-15-octadecatrienoico, ácido 10,13-dihidroxi-octadecanoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-6-octadecenoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-15-octadecenoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-6,cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-13-hidroxi-cis-6-octadecenoico, ácido 10-oxo-13-hidroxi-cis-15-octadecenoico, ácido 10-oxo-13-hidroxi-cis-6,cis-15-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-cis-5,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-trans-5,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-oxo-cis-9-octadecenoico, ácido 13-oxo-cis-6,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-oxo-cis-9,cis-15-octadecadienoico, ácido 13-oxo-cis-6,cis-9,cis-15-octadecatrienoico, ácido 10,13-dioxo-octadecanoico, ácido 10,13-dioxo-cis-6-octadecenoico, ácido 10,13-dioxo-cis-15-octadecenoico, ácido 10,13-dioxo-cis-6, cis-15 octadecadienoico, ácido 13-oxo-cis-5,cis-9-octadecadienoico o ácido 13-oxo-trans-5, ácido cis-9-octadecadienoico,

55 (3) un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 5, la posición 8, la posición 9, la posición 14, la posición 17, que tiene 18 o 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 12 seleccionado del grupo que consiste en ácido 12-hidroxi-cis-14-eicosenoico, ácido 12-hidroxi-cis-14, cis-17-eicosadienoico, ácido 12-hidroxi-cis-8,cis-14-eicosadienoico, ácido 12-hidroxi-cis-5,cis-8-

eicosadienoico, ácido 12-hidroxi-cis-8, cis-14, cis-17-eicosatrienoico, ácido 12-hidroxi-cis-5,cis-8, ácido cis-14-eicosatrienoico, ácido 12-oxo-octadecanoico, ácido 12-oxo-cis-14-eicosenoico, ácido 12-oxo-cis-14,cis-17-eicosadienoico, ácido 12-oxo-cis-8,cis-14-eicosadienoico, ácido 12-oxo-cis-5,cis-8-eicosadienoico, ácido 12-oxo-cis-8,cis-14,cis-17-eicosatrienoico o ácido 12-oxo-cis-5,cis-8, cis-14-eicosatrienoico,

5 (4) un ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 5, la posición 8, la posición 11, la posición 17, que tiene 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 15 seleccionado del grupo que consiste en ácido 15-hidroxi-cis-11-eicosenoico, ácido 15-hidroxi-cis-11, ácido cis-17-eicosadienoico, ácido 15-hidroxi-cis-8,cis-11-eicosadienoico, ácido 15-hidroxi-cis-5,cis-8,cis-11-eicosatrienoico, ácido 15-hidroxi-cis-8,cis-11,cis-17-eicosatrienoico, ácido 15-hidroxi-cis-5,cis-11-eicosadienoico, ácido 15-hidroxi-cis-5,cis-11,cis-17-eicosatrienoico, ácido 15-oxo-cis-11-eicosenoico, ácido 15-oxo-cis-11,cis-17-eicosadienoico, ácido 15-oxo-cis-8,cis-11-eicosadienoico, ácido 15-oxo-cis-5,cis-8,cis-11-eicosatrienoico, ácido 15-oxo-cis-8,cis-11,cis-17-eicosatrienoico, ácido 15-oxo-cis-5,cis-11-eicosadienoico o ácido 15-oxo-cis-5,cis-11,cis-17-eicosatrienoico, o

(5) un ácido graso saturado que tiene 16 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 10 seleccionado del grupo que consiste en ácido 10-hidroxi-hexadecanoico o ácido 10-oxo-hexadecanoico,

15 para uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria;

[2] el agente para usar de acuerdo con [1], que comprende el siguiente ácido graso:

(1) un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene un doble enlace trans en la posición 11 o al menos un doble enlace cis en la posición 6, la posición 12, que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 10 seleccionado del grupo que consiste en ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-octadecanoico, ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-cis-12,cis-15-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-cis-6,cis-12-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-12,cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6,cis-12-octadecadienoico, ácido 10-oxo-trans-11,cis-15-octadecadienoico o ácido 10-oxo-cis-6,trans-11-octadecadienoico, o

(2) un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 6, la posición 9, la posición 15, que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 13 seleccionado del grupo que consiste en ácido 13-hidroxi-cis-9-octadecenoico, ácido 13-hidroxi-cis-6,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-cis-9,cis-15-octadecadienoico, ácido 10,13-dihidroxi-octadecanoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-6-octadecenoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-15-octadecenoico, ácido 13-oxo-cis-9-octadecenoico, ácido 13-oxo-cis-6,cis-9-octadecadienoico o ácido 13-oxo-cis-9,cis-15-octadecadienoico;

[3] el agente para usar de acuerdo con [1] o [2] para usar en la profilaxis o mejora de una enfermedad inflamatoria que involucra macrófagos;

[4] el agente para usar de acuerdo con [1] o [2], en el que dicho agente es un alimento o un aditivo alimentario;

[8] el agente para usar de acuerdo con [1] o [2], en donde dicho agente es un producto farmacéutico;

[9] el agente para usar de acuerdo con [1] o [2], en el que dicho agente es un pienso o un aditivo para pienso.

[Efecto de la invención]

35 En la presente invención, se encontró que los ácidos grasos hidroxilados tales como el ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico y el ácido 13-hidroxi-cis-9-octadecenoico o ácidos grasos oxo tales como ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico y ácido 13-oxo-cis-9-octadecenoico (en lo sucesivo, también denominado derivado de ácidos grasos raros) tienen una acción antiinflamatoria que es una función fisiológica convencionalmente desconocida.

40 La presente invención da a conocer un agente antiinflamatorio que contiene un derivado de ácido graso raro tal como ácido graso hidroxilado y similares como se define en el presente documento para uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, basada en la función.

[Breve descripción de los dibujos]

45 La figura 1 muestra los resultados de la medición de la cantidad de producción de NO por el método de Griess, en el que Cont. muestra el control negativo (adición de etanol), Posi. muestra el control positivo (adición de inhibidor de fosforilación de IκBα), y el eje vertical muestra la cantidad de producción de NO.

La figura 2 muestra los resultados de medición de la tasa de supervivencia celular en relación con H₂O₂. A: Se usaron varios compuestos (No. 11-No. 13), cada uno a 30 μM. B: El Compuesto No. 11 se usó a 10, 20, 30 μM. Nor. muestra células libres de un tratamiento con H₂O₂, Con. muestra el control negativo, tBHQ muestra el control positivo y el eje vertical muestra la tasa de supervivencia celular.

50 La figura 3 muestra los resultados de medición de la expresión de ARNm de la enzima antioxidante HO-1. A: Se usaron diversos compuestos (No. 11-No. 13), cada uno a 30 μM. B: El Compuesto No. 11 se usó a 10, 30, 60, 90 μM. Con. muestra el control negativo, tBHQ muestra el control positivo y el eje vertical muestra el nivel de expresión relativo de

ARNm de HO-1.

La figura 4 muestra imágenes de transferencia Western y un gráfico que exhibe los resultados de medición de la expresión intranuclear del factor de transcripción Nrf2. -Con. muestra el control negativo, tBHQ muestra el control positivo y el eje vertical muestra el nivel de expresión relativo de Nrf2 intranuclear.

- 5 La figura 5 muestra los resultados de medición de la actividad de transcripción del factor de transcripción Nrf2. Con. muestra el control negativo, tBHQ muestra el control positivo y el eje vertical muestra la actividad de luciferasa relativa.

La figura 6 muestra un programa de cultivo para inducir la diferenciación de células derivadas de médula ósea de ratón en macrófagos M2.

La Fig. 7 muestra la proporción de células que tienen antígeno de superficie celular de macrófagos M2.

- 10 La figura 8 muestra la proporción de células que tienen antígeno de superficie celular de macrófagos M2.

La figura 9 muestra la proporción de células que tienen antígeno de superficie celular de macrófagos M2.

La figura 10 muestra la proporción de células que tienen antígeno de superficie celular de macrófagos M2.

La Fig. 11 muestra un nivel de expresión de ARNm de Arginasa 1.

La figura 12 muestra un nivel de expresión de ARNm de IL-1 β .

- 15 La figura 13 muestra un programa de cultivo para inducir la diferenciación de células derivadas de médula ósea de ratón en macrófagos M2.

La figura 14 muestra la proporción de células que tienen antígeno de superficie celular de macrófagos M2.

La figura 15 muestra la proporción de células que tienen antígeno de superficie celular de macrófagos M2.

La Fig. 16 muestra el nivel de expresión del ARNm de Arginasa 1.

- 20 La Fig. 17 muestra el nivel de expresión del ARNm de IL-1 β .

La figura 18 muestra el nivel de expresión de IL-4.

La figura 19 muestra el nivel de expresión de MCP-1.

[Descripción de las realizaciones]

La presente invención se explica en detalle a continuación.

- 25 En la presente invención, "antiinflamatorio" significa la supresión de la inflamación *in vivo*. Para ser específicos, un "agente antiinflamatorio" significa, por ejemplo, profilaxis y/o supresión de inflamación tal como lesión de tejido (reumatismo, arteriosclerosis, etc.) debido a enfermedad alérgica, inflamación crónica y enfermedad de inflamación nerviosa.

- 30 Como índice de la actividad antiinflamatoria mencionada anteriormente, se puede medir la producción de óxido nítrico (NO) por el macrófago M1. Si bien los macrófagos son un tipo de inmunocito que desempeña un papel central en el mecanismo de defensa biológica contra la exposición biológica a sustancias exógenas como bacterias patógenas y similares que invaden desde el mundo exterior, cuando se activa el macrófago, se convierte en el macrófago M1 y produce mediadores inflamatorios que incluyen NO, prostaglandina E2, citocinas como TNF- α y similares. La producción promovida de estos mediadores inflamatorios causa trastornos tisulares debido a la inflamación crónica e induce arteriosclerosis, reumatismo y similares. Por lo tanto, si se confirma que el derivado de ácido graso raro de la presente invención mencionado a continuación suprime la producción de NO por el macrófago M1 activado por lipopolisacárido (LPS), y cuando se suprime la producción de NO, se puede considerar que el derivado de ácido graso raro tiene muy posiblemente un efecto antiinflamatorio o tiene definitivamente un efecto antiinflamatorio. Como un ejemplo, la cantidad de producción de NO se puede evaluar mediante el método de Griess, aunque el método no está limitado.

- 40 Como índice de la actividad antiinflamatoria mencionada anteriormente, además, se puede medir la tasa de supervivencia celular en relación con H₂O₂. H₂O₂ como oxígeno activo promueve la producción de citocinas inflamatorias y causa enfermedades inflamatorias como el macrófago M1 mencionado anteriormente. La reducción del estrés oxidativo por H₂O₂ proporciona una acción antiinflamatoria. Por lo tanto, si se confirma si la tasa de supervivencia de las células cultivadas en relación con los incrementos de H₂O₂ por el derivado de ácido graso raro mencionado a continuación de la presente invención y, si aumenta la tasa de supervivencia, se puede considerar que el derivado de ácido graso raro tiene muy posiblemente un efecto antiinflamatorio o concretamente tiene un efecto antiinflamatorio.

Como índice de la actividad antiinflamatoria mencionada anteriormente, además, también se puede medir la promoción de la expresión de hemo-oxigenasa (HO-1). HO-1 es una enzima importante como mecanismo de defensa en el cuerpo que protege a las células del estrés oxidativo. La falta de HO-1 promueve el daño celular debido al estrés oxidativo, promueve la inflamación; Por otro lado, la expresión promovida de HO-1 suprime el estrés oxidativo y suprime la inflamación debida a la lesión celular. Por lo tanto, si se confirma que la expresión de HO-1 en las células cultivadas es promovida por el derivado de ácido graso raro de la presente invención mencionado a continuación y, cuando se promovió la expresión de HO-1, se puede juzgar que el derivado de ácido graso raro muy posiblemente que tenga un efecto antiinflamatorio o que tenga un efecto antiinflamatorio.

Alternativamente, como índice de la actividad antiinflamatoria mencionada anteriormente, también se puede medir la promoción de la expresión del factor de transcripción intranuclear Nrf2. La expresión intranuclear de Nrf2 es promovida y activada por una sustancia electrófila, oxígeno activo, estrés del retículo endoplásmico y similares, y Nrf2 controla la reacción adaptativa al estrés oxidativo y suprime la inflamación en animales superiores. Por lo tanto, si se confirma que la expresión intranuclear de Nrf2 en las células cultivadas es promovida por el derivado de ácido graso raro de la presente invención mencionado a continuación y, cuando se promovió la expresión intranuclear de Nrf2, el derivado de ácido graso raro puede considerarse altamente posiblemente tenga un efecto antiinflamatorio, o tenga un efecto antiinflamatorio. Alternativamente, si se confirma si la actividad de transcripción de Nrf2 en las células cultivadas es promovida por el derivado de ácido graso raro de la presente invención que se menciona a continuación y, cuando se promovió la actividad de transcripción de Nrf2, puede considerarse que el derivado de ácido graso raro muy posiblemente tenga un efecto antiinflamatorio o tenga un efecto antiinflamatorio.

Alternativamente, como índice de la actividad antiinflamatoria mencionada anteriormente, también se puede medir un marcador de expresión de macrófagos M2. El macrófago M1 se activa en la infección con bacterias, virus u hongos, y produce un factor de necrosis tumoral (TNF), óxido nítrico y citocinas como IL-6, IFN, IL-1 β y similares, que son importantes para la eliminación de tales patógenos. Por otro lado, los macrófagos M2 están involucrados en infecciones parasitarias, respuesta alérgica, metabolismo de las grasas, terapia de heridas, metástasis de cáncer y similares. Se sabe que los macrófagos se diferencian en M1 o M2, y la proporción de M1 se puede disminuir induciendo la diferenciación en M2, y en consecuencia de esto se suprime la inflamación. Por consiguiente, si se confirma que la expresión del antígeno de superficie celular expresada en macrófagos M2 y la expresión del marcador de ARNm expresado en macrófagos M2 son promovidas por el derivado de ácido graso raro de la presente invención mencionado a continuación y, cuando se promovieron, se puede considerar que el derivado de ácido graso raro muy posiblemente tenga un efecto antiinflamatorio o un efecto antiinflamatorio.

En la presente invención, el derivado de ácido graso raro se refiere a un derivado de ácido graso raro que puede producirse usando un grupo enzimático saturante de ácido graso derivado de *Lactobacillus plantarum* y una reacción de oxidación química (en adelante, en ocasiones, abreviado como "derivado de ácido graso raro LP"), y un derivado de ácido graso raro que se puede producir usando una enzima de hidratación derivada de *Lactobacillus acidophilus* y una reacción de oxidación química (en lo sucesivo, a veces abreviado como "derivado de ácido graso raro LA").

El derivado de ácido graso raro LP de la presente invención se refiere a un ácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 10. Como se usa en el presente documento, el ácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 10 se refiere a un ácido graso hidroxilado que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 10 (en lo sucesivo, , abreviado como "ácido graso 10-hidroxi ") u oxoácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo carbonilo en la posición 10 (en lo sucesivo a veces abreviado como " ácido graso 10-oxo"). El ácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 10 es un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene un doble enlace trans en la posición 11, o al menos un doble enlace cis en el 6 -posición, la posición 12, la posición 15. El ácido graso insaturado puede tener además un doble enlace cis en la posición 6 o en la posición 15.

Más específicamente, el ácido graso saturado o el ácido graso insaturado que tiene un doble enlace trans en la posición 11 o al menos un doble enlace cis en la posición 6, la posición 12, la posición 15, que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 10 (preferiblemente, un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene un doble enlace trans en la posición 11 o al menos un doble enlace cis en la posición 6, la posición 12, que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 10) se selecciona del grupo que consiste 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-octadecanoico, ácido 10-hidroxi-cis-15-octadecenoico,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, 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-oxooctadecanoico, ácido 10-oxo-cis-6-octadecenoico, ácido 10-oxo-cis-15-octadecenoico, ácido 10-oxo-cis-6, cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6,trans-11-octadecadienoico, ácido 10-oxo-trans-11,cis-15-octadecadienoico y ácido 10-oxo-cis-6, trans-11,cis-15-octadecatrienoico, preferiblemente ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-octadecanoico, ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-cis-12,cis-15-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-cis-6,cis-12-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-12,cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6,cis-12-octadecadienoico, ácido 10-oxo-trans-11,cis-15-octadecadienoico o ácido 10-oxo-cis-6,trans-11-octadecadienoico,

más preferiblemente, ácido 10-oxo-trans-11, cis-15-octadecadienoico o ácido 10-oxo-cis-6, trans-11-octadecadienoico.

El derivado de ácido graso raro LA en la presente invención se refiere a un ácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 13, un ácido graso que tiene 16 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la 10 posición, un ácido graso que tiene 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 15 o un ácido graso que tiene 18 o 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 12.

En la presente invención, un ácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 13 se refiere a un ácido graso hidroxilado que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 13 (en lo sucesivo, a veces abreviado como "ácido graso 13-hidroxi"), o un ácido graso oxo que tiene 18 átomos de carbono y un grupo carbonilo en la posición 13 (en lo sucesivo a veces abreviado como "ácido graso 13-oxo"). Como se usa en el presente documento, un ácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o un grupo carbonilo en la posición 10 y la posición 13 (en lo sucesivo a veces se abreviará como "ácido graso 10,13-dihidroxi" o "ácido graso 10,13-dioxo"), y un ácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 13 y un grupo carbonilo en la posición 10 (en lo sucesivo, a veces abreviado como "ácido graso 10-oxo-13-hidroxi") también se incluyen en una realización del "ácido graso 13-hidroxi" o "ácido graso 13-oxo". Además, el ácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 13 es un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 6, posición 9, la posición 15. Cuando el ácido graso que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 13 es un ácido graso insaturado, es preferible un ácido graso insaturado que tenga un doble enlace cis en la posición 9.

En la presente invención, además, el ácido graso que tiene 16 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o un grupo carbonilo en la posición 10 se refiere a un ácido graso hidroxilado que tiene 16 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 10 (de aquí en adelante a veces se abreviará como "ácido graso 10-hidroxi") o un ácido graso oxo que tiene 16 átomos de carbono y un grupo carbonilo en la posición 10 (en lo sucesivo se abreviará en ocasiones como "ácido graso 10-oxo"). Además, el ácido graso que tiene 16 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o un grupo carbonilo en la posición 10 es un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado.

En la presente invención, el ácido graso que tiene 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 15 se refiere a un ácido graso hidroxilado que tiene 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 15 (en lo sucesivo, a veces abreviado como "ácido graso 15-hidroxi"), o ácido graso oxo que tiene 20 átomos de carbono y un grupo carbonilo en el ácido graso en la posición 15 (en lo sucesivo a veces abreviado como "ácido graso 15-oxo"). Además, el ácido graso que tiene 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 15 es un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 5, la posición 8, la posición 11, la posición 17.

En la presente invención, el ácido graso que tiene 18 o 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 12 se refiere a un ácido graso hidroxilado que tiene 18 o 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 12 (de aquí en adelante a veces se abreviará como "ácido graso 12-hidroxi"), o un ácido graso oxo que tiene 18 o 20 átomos de carbono y un grupo carbonilo en la posición 12 (en adelante se abreviará a veces como "ácido graso 12-oxo"). Además, el ácido graso que tiene 18 o 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 12 es un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 5, la posición 8, la posición 9, la posición 14, la posición 17. Además, también es preferible un ácido graso saturado que tenga 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 12.

Más específicamente, el ácido graso saturado o el ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 6, la posición 9, la posición 15, que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 13 se selecciona del grupo que consiste en ácido 13-hidroxi-cis-9-octadecenoico, ácido 13-hidroxi-cis-6,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-cis-9,cis-15-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-cis-6,cis-9,cis-15-octadecatrienoico, ácido 10,13-dihidroxi-octadecanoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-6-octadecenoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-15-octadecenoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-6,cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-13-hidroxi-cis-6-octadecenoico, ácido 10-oxo-13-hidroxi-cis-15-octadecenoico, ácido 10-oxo-13-hidroxi-cis-6,cis-15-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-cis-5,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-trans-5,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-oxo-cis-9-octadecenoico, ácido 13-oxo-cis-6, ácido cis-9-octadecadienoico, ácido 13-oxo-cis-9,cis-15-octadecadienoico, ácido 13-oxo-cis-6,cis-9,cis-15-octadecatrienoico, ácido 10,13-dioxo-octadecanoico, ácido 10,13-dioxo-cis-6-octadecenoico, ácido 10,13-dioxo-cis-15-octadecenoico, 10,13-dioxo-cis-6, ácido cis-15-octadecadienoico, ácido 13-oxo-cis-5, ácido cis-9-octadecadienoico y ácido 13-oxo-trans-5,cis-9-octadecadienoico, preferiblemente, ácido 13-hidroxi-cis-9-octadecenoico, ácido 13-hidroxi-cis-6,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-cis-9,cis-15-octadecadienoico, ácido 10,13-dihidroxi-octadecanoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-6-octadecenoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-15-octadecenoico, ácido 13-oxo-cis-9-octadecenoico, ácido 13-oxo-cis-9,cis-15-octadecadienoico o ácido 13-oxo-cis-6,cis-9-octadecadienoico, más preferiblemente, ácido 13-oxo-cis-9,cis-15-octadecadienoico o ácido 13-hidroxi-cis-9, cis-15-octadecadienoico.

El ácido graso saturado que tiene 16 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 10 se selecciona del grupo que consiste en ácido 10-hidroxi-hexadecanoico y ácido 10-oxo-hexadecanoico.

El ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 5, la posición 8, la posición 11, la posición 17, que tiene 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 15, se selecciona del grupo que consiste en ácido 15-hidroxi-cis-11-eicosenoico, ácido 15-hidroxi-cis-11, ácido cis-17-eicosadienoico, ácido 15-hidroxi-cis-8,cis-11-eicosadienoico, ácido 15- hidroxi-cis-5, cis-8,cis-11-eicosatrienoico, ácido 15-hidroxi-cis-8, cis-11,cis-17-eicosatrienoico, ácido 15-hidroxi-cis-5,cis-11-eicosadienoico, ácido 15-hidroxi-cis-5, cis-11,cis-17-eicosatrienoico, ácido 15-oxo-cis-11-eicosenoico, ácido 15-oxo-cis-11,cis-17-eicosadienoico, ácido 15-oxo-cis-8, cis-11-eicosadienoico, ácido 15-oxo-cis-5,cis-8,cis-11-eicosatrienoico, ácido 15-oxo-cis-8, cis-11,cis-17-eicosatrienoico, ácido 15-oxo-cis-5,cis-11-eicosadienoico y ácido 15-oxo-cis-5, cis-11,cis-17-eicosatrienoico.

Un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 5, la posición 8, la posición 9, la posición 14, la posición 17, que tiene 18 o 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 12 (preferiblemente, ácido graso saturado que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 12) se selecciona del grupo que consiste en ácido 12-hidroxi-cis-14-eicosenoico, ácido 12-hidroxi-cis-14,cis-17-eicosadienoico, ácido 12-hidroxi-cis-8,cis-14-eicosadienoico, ácido 12-hidroxi-cis-5,cis-8-eicosadienoico, ácido 12-hidroxi-cis -8,cis-14, cis-17-eicosatrienoico, ácido 12-hidroxi-cis-5, cis-8,cis-14-eicosatrienoico, ácido 12-oxo-octadecanoico, ácido 12-oxo-cis-14-eicosenoico, ácido 12-oxo-cis-14,cis-17-eicosadienoico, ácido 12-oxo-cis-8,cis-14-eicosadienoico, ácido 12-oxo-cis-5,cis-8-eicosadienoico, ácido 12-oxo-cis-8,cis-14,cis-17-eicosatrienoico y ácido 12-oxo-cis-5,cis-8,cis-14-eicosatrienoico.

El derivado de ácido graso raro LP que se usará en la presente invención se puede preparar por el método de PCT/JP2012/78747 (WO 2013/168310) encontrado por los inventores. Además, el ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico se puede preparar en referencia a Biochemical and Biophysical Research Communications 416 (2011) pág.188-193 y similares. Además, el derivado de ácido graso raro LA puede prepararse mediante el siguiente método.

Como el derivado de ácido graso raro LA que se utilizará en la presente invención, se produce un ácido graso hidroxilado a partir de un ácido graso insaturado que tiene 16, 18, 20 átomos de carbono por una nueva enzima de hidratación de ácido graso (FA-HY), y un el ácido graso oxo puede producirse oxidando adicionalmente el grupo hidroxilo del ácido graso hidroxilado mediante una reacción enzimática o reacción química.

La nueva enzima de hidratación de ácido graso "FA-HY" mencionada anteriormente es

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

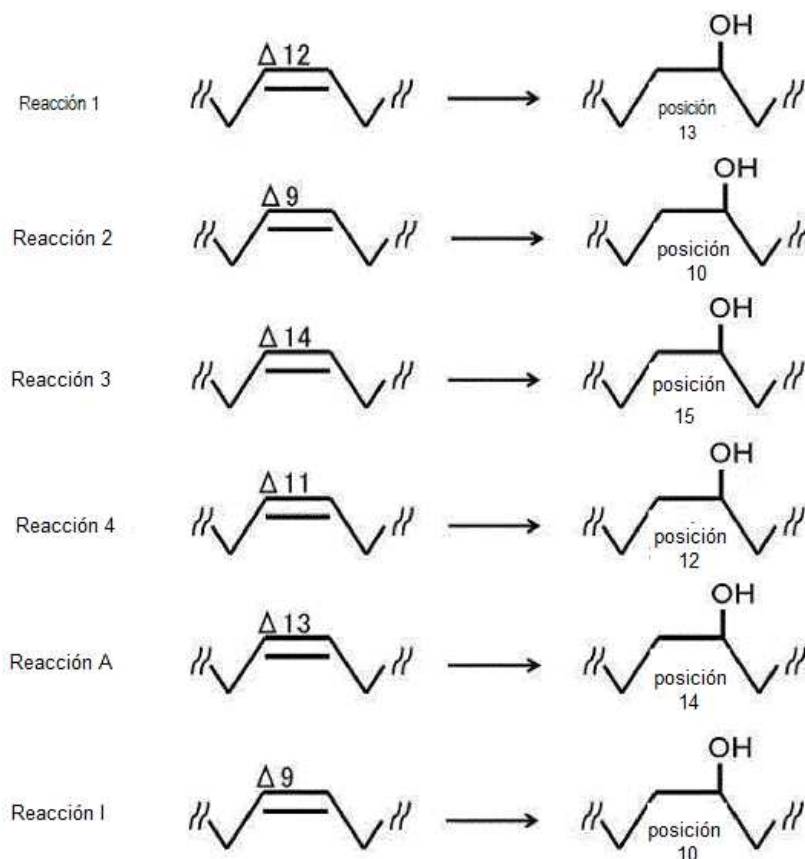
(b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2 se eliminan y/o sustituyen y/o insertan y/o agregan, y que tiene una actividad enzimática que tiene la proteína enzimática que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2, o

(c) una proteína codificada por una secuencia de bases que se hibrida a un ácido nucleico que consiste en una secuencia de cadena complementaria a la secuencia de bases que se muestra en la SEQ ID NO: 1 en condiciones rigurosas, y que tiene una actividad enzimática que tiene la proteína enzimática que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2.

Ejemplos más específicos de (b) mencionada anteriormente 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, en la que se eliminan 1-20, preferiblemente 1-10, más preferiblemente 1-varios (5, 4, 3 o 2) aminoácidos, (ii) una secuencia de aminoácidos que es la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2, en donde se añaden 1-20, preferiblemente 1-10, más preferiblemente 1-varios números (5, 4, 3 o 2) de aminoácidos, (iii) una secuencia de aminoácidos que es la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2, en la que se insertan 1-20, preferiblemente 1-10, más preferiblemente 1-varios (5, 4, 3 o 2) aminoácidos, (iv) una secuencia de aminoácidos que es la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2, en donde se sustituyen 1-20, preferiblemente 1-10, más preferiblemente 1-varios (5, 4, 3 o 2) aminoácidos con otros aminoácidos, o (v) una secuencia de aminoácidos obtenida combinándolos. 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 unos con otros y similares, es posible un mayor número de sustituciones y similares.

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

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



Con respecto a los puntos (b) o (c) mencionados anteriormente, la actividad enzimática que tiene la proteína enzimática que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N°: 2 no está particularmente limitada siempre que tenga al menos uno, preferiblemente todos, de (1) una actividad enzimática capaz de convertir un ácido graso insaturado que tiene 18 átomos de carbono y un doble enlace cis en la posición 12 (en adelante abreviado a veces como "ácido graso insaturado cis-12") utilizado como sustrato en un ácido graso hidroxilado que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 13 (ácido graso 13-hidroxi) (reacción 1), (2) una actividad enzimática capaz de convertir un ácido graso insaturado que tiene 16 átomos de carbono y un doble enlace cis en la posición 9 (en adelante abreviado a veces como "ácido graso insaturado cis-9") utilizado como sustrato a un ácido graso hidroxilado que tiene 16 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 10 (ácido graso 10-hidroxi) (reacción 2), (3) una actividad enzimática capaz de convertir un ácido graso insaturado que tiene 20 átomos de carbono y un doble enlace cis en la posición 14 (en adelante abreviado a veces como "ácido graso insaturado cis-14") utilizado como sustrato a un ácido graso hidroxilado que tiene 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 15 (ácido graso 15-hidroxi) (reacción 3), (4) una actividad enzimática capaz de convertir un ácido graso insaturado que tiene 18 o 20 átomos de carbono y un doble enlace cis en la posición 11 (en lo sucesivo a veces abreviado como "ácido graso insaturado cis-11") utilizado como sustrato a un ácido graso hidroxilado que tiene 18 o 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 12 (ácido graso 12-hidroxi) (reacción 4), una actividad enzimática capaz de convertir el ácido cis-4,cis-7,cis-10,cis-13,cis-16,cis-19-docosahexaenoico (DHA) en ácido 14-hidroxi-cis-4,cis-7,cis-10,cis-16,cis-19-docosapentaenoico (reacción A) y una actividad enzimática capaz de convertir el ácido cis-9-tetradecenoico (ácido miristoleico) en ácido 10-hidroxi-tetradecanoico (reacción I).

El "ácido graso insaturado cis-12", el "ácido graso insaturado cis-9", el "ácido graso insaturado cis-14" y el "ácido graso insaturado cis-11" mencionados anteriormente no están particularmente limitados siempre que sean un ácido graso insaturado que tenga 18 átomos de carbono y un doble enlace cis en la posición 12, un ácido graso insaturado que tenga 16 átomos de carbono y un doble enlace cis en la posición 9, un ácido graso insaturado que tiene 20 átomos de carbono y un doble enlace cis en la posición 14, un ácido graso insaturado que tiene 18 o 20 átomos de carbono y un doble enlace cis en la posición 11, respectivamente y, por ejemplo, se pueden mencionar ácido graso insaturado monovalente, ácido graso insaturado divalente, ácido graso insaturado trivalente, ácido graso insaturado tetravalente, ácido graso insaturado pentavalente y similares.. En la presente memoria descriptiva, el "ácido graso" abarca no solo ácidos libres sino también la forma de éster, sal con compuesto básico y similares. El "DHA" y el "ácido miristoleico" también abarcan no solo ácidos libres sino también la forma de éster, sal con compuesto básico y similares.

El FA-HY mencionado anteriormente puede aislarse de, por ejemplo, el hongo, medio de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* mediante una técnica de separación y purificación de proteínas conocida *per se*. Alternativamente, FA-HY puede usarse como el hongo de *Lactobacillus acidophilus* que contiene FA-HY o sus restos fúngicos. El hongo de

Lactobacillus acidophilus que contiene FA-HY no está particularmente limitado siempre que contenga el FA-HY mencionado anteriormente y, por ejemplo, se puede mencionar NITE BP-01788 depositado el 17 de enero de 2014 en el Banco de Microorganismos de Patente NITE (NITE Patent Microorganisms Depository, NPMD) y similares. Alternativamente, FA-HY también se puede producir como una proteína recombinante aislando un gen que codifica FA-HY, subclonándolo en un vector adecuado, introduciéndolo en un hospedante adecuado tal como Escherichia coli y similares, y cultivándolo. FA-HY puede ser purificado o purificado en bruto. Alternativamente, la hidratación puede expresarse en hongos tales como Escherichia coli y similares, y puede usarse el hongo en sí mismo o puede usarse medio de cultivo del mismo. Asimismo, la enzima puede estar en la forma libre o inmovilizada por diversos vehículos.

Como un vector que contiene un ácido nucleico que codifica el FA-HY mencionado anteriormente, uno adecuado para que se introduzca una célula hospedante con el vector puede seleccionarse apropiadamente de acuerdo con el objeto (por ejemplo, expresión de proteínas) y puede usarse. En el caso de un vector de expresión, contiene el ácido nucleico de la presente invención, que está operativamente unido a un promotor apropiado, y preferiblemente contiene una señal de terminación de la transcripción, es decir, la región del terminador, en dirección 3' del ácido nucleico de la presente invención. Además, también puede contener un gen marcador de selección para la selección de un transformante (gen de resistencia a fármacos, gen que complementa la mutación auxotrófica, etc.). Además, puede contener una secuencia que codifica una secuencia de etiqueta útil para la separación y purificación de la proteína expresada y similares. A su vez, el vector puede incorporarse al genoma de una célula hospedante diana. El vector de la presente invención puede introducirse en una célula hospedante diana mediante un método de transformación conocido *per se* tal como un método celular competente, un método de protoplastos, un método de coprecipitación de fosfato de calcio y similares.

En la presente memoria descriptiva, la "célula hospedante" puede ser cualquier célula siempre que pueda expresar un vector que contenga un ácido nucleico que codifique el FA-HY mencionado anteriormente, y puede ser una bacteria, levadura, hongos, célula eucariota superior y similares. Los ejemplos de la bacteria incluyen bacterias grampositivas como el bacilo, Streptomyces y similares, y bacterias gramnegativas como Escherichia coli y similares. Una célula recombinante introducida con un vector que contiene un ácido nucleico que codifica FA-HY puede cultivarse mediante un método conocido *per se* que es adecuado para la célula huésped.

La "purificación" del FA-HY mencionado anteriormente puede realizarse mediante un método conocido *per se*, por ejemplo, los hongos recogidos por centrifugación y similares se rompen por ultrasonidos o perlas de vidrio y similares, los sólidos, tales como restos celulares, se eliminan mediante centrifugación y similares, y similares para dar una disolución enzimática en bruto, que se somete a un método de extracción de sales usando sulfato de amonio, sulfato de sodio y similares, cromatografías tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad y similares, electroforesis en gel y similares.

El FA-HY mencionado anteriormente tiene, como se mencionó anteriormente, una actividad enzimática capaz de convertir ácido graso insaturado cis-12, ácido graso insaturado cis-9, ácido graso insaturado cis-14, ácido graso insaturado cis-11, DHA, ácido miristoleico utilizado como sustratos a ácido graso 13-hidroxi, ácido graso 10-hidroxi, ácido graso 15-hidroxi, ácido graso 12-hidroxi, ácido 14-hidroxi-cis-4,cis-7,cis-10,cis-16,cis-19-docosapentaenoico, ácido 10-hidroxitetradecanoico, respectivamente. Por lo tanto, la presente descripción también proporciona [1] un método para producir ácido graso 13-hidroxi a partir de ácido graso insaturado cis-12 mediante una reacción de hidratación usando el FA-HY (método de producción 1) mencionado anteriormente, [2] un método para producir ácido graso 10-hidroxi a partir de ácido graso insaturado cis-9 mediante una reacción de hidratación utilizando el FA-HY mencionado anteriormente (método de producción 2), [3] un método para producir ácido graso 15-hidroxi a partir de ácido graso insaturado cis-14 mediante una reacción de hidratación utilizando el FA-HY mencionado anteriormente (método de producción 3), [4] un método para producir ácido graso 12-hidroxi a partir de ácido graso insaturado cis-11 mediante una reacción de hidratación utilizando el FA-HY mencionado anteriormente (método de producción 4), [A] un método para producir ácido 14-hidroxi-cis-4, cis-7,cis-10,cis-16,cis-19-docosapentaenoico a partir de DHA mediante una reacción de hidratación utilizando el FA-HY mencionado (método de producción A), y [I] un método para producir ácido 10-hidroxi-tetradecanoico a partir de ácido miristoleico mediante una reacción de hidratación usando el FA-HY de la presente invención (método de producción I).

Los ejemplos del "ácido graso insaturado cis-12" en el método de producción 1 mencionado anteriormente incluyen ácido cis-9,cis-12-octadecadienoico (ácido linoleico), ácido cis-6,cis-9,cis-12-octadecatrienoico (ácido γ-linolénico), ácido cis-9,cis-12,cis-15-octadecatrienoico (ácido α-linolénico), ácido cis-6, cis-9, cis-12,cis-15-octadecatetraenoico (ácido estearidónico), así como ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-cis-6,cis-12-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-cis-12,cis-15-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-cis-6,cis-12,cis-15-octadecatrienoico, ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico, ácido 10-oxo-cis-6,cis-12-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-12,cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6,cis-12,cis-15-octadecatrienoico, ácido cis-5,cis-9,cis-12-octadecatrienoico (ácido pinolenico), ácido trans-5, cis-9,cis-12-octadecatrienoico (ácido columbínico), que ahora son producibles por el documento WO 2013/168310, y similares. Estos sustratos pueden obtenerse por un método diferente a aquel del documento WO 2013/168310.

Los ejemplos del "ácido graso 13-hidroxi" producido por el método de producción 1 mencionado anteriormente incluyen el ácido 13-hidroxi-cis-9-octadecenoico inducido a partir del ácido cis-9, cis-12-octadecadienoico (ácido linoleico), ácido 13-hidroxi-cis-6,cis-9-octadecadienoico inducido a partir del ácido cis-6,cis-9,cis-12-octadecatrienoico (ácido γ-

linolénico), ácido 13-hidroxi-cis-9,cis-15-octadecadienoico inducido a partir de ácido cis-9,cis-12,cis-15-octadecatrienoico (ácido α -linolénico), ácido 13-hidroxi-cis-6,cis-9,cis-15-octadecatrienoico inducido por cis-6,cis-9,cis-12, ácido cis-15-octadecatetraenoico (ácido estearidónico), ácido 10,13-dihidroxi-octadecanoico inducido a partir del ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-6-octadecenoico inducido a partir de 10-hidroxi-cis-6,cis-12-octadecadienoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-15-octadecenoico inducido a partir del ácido 10-hidroxi-cis-12,cis-15-octadecadienoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-6,cis-15-octadecadienoico inducido por ácido 10-hidroxi-cis-6,cis-12,cis-15-octadecatrienoico, ácido 10-oxo-13-hidroxi-cis-6-octadecenoico inducido por el ácido 10-oxo-cis-6,cis-12-octadecadienoico, ácido 10-oxo-13-hidroxi-cis-15-octadecenoico inducido por el ácido 10-oxo-cis-12,cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-13-hidroxi-cis-6,cis-15-octadecadienoico inducido por el ácido 10-oxo-cis-6,cis-12,cis-15-octadecatrienoico, ácido 13-hidroxi-cis-5,cis-9-octadecadienoico inducido a partir del ácido cis-5, cis-9,cis-12-octadecatrienoico (ácido pinolenico), ácido 13-hidroxi-trans-5,cis-9-octadecadienoico inducido a partir de ácido trans-5,cis-9,cis-12-octadecatrienoico (ácido columbínico) y similares.

Los ejemplos del "ácido graso insaturado cis-9" en el método de producción 2 mencionado anteriormente incluyen ácido cis-9-hexadecenoico (ácido pulmitoleico) y similares.

Los ejemplos del "ácido graso 10-hidroxi" producido por el método de producción 2 mencionado anteriormente incluyen ácido 10-hidroxi-hexadecanoico inducido a partir del ácido cis-9-hexadecenoico (ácido pulmitoleico) y similares.

Los ejemplos del "ácido graso insaturado cis-14" en el método de producción 3 mencionado anteriormente incluyen ácido cis-11,cis-14-eicosadienoico, ácido cis-11,cis-14,cis-17-eicosatrienoico, ácido cis-8,cis-11,cis-14-eicosatrienoico (ácido dihomo- γ -linolénico), cis-5, cis-8, cis-11, ácido cis-14-eicosatetraenoico (ácido araquidónico), ácido cis-8,cis-11,cis-14,cis-17-eicosatetraenoico, ácido cis-5,cis-11,cis-14-eicosatrienoico (ácido sciadónico), ácido cis-5, cis-11,cis-14,cis-17-eicosatetraenoico (ácido juniperónico) y similares.

Los ejemplos del "ácido graso 15-hidroxi" producido por el método de producción 3 mencionado anteriormente incluyen ácido 15-hidroxi-cis-11-eicosenoico inducido a partir del ácido cis-11,cis-14-eicosadienoico, ácido 15-hidroxi-cis-11,cis-17-eicosadienoico inducido por ácido cis-11, cis-14,cis-17-eicosatrienoico, ácido 15-hidroxi-cis-8,cis-11-eicosadienoico inducido por ácido cis-8, cis-11,cis-14-eicosatrienoico (ácido dihomo- γ -linolénico), ácido 15-hidroxi-cis-5,cis-8,cis-11-eicosatrienoico inducido por ácido cis-5,cis-8,cis-11,cis-14-eicosatetraenoico (ácido araquidónico), ácido 15-hidroxi-cis-8, cis-11, ácido cis-17-eicosatrienoico inducido por ácido cis-8, cis-11, cis-14,cis-17-eicosatetraenoico, ácido 15-hidroxi-cis-5,cis-11-eicosadienoico inducido por el ácido cis-5, cis-11,cis-14-eicosatrienoico (ácido sciadónico), ácido 15-hidroxi-cis-5,cis-11,cis-17-eicosatrienoico inducido por ácido cis-5,cis-11,cis-14,cis-17-eicosatetraenoico (ácido juniperónico) y similares.

Los ejemplos del "ácido graso insaturado cis-11" en el método de producción 4 mencionado anteriormente incluyen ácido cis-11-octadecenoico (ácido cis-vaccénico), cis-11, ácido cis-14-eicosadienoico, ácido cis-11 cis-14,cis-17-eicosatrienoico, ácido cis-8, cis-11,cis-14-eicosatrienoico (ácido dihomo- γ -linolénico), ácido cis-5,cis-8,cis-11-eicosatrienoico (ácido Mead) , ácido cis-8, cis-11,cis-14,cis-17-eicosatetraenoico, ácido cis-5, cis-8, cis-11,cis-14-eicosatetraenoico (ácido araquidónico) y similares.

Los ejemplos del "ácido graso 12-hidroxi" producido por el método de producción 4 mencionado anteriormente incluyen el ácido 12-hidroxi-octadecanoico inducido a partir del ácido cis-11-octadecenoico (ácido cis-vaccénico), ácido 12-hidroxi-cis-14-eicosenoico inducido por el ácido cis-11,cis-14-eicosadienoico, ácido 12-hidroxi-cis-14,cis-17-eicosadienoico inducido por el ácido cis-11,cis-14,cis-17-eicosatrienoico, ácido 12-hidroxi-cis-8,cis-14-eicosadienoico inducido a partir de ácido cis-8,cis-11,cis-14-eicosatrienoico (ácido dihomo- γ -linolénico), ácido 12-hidroxi-cis-5,cis-8-eicosadienoico inducido a partir de ácido cis-5,cis-8,cis-11-eicosatrienoico (ácido Mead), ácido 12-hidroxi-cis-8, cis-14,cis-17-eicosatrienoico inducido por el ácido cis-8, cis-11,cis-14,cis-17-eicosatetraenoico, ácido 12-hidroxi-cis-5,cis-8,cis-14-eicosatrienoico inducido a partir del ácido cis-5,cis-8, cis-11,cis-14-eicosatetraenoico (ácido araquidónico) y similares.

La reacción de hidratación puede realizarse en un tampón adecuado (por ejemplo, tampón fosfato, tampón tris, tampón borato, etc.) mezclando ácido graso insaturado, que es un sustrato, y el FA-HY mencionado anteriormente a concentraciones adecuadas e incubando la mezcla. La concentración de sustrato es, por ejemplo, 1-1000 g/l, preferiblemente 10-500 g/l, más preferiblemente 20-250 g/l. La cantidad del FA-HY mencionado anteriormente que se va a añadir es, por ejemplo, 0,001-10 mg/ml, preferiblemente 0,1-5 mg/ml, más preferiblemente 0,2-2 mg/ml.

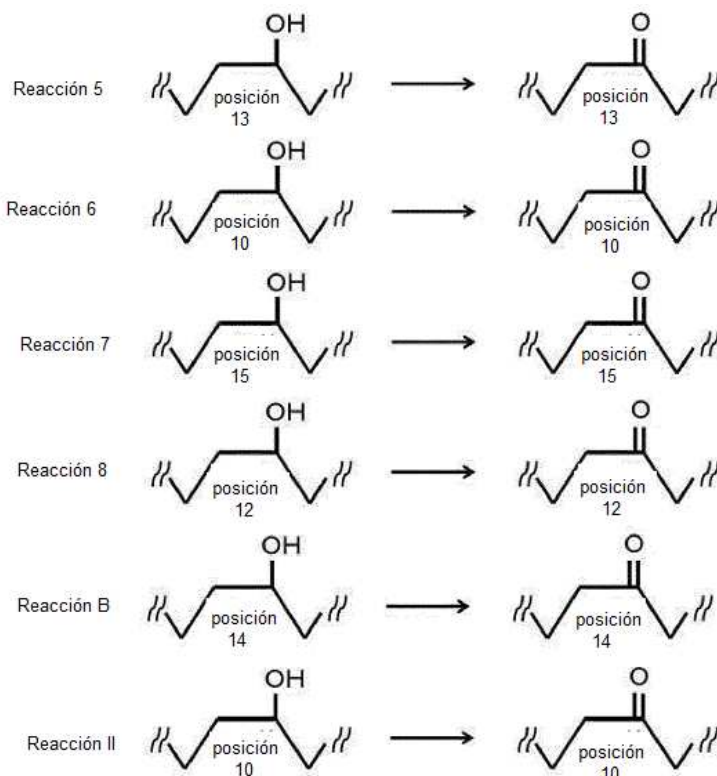
Se puede usar un "cofactor" para la reacción de hidratación (reacción 1-4, reacción A o reacción I) y, por ejemplo, se puede usar FAD y similares. La concentración de adición puede ser cualquiera siempre que la reacción de hidratación se desarrolle eficientemente. Es preferiblemente de 0,001 a 20 mM, más preferiblemente de 0,01 a 10 mM.

Además, se puede usar un "activador" para la reacción de hidratación y, por ejemplo, se pueden mencionar 1 o 2 compuestos seleccionados del grupo que consiste en NADH y NADPH. La concentración de adición de los mismos puede ser cualquiera siempre que la reacción de hidratación se desarrolle eficientemente. Es preferiblemente de 0,1 a 20 mM, más preferiblemente de 1 a 10 mM.

La reacción de hidratación se realiza deseablemente a una temperatura preferible y en un intervalo de pH preferible para el FA-HY mencionado anteriormente. Por ejemplo, la temperatura de reacción es 5-50 °C, preferiblemente 20-45

°C. El pH de la mezcla de reacción es, por ejemplo, pH 4-10, preferiblemente pH 5-9. El tiempo de reacción no está particularmente limitado y es, por ejemplo, 10 min-72 h, preferiblemente 30 min-36 h.

En una realización preferible de la presente invención, el FA-HY mencionado anteriormente se proporciona al sistema de reacción en forma de células recombinantes (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, levadura, célula de insecto, célula animal, etc.) introducidas con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que lo codifica. En este caso, la reacción de hidratación también se puede realizar cultivando las células en un medio líquido adecuado para el cultivo de las células y agregadas con cofactor y un sustrato y, cuando sea necesario, un activador.



Además, mediante una reacción de deshidrogenación u oxidación química utilizando ácido de cromo, se produce un ácido graso oxo que tiene 18 átomos de carbono y un grupo carbonilo en la posición 13 (en adelante abreviado a veces como "ácido graso 13-oxo") a partir de ácido graso 13-hidroxi obtenido en los métodos de producción 1 a 4 mencionados anteriormente, método de producción A, método de producción I (reacción 5), un ácido graso oxo que tiene 16 átomos de carbono y un grupo carbonilo en la posición 10 (en adelante abreviado a veces como "ácido graso 10-oxo") se produce a partir de ácido graso 10-hidroxi (reacción 6), un ácido graso oxo que tiene 20 átomos de carbono y un grupo carbonilo en la posición 15 (en lo sucesivo a veces abreviado como "ácido graso 15-oxo") se produce a partir de ácido graso 15-hidroxi (reacción 7), un ácido graso oxo que tiene 18 o 20 átomos de carbono y un grupo carbonilo en la posición 12 (en lo sucesivo a veces abreviado como "ácido graso 12-oxo") se produce a partir del ácido graso 12-hidroxi (reacción 8), ácido 14-oxo-cis-4, cis-7, cis-10, cis-16, cis-19-docosapentaenoico se produce a partir del ácido 14-hidroxi-cis-4, cis-7 cis-10, cis-16, cis-19-docosapentaenoico (reacción B), y el ácido 10-oxo-tetradecanoico se produce a partir del ácido 10-hidroxi-tetradecanoico (reacción II).

Por lo tanto, la presente descripción también proporciona [5] un método para producir ácido graso 13-oxo, que comprende someter ácido graso insaturado cis-12 a una reacción de hidratación usando el FA-HY mencionado anteriormente para inducir ácido graso 13-hidroxi, y someter el ácido graso 13-hidroxi a una reacción de deshidrogenación u oxidación química (método de producción 5), [6] un método para producir ácido graso 10-oxo, que comprende someter el ácido graso insaturado cis-9 a una reacción de hidratación utilizando el FA-HY mencionado anteriormente para inducir ácido graso 10-hidroxi y someter el ácido graso 10-hidroxi a una reacción de deshidrogenación u oxidación química (método de producción 6), [7] un método para producir ácido graso 15-oxo, que comprende someter ácido graso insaturado cis-14 a una reacción de hidratación usando el FA-HY mencionado anteriormente para inducir ácido graso 15-hidroxi, y someter el ácido graso 15-hidroxi a una reacción de deshidrogenación u oxidación química (método de producción 7), [8] un método de producción ácido graso 12-oxo, que comprende someter el ácido graso insaturado cis-11 a una reacción de hidratación utilizando el FA-HY mencionado anteriormente para inducir el ácido graso 12-hidroxi, y someter el ácido graso 12-hidroxi a una reacción de deshidrogenación u oxidación química (método de producción 8), [B] un método para producir ácido 14-oxo-cis-4, cis-7, cis-10, cis-16, cis-19-docosapentaenoico, que comprende someter DHA a una reacción de hidratación usando

el FA-HY de la presente invención para inducir ácido 14-hidroxi-cis-4, cis-7, cis-10, cis-16, cis-19-docosapentaenoico, y someter el ácido 14-hidroxi-cis-4, cis-7, cis-10, cis-16, cis-19-docosapentaenoico a una reacción de deshidrogenación u oxidación química (método de producción B), y [II] un método para producir ácido 10-oxo-tetradecanoico, que comprende someter el ácido miristoleico a una reacción de hidratación utilizando el FA-HY de la presente invención para inducir ácido 10-hidroxitetradecanoico, y someter el ácido 10-hidroxitetradecanoico a una reacción de deshidrogenación u oxidación química (método de producción II).

El "ácido graso insaturado cis-12", "ácido graso insaturado cis-9", "ácido graso insaturado cis-14", "ácido graso insaturado cis-11" en los métodos de producción 5-8 mencionados anteriormente son los mismos que los sustratos en los métodos de producción mencionados anteriormente 1-4.

Los ejemplos del "ácido graso 13-oxo" producido por el método de producción 5 mencionado anteriormente incluyen ácido 13-oxo-cis-9-octadecenoico inducido por ácido cis-9, cis-12-octadecadienoico (ácido linoleico), ácido 13-oxo-cis-6, cis-9-octadecadienoico inducido por el ácido cis-6, cis-9, cis-12-octadecatrienoico (ácido γ -linolénico), ácido 13-oxo-cis-9, cis-15-octadecadienoico inducido por ácido cis-9, cis-12, cis-15-octadecatrienoico (ácido α -linolénico), ácido 13-oxo-cis-6, cis-9, cis-15-octadecatrienoico inducido por ácido cis-6, cis-9, cis-12, cis-15-octadecatetraenoico (ácido estearidónico), ácido 10,13-dioxo-octadecanoico inducido a partir del ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico o ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico, 10,13-dioxo-cis-6-octadecenoico inducido a partir de ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-12-octadecadienoico o ácido 10-oxo-cis-6, cis-12-octadecadienoico, ácido 10,13-dioxo-cis-15-octadecenoico inducido a partir de ácido 10-hidroxi-cis-12, cis-15-octadecadienoico o ácido 10-oxo-cis-12, cis-15-octadecadienoico, ácido 10,13-dioxo-cis-6, cis-15-octadecadienoico inducido a partir del ácido 10-hidroxi-cis-6, cis-12, cis-15-octadecatrienoico o ácido 10-oxo-cis-6, cis-12, cis-15-octadecatrienoico, ácido 13-oxo-cis-5, cis-9-octadecadienoico inducido a partir de ácido cis-5, cis-9, cis-12-octadecatrienoico (ácido pinolenico), ácido 13-oxo-trans-5, cis-9-octadecadienoico inducido a partir de ácido trans-5, cis-9, cis-12-octadecatrienoico (ácido columbínico) y similares.

Los ejemplos del "ácido graso 10-oxo" producido por el método de producción 6 mencionado anteriormente incluyen el ácido 10-oxo-hexadecanoico inducido a partir del ácido cis-9-hexadecenoico (ácido pulmitoleico) y similares.

Los ejemplos del "ácido graso 15-oxo" producido por el método de producción 7 mencionado anteriormente incluyen ácido 15-oxo-cis-11-eicosenoico inducido a partir de ácido cis-11, cis-14-eicosadienoico, ácido 15-oxo-cis-11, cis-17-eicosadienoico inducido a partir de ácido cis-11, cis-14, cis-17-eicosatrienoico, ácido 15-oxo-cis-8, cis-11-eicosadienoico inducido a partir de ácido cis-8, cis-11, cis-14-eicosatrienoico (ácido dihomo- γ -linolénico), ácido 15-oxo-cis-5, cis-8, cis-11-eicosatrienoico inducido a partir del ácido cis-5, cis-8, cis-11, cis-14-eicosatetraenoico (ácido araquidónico), ácido 15-oxo-cis-8, cis-11, cis-17-eicosatrienoico inducido a partir del ácido cis-8, cis-11, cis-14, cis-17-eicosatetraenoico, ácido 15-oxo-cis-5, cis-11-eicosadienoico inducido por el ácido cis-5, cis-11, cis-14-eicosatrienoico (ácido sciadónico), ácido 15-oxo-cis-5, cis-11, cis-17-eicosatrienoico inducido por ácido cis-5, cis-11, cis-14, cis-17-eicosatetraenoico (ácido juniperónico) y similares.

Los ejemplos del "ácido graso 12-oxo" producido por el método de producción 8 mencionado anteriormente incluyen ácido 12-oxo-octadecanoico inducido por ácido cis-11-octadecenoico (ácido cis-vaccénico), ácido 12-oxo-cis-14-eicosenoico inducido por el ácido cis-11, cis-14-eicosadienoico, ácido 12-oxo-cis-14, cis-17-eicosadienoico inducido por el ácido cis-11, cis-14, cis-17-eicosatrienoico, ácido 12-oxo-cis-8, cis-14-eicosadienoico inducido a partir de ácido cis-8, cis-11, cis-14-eicosatrienoico (ácido dihomo- γ -linolénico), ácido 12-oxo-cis-5, cis-8-eicosadienoico inducido a partir de ácido cis-5, cis-8, cis-11-eicosatrienoico (ácido de Mead), ácido 12-oxo-cis-8, cis-14, cis-17-eicosatrienoico inducido por ácido cis-8, cis-11, cis-14, cis-17-eicosatetraenoico, ácido 12-oxo-cis-5, cis-8, cis-14-eicosatrienoico inducido por el ácido cis-5, cis-8, cis-11, cis-14-eicosatetraenoico (ácido araquidónico) y similares.

La deshidrogenasa que se utilizará en los métodos de producción 5 a 8 mencionados anteriormente, el método de producción B o el método de producción II no está particularmente limitada siempre que sea una enzima capaz de convertir ácido graso 13-hidroxi, ácido graso 10-hidroxi, ácido graso 15-hidroxi, ácido graso 12-hidroxi, ácido 14-hidroxi-cis-4, cis-7, cis-10, cis-16, cis-19-docosapentaenoico, ácido 10-hidroxi-tetradecanoico utilizado como sustratos a ácido graso 13-oxo, ácido graso 10-oxo, ácido graso 15-oxo, ácido graso 12-oxo, ácido 14-oxo-cis-4, cis-7, cis-10, cis-16, cis-19-docosapentaenoico, ácido 10-oxo-tetradecanoico, respectivamente y, por ejemplo, es preferible el ácido graso hidroxilado derivado de lactobacilos-deshidrogenasa (CLA-DH). Se prefiere más CLA-DH derivado de *Lactobacillus plantarum*, y particularmente se prefiere CLA-DH derivado de la cepa de *L. plantarum* FERM BP-10549. CLA-DH se puede obtener por el método descrito en el documento JP-A-2007-259712, el método descrito en el documento WO 2013/168310. La deshidrogenasa puede ser una purificada o purificada en bruto. Alternativamente, la deshidrogenasa puede expresarse en hongos tales como *Escherichia coli* y similares, y puede usarse el hongo en sí mismo o puede usarse medio de cultivo del mismo. Además, la enzima puede estar en la forma libre o inmovilizada por diversos vehículos.

La reacción de deshidrogenación se realiza en un tampón adecuado (p. ej., tampón fosfato, tampón tris, tampón borato, etc.) mezclando ácido graso 13-hidroxi, ácido graso 10-hidroxi, ácido graso 15-hidroxi, ácido graso 12-hidroxi, como sustratos y deshidrogenasa a concentraciones adecuadas e incubando la mezcla. La concentración de sustrato es, por ejemplo, 0,01-100 g/l, preferiblemente 0,05-50 g/l, más preferiblemente 0,1-5 g/l. La cantidad de deshidrogenasa a añadir es, por ejemplo, 0,001-10 mg/ml, preferiblemente 0,005-1 mg/ml, más preferiblemente 0,05-0,2 mg/ml.

Se puede usar un "cofactor" para la reacción de deshidrogenación y, por ejemplo, se pueden emplear NAD⁺, NADP⁺ y similares. La concentración de adición de los mismos puede ser cualquiera siempre que la reacción de hidratación se desarrolle eficientemente. Es preferiblemente de 0,001 a 20 mM, más preferiblemente de 0,01 a 10 mM.

5 La reacción de deshidrogenación se realiza deseablemente dentro de los intervalos de temperatura preferible y pH preferible de deshidrogenasa. Por ejemplo, la temperatura de reacción es 5-50 °C, preferiblemente 20-45 °C. El pH de la mezcla de reacción es, por ejemplo, pH 4-10, preferiblemente pH 5-9. El tiempo de reacción no está particularmente limitado y es, por ejemplo, 10 min-72 h, preferiblemente 30 min-36 h.

10 En una realización, la deshidrogenasa se somete al sistema de reacción en forma de células recombinantes (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, levadura, célula de insecto, célula animal, etc.) introducidas con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que lo codifica. En este caso, la reacción de oxidación también se puede realizar cultivando las células en un medio líquido adecuado para el cultivo de las células y agregadas con un sustrato y, cuando sea necesario, un cofactor y un activador.

Además, al reemplazar la reacción de deshidrogenación con una oxidación química usando ácido crómico, se puede obtener químicamente un ácido graso oxo similar al de la reacción enzimática.

15 Como la oxidación química, se pueden mencionar métodos conocidos *per se*, por ejemplo, oxidación de ácido crómico, preferiblemente oxidación de Jones y similares. Como el ácido crómico, se pueden emplear sales o complejos del compuesto como el ácido crómico anhidro CrO₃, ácido crómico H₂CrO₄ y ácido dicrómico H₂Cr₂O₇.

20 Para ser específicos, se añaden ácido sulfúrico (2,3 ml) y agua (7,7 ml) al ácido crómico anhidro (2,67 g), y se agrega acetona (90 ml) a la mezcla para dar una disolución de ácido crómico. Se agregan 2 g de ácido graso hidroxilado y 40 ml de acetona en un matraz Erlenmeyer, y la disolución de ácido crómico mencionada anteriormente se agrega por una gota mientras se agita en un agitador sobre hielo. Cuando la disolución cambia de azul a verde té, se detiene la adición gota a gota de la disolución de ácido crómico y se suspende la reacción con alcohol isopropílico. El sedimento precipitado se filtra a través de papel de filtro, se coloca en un embudo de separación, se añaden éter dietílico (150 ml) y agua Milli-Q (300 ml), la mezcla se agita bien y la capa de éter dietílico se lava varias veces con agua Milli-Q. A 25 la capa de éter dietílico, después del lavado, se le agrega una cantidad apropiada de sulfato de sodio (anhidro), la mezcla se agita y se elimina el agua residual. El sulfato de sodio anhidro agregado se separa por filtración con papel de filtro, la capa de éter dietílico obtenida se concentra mediante un evaporador rotatorio, y se extraen el producto de reacción (ácido graso oxo) y el sustrato sin reaccionar.

30 Un extracto obtenido por una reacción de oxidación con ácido crómico anhidro (mezcla que contiene sustrato y producto resultante (ácido graso oxo)) se somete a cromatografía a presión moderada, una disolución que sale de la columna se recupera en fracciones. Cada fracción recuperada se analiza por LC/MS y cromatografía de gases, las fracciones que contienen ácido graso oxo solo se recogen y se concentran mediante un evaporador rotativo. Una parte del producto resultante final obtenido es metilesterificada, la pureza del ácido graso oxo se evalúa por cromatografía de gases, y se puede obtener el ácido graso oxo con una pureza no inferior al 98%.

35 Un agente antiinflamatorio que contiene el derivado de ácido graso raro de la presente invención es para uso en la profilaxis o mejora de enfermedades inflamatorias. La "enfermedad inflamatoria" no está limitada siempre que acompañe a una reacción inflamatoria *in vivo*, y se prefiere una "enfermedad inflamatoria que involucre macrófagos". Los ejemplos de la "enfermedad inflamatoria" incluyen gota, arteriosclerosis, úlcera gástrica, nefritis (glomerulonefritis, nefropatía por IgA, nefropatía diabética, etc.), enfermedad periodontal (inflamación de las encías, pericoronitis, etc.), 40 hepatitis (hepatitis alcohólica, hepatitis no alcohólica, etc.), cirrosis, asma, bronquitis, infarto cerebral, aneurisma, alergia tardía, endometriosis, síndrome de dificultad respiratoria aguda, trastorno por trasplante renal, infarto agudo de miocardio, diabetes, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, dermatitis atópica, neumonía, artritis (artritis de tipo reumatoide crónica, etc.), choque endotóxico, septicemia debida a infecciones, colitis ulcerosa crónica, bronquitis crónica, cistitis, osteomielitis crónica, esofagitis erosiva, colangitis, colecistitis crónica, gastritis, inflamación 45 crónica del cuello uterino, la siguiente enfermedad de inflamación nerviosa, cáncer causado por inflamación y similares. De estos, la "enfermedad inflamatoria que involucra macrófagos" incluye, por ejemplo, hepatitis, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, dermatitis atópica, artritis, neuropatía diabética y demencia.

Además, un agente antiinflamatorio que contiene el derivado de ácido graso raro como se describe en el presente documento también se puede aplicar a la profilaxis o mejora de enfermedades de inflamación nerviosa. La 50 "enfermedad de inflamación nerviosa" se refiere a una enfermedad causada por la inflamación del nervio, y el agente también se puede usar para la profilaxis o la mejora de la neuropatía diabética, la demencia (tipo Alzheimer, etc.), la esclerosis múltiple y similares. Alternativamente, un agente antiinflamatorio que contiene el derivado de ácido graso raro como se describe en el presente documento también se puede aplicar a la profilaxis o mejora del cáncer causado por la inflamación. El "cáncer causado por la inflamación" es un cáncer resultante de la inflamación crónica, y el agente 55 también puede usarse para la profilaxis o la mejora de, por ejemplo, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de lengua, cáncer de piel, cáncer de esófago, melanoma, cáncer del conducto biliar, cáncer de intestino grueso, cáncer de vesícula biliar, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado y similares.

Además, el derivado de ácido graso raro como se describe en el presente documento también se puede usar como un inhibidor del macrófago M1. El macrófago activado se convierte en macrófago M1, produce mediadores inflamatorios como el óxido nítrico (NO), prostaglandina E2, TNF- α y similares, y causa inflamaciones crónicas. Como se muestra en los ejemplos mencionados a continuación, el derivado de ácido graso raro de la presente invención tiene el efecto de suprimir la cantidad de producción de NO por el macrófago M1 e inducir la diferenciación de macrófagos y monocitos, que es una célula progenitora del mismo, en macrófagos M2. La diferenciación en macrófagos M2 también puede ser inducida por una acción directa sobre monocitos o macrófagos antes de la diferenciación, así como por una acción indirecta obtenida colocando el intestino en un ambiente dominante de citocina Th2. Por lo tanto, las enfermedades inflamatorias que involucran a los macrófagos se pueden prevenir o mejorar mediante la supresión de la producción de NO por los macrófagos M1, y la supresión de la diferenciación en macrófagos M1 promoviendo la diferenciación de macrófagos y monocitos en macrófagos M2.

Asimismo, el derivado de ácido graso raro que se describe en este documento también se puede usar como un inhibidor de la muerte celular basado en el estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un estrés causado por el oxígeno activo, y los ejemplos del oxígeno activo incluyen H₂O₂, superóxido, radical hidroxilo, oxígeno y similares. El oxígeno activo promueve la producción de citocinas inflamatorias y causa enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, las enfermedades inflamatorias se pueden prevenir o mejorar reduciendo el estrés oxidativo.

Alternativamente, el derivado de ácido graso raro que se describe en el presente documento también se puede usar como un promotor de la expresión de HO-1. HO-1 es una enzima importante como mecanismo de defensa en el cuerpo que protege a las células del estrés oxidativo. La falta de HO-1 promueve el daño celular debido al estrés oxidativo y promueve la inflamación. Por lo tanto, las enfermedades inflamatorias se pueden prevenir o mejorar promoviendo la expresión de HO-1.

Además, el derivado de ácido graso raro que se describe en el presente documento también se puede usar como un promotor de la expresión intranuclear de Nrf2. Cuando se promueve la expresión intranuclear de Nrf2, Nrf2 controla la reacción adoptiva del estrés oxidativo y suprime la inflamación. Por ende, las enfermedades inflamatorias se pueden prevenir o mejorar promoviendo la expresión intranuclear de Nrf2.

Un agente antiinflamatorio (o inhibidor de macrófagos M1, inhibidor de la muerte celular basado en estrés oxidativo, promotor de expresión HO-1 o promotor de expresión intranuclear Nrf2) que contiene el derivado de ácido graso raro para uso de acuerdo con la presente invención puede ser, por ejemplo, un producto farmacéutico, un alimento, un pienso, un cosmético y similares, o el agente se puede añadir a estos.

La forma de dosificación del producto farmacéutico incluye dispersión, gránulo, píldora, cápsula blanda, cápsulas duras, comprimido, comprimido masticable, comprimido de integración rápida, jarabe, líquido, suspensión, supositorio, pomada, crema, gel, adhesivo, inhalante, inyección y similares. Una preparación de los mismos se prepara según un método convencional. Dado que los derivados de ácidos grasos raros son poco solubles en agua, se disuelven en un disolvente orgánico no hidrófilo, como aceite derivado de vegetales, aceite derivado de animales y similares, o se dispersan o emulsionan en una disolución acuosa junto con un emulsionante, un agente dispersante, un tensioactivo y similares por un homogeneizador (homogeneizador de alta presión) y se utilizan.

Los ejemplos de los aditivos que pueden usarse para formular 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 sardina y similares, polialcoholes tales como polietilenglicol, propilenglicol, glicerol, sorbitol y similares, tensioactivos tales como éster de ácido graso de sorbitán, éster de ácido graso de sacarosa, éster de ácido graso de glicerina, éster de ácido graso de poliglicerol y similares, excipientes como agua purificada, lactosa, almidón, celulosa cristalina, D-manitol, lecitina, goma arábiga, disolución de sorbitol, disolución de carbohidratos y similares, edulcorante, colorante, ajustador de pH, saporífero y similares. Una preparación líquida puede disolverse o suspenderse en agua u otro medio adecuado cuando está en uso. Además, los comprimidos y los gránulos pueden recubrirse mediante un método ya conocido.

Para la administración en forma de inyección, es preferible la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intraperiostica, sublingual, se prefieren las administraciones orales y similares, y es particularmente preferible la administración intravenosa o intraperitoneal. La administración intravenosa puede ser cualquiera de administración por goteo y administración en bolo.

Cuando el agente antiinflamatorio para su uso según la presente invención es un alimento o un aditivo alimentario, la forma del alimento no está particularmente limitada siempre que permita la ingesta oral, tal como disolución, suspensión, polvo, artículo formado sólido y similares. Los ejemplos específicos incluyen suplementos (polvo, gránulos, cápsulas blandas, cápsulas duras, comprimidos, comprimidos masticables, comprimidos de integración rápida, jarabe, líquidos, etc.), bebidas (bebidas de ácido carbónico, bebidas de ácido láctico, bebidas deportivas, bebidas de jugos de frutas, bebidas de vegetales, bebidas de leche de soja, bebidas de café, bebidas de té, bebidas en polvo, bebidas concentradas, bebidas nutritivas, bebidas alcohólicas, etc.), productos de confitería (gominolas, jaleas, chicles, chocolate, galletas, dulces, caramelo, confitería japonesa, merienda, etc.), alimentos instantáneos (fideos instantáneos, alimentos de retorta, latas, alimentos para microondas, sopas instantáneas, sopas de miso, alimentos liofilizados, etc.), aceites, alimentos con grasas y aceites (mayonesa, aderezo, mantequilla, crema, margarina, etc.), productos con trigo molido (pan, pasta, fideos, mezcla para pasteles, miga de pan, etc.), condimentos

(salsa, condimentos de procesamiento de tomate, condimentos de sabor, mezclas para cocinar, sopas, etc.), productos cárnicos procesados (jamón, salchichas, etc.).

Los alimentos mencionados anteriormente 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, zinc, hierro, sodio, potasio, selenio, etc.), fibra dietética, agente dispersante, estabilizante como emulsionante y similares, edulcorante, componentes de sabor (ácido cítrico, ácido málico, etc.), sabor, jalea real, propóleos, Agaricus y similares.

Cuando el agente antiinflamatorio para su uso según la presente invención es un pienso o un aditivo para pienso, el pienso es, por ejemplo, alimento para mascotas, aditivo para piensos o acuicultura y similares.

Cuando el agente antiinflamatorio para usar según la presente invención es un cosmético o un aditivo cosmético, el cosmético es, por ejemplo, crema, gel, leche para la piel, suero, tónico, esencia de microemulsión, máscara facial, base, colorete labial, sombra de ojos, champú, acondicionador, aditivo de baño y similares, y un sabor y similares pueden mezclarse con ellos.

Solo se puede mezclar un tipo de derivado de ácido graso raro con el producto farmacéutico, alimento, pienso, cosmético y similares para usar de acuerdo con la presente invención o se pueden usar dos o más tipos de los mismos en combinación.

La dosis del producto farmacéutico de la presente invención o la cantidad de ingesta del alimento de la presente invención se puede determinar apropiadamente de acuerdo con la edad y el peso corporal de los pacientes o aquellos que ingieren los mismos, los síntomas, el tiempo de administración, la forma de administración, el método de administración, la combinación de medicamentos y similares. Por ejemplo, cuando el producto farmacéutico de la presente invención se administra por vía oral, la cantidad total del derivado de ácido graso raro como ingrediente activo es 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, por administración parenteral, que pueden administrarse una vez al día o en varias (2-5) porciones por día. Cuando se ingiere como alimento, se puede agregar a un alimento de manera tal que la cantidad total de ingesta del derivado de ácido graso raro como ingrediente activo sea 1-6000 mg, preferiblemente 10-3000 mg, por día para un adulto. La cantidad de ingesta del pienso de la presente invención y la cantidad de uso del cosmético de la presente invención pueden determinarse cada una de manera apropiada según la cantidad de ingesta del alimento mencionada anteriormente y la dosis del producto farmacéutico mencionada anteriormente.

La presente invención se explica con más detalle a continuación haciendo referencia a los Ejemplos. Los ejemplos son simples ilustraciones de la presente invención y no limitan el alcance de la presente invención de ninguna manera.

[Ejemplos]

Los siguientes derivados de ácidos grasos raros (No. 4-No. 23) usados en la presente invención se prepararon en base a los métodos mencionados anteriormente, y otros ácidos grasos (No. 1-No. 3, No. 24, LA, ALA, GLA) se compraron como reactivos generales. BAY11-7082, que es un inhibidor de la fosforilación de I κ B α , se adquirió de Cayman Chemical, y otros reactivos se adquirieron de Wako Pure Chemical Industries, Ltd. o Nacalai Tesque y otros.

No. 1: ácido trans-10,cis-12-octadecadienoico

No. 2: ácido cis-9, trans-11-octadecadienoico

No. 3: ácido trans-9, trans-11-octadecadienoico

No. 4: ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico

No. 5: ácido 10-hidroxi-octadecanoico

No. 6: ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico

No. 7: ácido 10-hidroxi-cis-12, cis-15-octadecadienoico

No. 8: ácido 10-oxo-cis-12, cis-15-octadecadienoico

No. 9: ácido 10-oxo-cis-6, cis-12-octadecadienoico

No. 10: ácido 12-hidroxi-octadecanoico (Referencia)

No. 11: ácido 10-oxo-trans-11-octadecenoico (Referencia)

No. 12: ácido 10-oxo-trans-11,cis-15-octadecadienoico

No. 13: ácido 10-oxo-cis-6, trans-11-octadecadienoico

No. 14: ácido 13-hidroxi-cis-9-octadecenoico

No. 15: ácido 13-oxo-cis-9-octadecenoico

No. 16: ácido 13-oxo-cis-9,cis-15-octadecadienoico

No. 17: ácido 13-oxo-cis-6,cis-9-octadecadienoico

5 No. 18: ácido 10,13-dihidroxi-octadecanoico

No. 19: ácido 13-hidroxi-cis-6,cis-9-octadecadienoico

No. 20: ácido 10,13-dihidroxi-cis-6-octadecenoico

No. 21: ácido 10-hidroxi-cis-6,cis-12-octadecadienoico

No. 22: ácido 13-hidroxi-cis-9, cis-15-octadecadienoico

10 No. 23: ácido 10,13-dihidroxi-cis-15-octadecenoico

No. 24: ácido trans-9, trans-11,trans-13-octadecatrienoico

LA: ácido linoleico

GLA: ácido γ -linolénico

ALA: ácido α -linolénico

15 tBHQ: terc-butilhidroquinona

Ejemplo 1 (evaluación de la cantidad de producción de NO por el método de Griess)

La línea celular similar a macrófagos derivada de ratón RAW264.7 se sembró en una placa de 48 pocillos 1 x 10⁵ células por pocillo. Después del cultivo durante 5 h, se añadió lipopolisacárido derivado de *Escherichia coli* (LPS) a 100 ng/ml durante 24 h para activar las células RAW264.7. Simultáneamente con LPS, se agregaron varios compuestos (No. 1-No. 17, LA, ALA) a 10 μ M, y se midió la concentración de ácido nitroso (NO₂⁻), que es un óxido de óxido nítrico (NO) producido por activación de macrófagos, en el medio de cultivo. La cantidad de NO₂ en el medio de cultivo se cuantificó por el método de Griess y en referencia a Shan Lin et al., Molecular Nutrition and Food Research 57 (2013) pág. 1135-1144, "Auraptene suppresses inflammatory responses in activated RAW264 macrophages by inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase activation", la sección de Mediciones de materiales y métodos de concentraciones de TNF- α , MCP-1 y NO. La cuantificación se realizó de hecho de la siguiente manera. Se recuperó el medio de cultivo RAW264.7 tratado con LPS y diversos compuestos durante 24 h. Se mezclaron 0,2% de N-(1-naftil) etilendiamina y 2% de sulfanilamida/10% de H₃PO₄ a 1: 1 inmediatamente antes de la reacción para dar un reactivo de Griess, el medio de cultivo RAW264.7 y el reactivo de Griess se mezclaron a 1: 1 y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de completar la reacción, se midió la absorbancia a 550 nm. Se utilizó NaNO₂ como el producto estándar de NO₂⁻, y se calculó la concentración de NO₂⁻ en el medio de cultivo. La concentración de la muestra se ajustó con etanol. Se usó etanol como control negativo, y BAY11-7082 (5 μ M), que es un inhibidor de la fosforilación de I κ B α , se usó como control positivo. Los resultados se muestran en la Fig. 1.

Ejemplo 2 (evaluación de la actividad antiestrés para H₂O₂)

La línea celular HepG2 derivada del cáncer de hígado humano se cultivó en D-MEM (FBS al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 μ g/ml), se sembró en una placa de 96 pocillos a 3,0x10⁴ células/pocillo y se cultivó a 37 °C, 5% de CO₂ por 24 h. Varios compuestos (tBHQ, No. 11-No. 13) se disolvieron en D-MEM sin suero (100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina, 0,1% de BSA, 0,3% de etanol) para preparar medios de prueba con concentraciones ajustadas. El sobrenadante se eliminó de la placa de 96 pocillos, el medio de prueba mencionado anteriormente se añadió a 100 μ l/pocillo, y las células se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ por 24 h. Posteriormente, el sobrenadante se retiró nuevamente de la placa de 96 pocillos, se añadió D-MEM 5 mM que contenía H₂O₂ (100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina) a 100 μ l/pocillo, 37 °C, y las células se cultivaron a 5% de CO₂ por 30 min. El sobrenadante se retiró de la placa de 96 pocillos, se añadió D-MEM que contenía reactivo WST-1 (7 μ g/ml de 1-Methosy PMS, 33 μ g/ml WST-1) a 100 μ l/pocillo, las células se cultivaron a 37 °C, 5% de CO₂ durante 2 horas, y se midió la absorbancia a 450 nm. Los resultados se muestran en las Fig. 2A, B.

45 Ejemplo 3 (efecto sobre la expresión de ARNm de la enzima antioxidante HO-1)

Se sembraron células HepG2 en una placa de 24 pocillos a 1,5x10⁵ células/pocillo, y se cultivaron a 37 °C, 5% de CO₂ por 24 h. Varios compuestos (tBHQ, No. 11-No. 13) se disolvieron en D-MEM sin suero (100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina, 0,1% de BSA, 0,3% de etanol) para preparar medios de prueba con concentraciones ajustadas. El sobrenadante se retiró de la placa de 24 pocillos, el medio de prueba mencionado anteriormente se añadió a 500 μ l/pocillo, y las células se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ por 6 h. Posteriormente, el sobrenadante se

retiró nuevamente de la placa de 24 pocillos, las células se lavaron dos veces con PBS estéril, y las células se recuperaron usando 300 µl/pocillo de Sepasol. Se extrajo el ARN de las células recuperadas y se sintetizó el ADNc. Se puso en práctica el método de PCR en tiempo real utilizando el ADNc como plantilla y SYBR Green, y se evaluó la expresión del ARNm de la enzima antioxidante HO-1. Se usó GAPDH como estándar interno y se realizaron 43 ciclos de desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos, reacción de ampliación a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 30 segundos en condiciones de PCR. Los resultados se muestran en las Fig. 3A, B.

Ejemplo 4 (efecto sobre la expresión intranuclear del factor de transcripción Nrf2 implicado en la reacción antioxidante)

Se sembraron células HepG2 en una placa de 12 pocillos a $3,0 \times 10^4$ células/pocillo, y se cultivaron a 37 °C, 5% de CO₂ por 24 h. Varios compuestos (tBHQ, No. 11-No. 13) se disolvieron en D-MEM sin suero (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 0,1% de BSA, 0,3% de etanol) para preparar medios de prueba con concentraciones ajustadas. El sobrenadante se retiró de la placa de 12 pocillos, el medio de prueba mencionado anteriormente se añadió a 1 ml/pocillo, y las células se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ por 24 h. Posteriormente, el sobrenadante se retiró nuevamente de la placa de 12 pocillos, las células se lavaron con PBS estéril y se disolvieron en 100 µl de tampón de disolución (HEPES-KOH 10 mM, sacarosa 250 mM, cloruro de potasio 10 mM, cloruro de magnesio 1,5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, cóctel inhibidor de proteinasas, pH 7,6). La disolución se centrifugó a 1.000xg, 4 °C durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante, se disolvieron los sedimentos celulares en 30 µl de tampón de extracción de núcleo (HEPES-KOH 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, SDS al 1%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, cóctel inhibidor de proteinasa, pH 6,8), y la mezcla se agitó a 4°C durante 1 hora. Posteriormente, la disolución se centrifugó a 10.000 x g, 4 °C durante 15 minutos, el sobrenadante se recuperó para dar una fracción de nucleoproteína. El sobrenadante mencionado anteriormente recuperado como la fracción de nucleoproteína se midió para la concentración de proteína usando el kit Bio-Rad DC Protein Assay, diluido a la misma cantidad de proteína y se usó como muestra. A la muestra mencionada anteriormente se añadieron un tampón de carga y 2-mercaptoetanol, y la mezcla se llevó a ebullición a 95°C durante 5 minutos. La muestra sometida a ebullición mencionada anteriormente se aplicó en porciones de 20 µl cada una a gel de concentración al 5% y gel de electroforesis al 10%, y la mezcla se sometió a electroforesis a 20 mA durante 20 min y 150 V durante 60 min. La proteína se transfirió del gel sobre una membrana de PVDF a 15 V durante 35 minutos, la membrana de PVDF después de la transferencia se sumergió en un tampón de bloqueo y se mantuvo durante la noche. Luego, la membrana PVDF se hizo reaccionar con un anticuerpo de conejo Nrf2 antihumano diluido 400 veces durante 2 horas, se lavó y se hizo reaccionar con IgG anti-conejo marcada con HRP diluida 500 veces durante 1 hora. Usando Chemi-Lumi One Super, se detectó la banda en la membrana PVDF. Los resultados se muestran en la Fig. 4.

Ejemplo 5 (efecto sobre la actividad de transcripción del factor de transcripción Nrf2 involucrado en la reacción de antioxidación)

Las células PC12 de feocromocitoma medular de la glándula suprarrenal de rata que incorporan un vector de expresión génica de luciferasa que contiene un gen de luciferasa unido a una región promotora NQO1 de rata que contiene la región de unión de Nrf2 de rata se cultivaron en D-MEM (alta glucosa, 15% de HS, 5% de FBS, 300 mg/ml de higromicina B). Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a $5,0 \times 10^4$ células PC12/pocillo, y se cultivaron a 37 °C, 5% de CO₂ por 24 h. Varios compuestos (tBHQ, No. 11-No. 13) se disolvieron en D-MEM (alta glucosa, 15% de HS, 5% de FBS, 300 mg/ml de higromicina B, 0,3% de etanol) para preparar medios de prueba con concentraciones ajustadas. El sobrenadante se eliminó de la placa de 96 pocillos, el medio de prueba mencionado anteriormente se añadió a 100 µl/pocillo, y las células se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ por 9 h. Posteriormente, el sobrenadante se retiró nuevamente de la placa de 96 pocillos, se añadió reactivo de luminiscencia a 50 µl/pocillo y se midió la intensidad de luminiscencia. Los resultados se muestran en la Fig. 5.

Ejemplo 6 (efecto para diferenciar macrófagos en macrófagos M2)

El ratón C57BL/6N (macho, de 6 a 12 semanas de edad) (material del experimento SHIMIZU) se sacrificó por dislocación cervical, y se aisló el fémur, incluida la articulación de la rodilla y la articulación de la cadera. El fémur se transfirió a una placa de 100 mm (Thermo Fisher Scientific) que contenía medio RPMI 1640 (nacalai tesque), y el líquido de la médula ósea se recogió en la placa del fémur. Los agregados celulares en la placa se suspendieron y se colocaron en un tubo de centrifugación de 50 ml. Los agregados celulares suspendidos se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se eliminó, los sedimentos celulares se suspendieron en 2 ml de tampón de lisis RBC (tampón Tris-HCl 0,01 M que contenía 8,3 g/l de cloruro de amonio) y la suspensión se dejó reposar por 3 min. Posteriormente, se añadió el medio (8 ml) para interrumpir la reacción por dilución, la mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, y se retiró el sobrenadante. Se preparó una suspensión de células individuales de células derivadas de médula ósea a partir de los sedimentos celulares usando un filtro de células de 40 µm (BD Bioscience).

Las células viables en las células derivadas de médula ósea mencionadas anteriormente se contaron usando una disolución de tinción con azul de tripano (nacalai tesque), se sembraron en una placa de 100 mm a una densidad de $1,2 \times 10^6$ células/placa, y se cultivaron en una incubadora de CO₂ de acuerdo con el programa descrito en la Fig. 6. Como medio celular, se añadió medio RPMI 1640 con 10% de FBS (Biowest), 1% de penicilina/estreptomina (nacalai tesque), 20% (v/v) de medio acondicionado L929 y 55 µM de β-mercaptoetanol (Gibco). En el día 6 de cultivo, se añadieron al medio IL-4 (20 ng/ml) y diversos compuestos (LA, GLA, ALA, No. 1-3, 7, 8, 9, 14-24) (30 µM).

(1) antígeno de superficie celular que se expresa en macrófagos M2

Se confirmó el antígeno de la superficie celular que se expresa en el macrófago M2 a las 48 h de la adición de IL-4 y varios compuestos (LA, GLA, ALA, No.1-3, 7, 8, 9, 14-24). Primero, las células se recuperaron en un tubo Falcon de 4 ml (BD Bioscience) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos para dar sedimentos celulares. Las células se lavaron con tampón FACS (BSA al 0,1% (libre de ácidos grasos) (nacalai tesque), y los sedimentos celulares se uniformaron mediante golpeteo. Además, se añadió CD16/CD32 anti-ratón de rata purificado BD pharmingen™ (BD Bioscience), y a la mezcla se le aplicaron golpecitos, y se mantuvo a 4 °C durante 10 minutos (bloqueo de Fc). Para detectar el antígeno de la superficie celular (CD206, F4/80) que se expresa en el macrófago M2, se añadió un anticuerpo monoclonal marcado con fluorocromo (CD206 Alexa Fluor 647 anti-ratón (BioLegend), F4/80 antígeno FITC (eBioscience), y a la mezcla se le aplicaron golpecitos y se mantuvo a 4 °C durante 30 minutos. Posteriormente, las células se lavaron con tampón FACS, los sedimentos celulares se uniformaron aplicando golpecitos, y se añadió Viability Dye 7-AAD (eBioscience). El antígeno de la superficie celular se midió con el citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Bioscience). Para el análisis, se utilizó FlowJo™ (Tomy Digital Biology). Los resultados se muestran en las figuras 7-10.

(2) Expresión de ARNm del macrófago M2

A las 24 h de la adición de IL-4 y varios compuestos (ALA, No.7, 8, 16, 22, 23), se confirmó la expresión de ARNm (Arginasa 1, IL-1β) de las células. Primero, las células se sembraron en un pocillo, se añadieron 700 µl de Sepasol RNAIsuper (nacalai tesque) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Las células se dispersaron y la dispersión se transfirió a un tubo de 1,5 ml. Al tubo de 1,5 ml se añadieron 150 µl de cloroformo (nacalai tesque), se mezcló por inversión, se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó a 4 °C, 15.000 rpm durante 65 minutos. La capa acuosa (350 µl) se transfirió a otro tubo de 1,5 ml, se añadieron adicionalmente 350 µl de isopropanol (nacalai tesque). El tubo se mezcló invirtiendo, se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugó a 4 °C, 15.000 rpm durante 65 minutos, y se retiró el sobrenadante. Al precipitado se añadieron 500 µl de etanol al 75% (nacalai tesque) y la mezcla se centrifugó a 4 °C, 15.000 rpm durante 15 min, y la capa superior se eliminó. Esta operación se realizó dos veces en total. El precipitado obtenido (ARN total) se secó al aire durante aproximadamente 40 minutos, se disolvió en 20 µl de agua pura Ultra (Invitrogen), y se midió la concentración de ARNm mediante Nano Drop (Scrum). La concentración de ARNm se ajustó con agua pura Ultra a 1000 ng/µl en hielo para dar una disolución de ARN. El cebador Oligo dT (Gibco) (1 µl) y la disolución de ARN (10 µl) (1000 ng/µl) se agregaron a un tubo de 0,2 ml, se incubaron en un termociclador a 70 °C durante 10 minutos para destruir la estructura de orden superior del ARN. Asimismo, los reactivos que se muestran en la Tabla 1 se añadieron al tubo de 0,2 ml, y la mezcla se incubó en un termociclador (TAKARA) a 42 °C durante 50 minutos y a 70 °C durante 15 minutos. Después de enfriar en hielo, la mezcla de reacción se recogió en el fondo del tubo mediante centrifugación ligera, y se obtuvo ADNc.

Tabla 1

Muestra de ARN/mezcla de cebadores	10 µl
5 x tampón de transcripción inversa (Promega)	4 µl
Inhibidor de la RNasa (TOYOBO)	0,5 µl
Mezcla de dNTP (TAKARA) 2,5 mM	2 µl
Agua libre de nucleasa	2,5 µl
Transcriptasa inversa Superscript (II) (Promega)	1 µl
Total	20 µl

El ADNc obtenido se diluyó 5 veces con agua pura Ultra. Se tomó una disolución de plásmido (5 µl) como el estándar en un tubo de 0,6 ml y se diluyó 10 veces con agua pura Ultra (45 µl). Esta operación se repitió y se produjo una disolución plasmídica diluida 10^2 a 10^9 veces. El reactivo que se muestra en la Tabla 2 por muestra se preparó en un tubo de 1,5 ml y se dispensó a una placa de 96 pocillos por 12 µl cada uno. Agua pura Ultra como control negativo, la disolución de dilución (dilución 10^3 - 10^9) a cada concentración producida anteriormente como el estándar, y el ADNc de una muestra para medición se añadieron por 3 µl cada uno a la placa. La placa se colocó en Light-Cycler™ (Roche) y se realizó la PCR. Con cada uno de los niveles de expresión de ARNm de Arginasa 1 y expresión de IL-1β de las células agregadas con IL-4 solo como 1, el nivel de expresión de ARNasa 1 de ARGinasa y el nivel de expresión de ARNm de Arginasa 1 y el nivel de expresión de IL-1β cuando se agregaron simultáneamente IL-4 y varios compuestos se muestran en las Fig. 11, 12.

Tabla 2

dH ₂ O	8,4 µl
SYBR Green (TOYOBO)	8,0 µl
Total	0,8 µl

Ejemplo 7 (efecto de la diferenciación de monocitos en macrófagos M2)

Se considera que, en el cuerpo, se libera un macrófago inflamatorio en la sangre en un estado de monocito y, después de la circulación en todo el cuerpo, se infiltra en los tejidos periféricos y se diferencia en un macrófago específico del tejido de acuerdo con el entorno de los tejidos periféricos. En este ejemplo, se estudió si la adición de varios compuestos de derivados de ácidos grasos en la etapa inicial de diferenciación de monocitos en macrófagos promueve la inducción de la diferenciación de monocitos en macrófagos M2.

Usando las células derivadas de médula ósea preparadas en el Ejemplo 6 y considerando desde el día inicial de cultivo hasta el día 3 de cultivo como la etapa inicial de diferenciación, se realizó el cultivo de acuerdo con el programa descrito en la Fig. 13. Como medio celular, se añadió medio RPMI 1640 con FBS al 10%, penicilina/estreptomicina al 1%, medio acondicionado con L929 al 5% (v/v) y β-mercaptoetanol (Gibco) 55 µM, IL-4 (20 ng/ml), y se usaron diversos compuestos (ALA, No.7, 8, 16, 22, 23) (30 µM) desde el día inicial de cultivo hasta el día 3 de cultivo. Después del día 3 de cultivo, se añadió medio RPMI 1640 con FBS al 10%, penicilina/estreptomicina al 1%, medio acondicionado con L929 al 20% (v/v) y β-mercaptoetanol 55 µM (Gibco). Las células se recuperaron el día 7 de cultivo, y la expresión de ARNm y el antígeno de la superficie celular se confirmaron de la misma manera que en el Ejemplo 6. Los resultados se muestran en las Fig. 14-17.

Ejemplo 8 (efecto sobre el sistema inmune de la mucosa intestinal para diferenciar monocitos en macrófagos M2)

Se sabe que varios factores ambientales como la citocina y similares en el tejido periférico son importantes para la diferenciación de monocitos en macrófagos M2. Por lo tanto, se estudió si se puede formar un ambiente dominante de citocina Th2 en el intestino como resultado de una interacción entre inmunocitos y diversos compuestos de derivados de ácidos grasos.

El ratón BALB/c (♂, de 6 a 12 semanas de edad) (material experimental de agua fresca) se sacrificó por dislocación cervical, y se aislaron el ganglio linfático mesentérico y el parche de Peyer. Cada tejido se cortó finamente y se trató con medio RPMI 1640 (5% de FBS, 1,0 mg/ml de collagenasa) a 37 °C durante 30 min. El tejido se trituró adicionalmente con la parte del émbolo de una jeringa de 1 ml para dar una suspensión celular. La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y, usando un filtro de células de 40 µm, se preparó una única suspensión celular de las células derivadas de ganglios mesentéricos y una única suspensión celular de las células derivadas del parche de Peyer.

Además, el ratón BALB/c se sacrificó por dislocación cervical y se le aisló el bazo. El bazo se trituró en una placa de 100 mm para dar una suspensión celular. Los agregados celulares en la placa se suspendieron y se colocaron en un tubo de centrifugación de 50 ml. Los agregados celulares suspendidos se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se eliminó, los sedimentos celulares se suspendieron en 2 ml de tampón de lisis RBC, y la suspensión se dejó reposar durante 3 minutos. Posteriormente, se añadió el medio (8 ml) para interrumpir la reacción por dilución, la mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, y se retiró el sobrenadante. Se preparó una única suspensión celular de células derivadas del bazo a partir de los sedimentos celulares usando un filtro de células de 40 µm.

Las células viables en cada una de las células derivadas de ganglios linfáticos mesentéricos, células derivadas de parche de Peyer y células derivadas de bazo mencionadas anteriormente se contaron usando disolución de tinción con azul de tripano, sembradas a 1,0x10⁶ células/pocillo en una placa de 96 pocillos, se agregaron varios compuestos (ALA, No.7, 8, 16, 22, 23) y las células se cultivaron durante 18-24 horas en presencia de activadores de linfocitos PMA y Ionomicina. Después del cultivo, se recuperó cada sobrenadante. Como medio para el cultivo, se añadió RPMI 1640 con FBS al 10%, penicilina/estreptomicina al 1%.

La concentración de IL-4 y MCP-1 contenida en cada sobrenadante recuperado se midió por ELISA. Básicamente, se adoptó el protocolo recomendado de ELISA Ready-SET-Go![®] (eBioscience). El anticuerpo de captura se diluyó con un tampón de recubrimiento, se añadió a una placa de 96 pocillos a 50 µl/pocillo, y la placa se selló y se mantuvo durante la noche a 4°C. El pocillo se lavó 3 veces con 250 µl/pocillo de tampón de lavado, se añadió diluyente ELISA/ELISPOT al pocillo a 100 µl/pocillo, y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregaron 50 µl/pocillo de estándar y cada sobrenadante al pocillo, el pocillo se mantuvo a temperatura ambiente durante 2-3 horas y se lavó 3 veces con tampón de lavado a 250 µl/pocillo. El anticuerpo de detección se diluyó con diluyente ELISA/ELISPOT, se añadió al pocillo a 50 µl/pocillo, el pocillo se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavó 3 veces con 250 µl/pocillo de tampón de lavado. La avidina-HRP se diluyó con diluyente ELISA/ELISPOT, se añadió al pocillo a 50 µl/pocillo, y el pocillo se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos.

y se lavó 6 veces con 250 µl/pocillo de tampón de lavado. Se añadió disolución TMB al pocillo a 50 µl/pocillo, y el pocillo se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió disolución H₃PO₄ 1 M al pocillo a 25 µl/pocillo para interrumpir la reacción enzimática. La absorbancia a una longitud de onda de 450 nm se midió mediante un lector de microplacas. Los resultados se exponen en las Fig. 18 y 19.

- 5 Si bien la presente invención se ha descrito con énfasis en las realizaciones preferidas, es obvio para los expertos en la materia que las realizaciones preferidas pueden modificarse.

[Aplicabilidad industrial]

- 10 La presente invención ha aclarado que los derivados de ácidos grasos raros tienen un efecto antiinflamatorio convencionalmente desconocido como función fisiológica de estos. Un agente antiinflamatorio que contiene el derivado de ácido graso raro es aplicable a diversos campos tales como productos farmacéuticos, alimentos, piensos y similares, y la presente invención es extremadamente útil desde el punto de vista industrial.

Esta solicitud se basa en las solicitudes de patente Nos. 2014-011866 (fecha de presentación: 24 de enero de 2014) y 2014-162982 (fecha de presentación: 8 de agosto de 2014) presentadas en Japón.

Listado de secuencias

- 15 <110> Universidad de Kyoto
NITTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
- <120> Agente antiinflamatorio que comprende ácidos grasos raros
- 20 <130> 092264
- <150> JP 2014-011866
<151> 2014-01-24
- 25 <150> JP 2014-162982
<151> 2014-08-08
- <160> 2
- 30 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 1773
<212> ADN
- 35 <213> Lactobacillus acidophilus
- <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1773)
- 40 <400> 1

ES 2 810 323 T3

atg cat tat agt agt ggt aat tat gaa gct ttt gta aac gca agt aaa Met His Tyr Ser Ser Gly Asn Tyr Glu Ala Phe Val Asn Ala Ser Lys 1 5 10 15	48
cct aag gat gtc gat cag aag tcc gca tat ctt gtt ggt tca ggt ttg Pro Lys Asp Val Asp Gln Lys Ser Ala Tyr Leu Val Gly Ser Gly Leu 20 25 30	96
gca tcg ctt gct agt gct gta ttt tta att cgt gat ggt cac atg aag Ala Ser Leu Ala Ser Ala Val Phe Leu Ile Arg Asp Gly His Met Lys 35 40 45	144
ggg gat aga att cat atc ctt gaa gaa ttg agc ctt cca ggt ggt tca Gly Asp Arg Ile His Ile Leu Glu Glu Leu Ser Leu Pro Gly Gly Ser 50 55 60	192
atg gat ggg atc tat aat aag caa aaa gaa agc tac atc att cgt ggt Met Asp Gly Ile Tyr Asn Lys Gln Lys Glu Ser Tyr Ile Ile Arg Gly 65 70 75 80	240
ggg cgt gaa atg gaa gcc cat ttt gaa tgc ttg tgg gac ttg ttt aga Gly Arg Glu Met Glu Ala His Phe Glu Cys Leu Trp Asp Leu Phe Arg 85 90 95	288
tcg att cca tca gct gaa aat aaa gat gaa tcg gtc ctg gat gaa ttt Ser Ile Pro Ser Ala Glu Asn Lys Asp Glu Ser Val Leu Asp Glu Phe 100 105 110	336
tac cgt tta aat aga aaa gat cca agt ttc gca aag act cgt gtc att Tyr Arg Leu Asn Arg Lys Asp Pro Ser Phe Ala Lys Thr Arg Val Ile 115 120 125	384
gtt aac cgc gga cat gaa ctt cca act gac ggt caa tta ctt ctt act	432

ES 2 810 323 T3

Val	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Leu	Pro	Thr	Asp	Gly	Gln	Leu	Leu	Leu	Thr	
130						135					140					
ccc	aag	gct	gtt	aaa	gaa	att	att	gat	ctt	tgc	tta	act	cct	gaa	aaa	480
Pro	Lys	Ala	Val	Lys	Glu	Ile	Ile	Asp	Leu	Cys	Leu	Thr	Pro	Glu	Lys	
145					150					155					160	
gat	tta	caa	aat	aaa	aaa	att	aat	gaa	gtc	ttt	agt	aaa	gaa	ttt	ttt	528
Asp	Leu	Gln	Asn	Lys	Lys	Ile	Asn	Glu	Val	Phe	Ser	Lys	Glu	Phe	Phe	
				165					170					175		
gaa	tca	aac	ttc	tgg	ctt	tac	tgg	tca	acg	atg	ttt	gcc	ttt	gag	cca	576
Glu	Ser	Asn	Phe	Trp	Leu	Tyr	Trp	Ser	Thr	Met	Phe	Ala	Phe	Glu	Pro	
			180					185					190			
tgg	gca	agt	gcg	atg	gaa	atg	cgt	cgt	tac	tta	atg	cgt	ttt	gtt	caa	624
Trp	Ala	Ser	Ala	Met	Glu	Met	Arg	Arg	Tyr	Leu	Met	Arg	Phe	Val	Gln	
			195				200					205				
cac	gtt	tct	aca	ctt	aag	aat	tta	tca	tca	cta	cgc	ttt	act	aag	tat	672
His	Val	Ser	Thr	Leu	Lys	Asn	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Phe	Thr	Lys	Tyr	
	210					215					220					
aac	caa	tat	gaa	tca	tta	att	tta	cca	atg	gtt	aaa	tac	ttg	aaa	gat	720
Asn	Gln	Tyr	Glu	Ser	Leu	Ile	Leu	Pro	Met	Val	Lys	Tyr	Leu	Lys	Asp	
225					230					235					240	
cgc	ggc	gtg	caa	ttc	cat	tac	aac	acc	gtt	gtt	gat	aat	atc	ttt	gtt	768
Arg	Gly	Val	Gln	Phe	His	Tyr	Asn	Thr	Val	Val	Asp	Asn	Ile	Phe	Val	
				245					250					255		
aac	cgt	tca	aat	ggt	gaa	aag	att	gct	aag	caa	att	ctt	tta	act	gaa	816
Asn	Arg	Ser	Asn	Gly	Glu	Lys	Ile	Ala	Lys	Gln	Ile	Leu	Leu	Thr	Glu	
			260					265					270			
aac	ggt	gaa	aaa	aag	agc	atc	gat	tta	aca	gaa	aat	gac	ctc	gtc	ttc	864
Asn	Gly	Glu	Lys	Lys	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Val	Phe	
		275					280					285				
gtt	act	aac	ggt	tca	att	act	gaa	agt	aca	act	tat	ggt	gat	aac	ttg	912
Val	Thr	Asn	Gly	Ser	Ile	Thr	Glu	Ser	Thr	Thr	Tyr	Gly	Asp	Asn	Leu	
	290					295					300					
cac	cca	gct	tct	gag	gaa	cat	aaa	tta	ggt	gct	act	tgg	aaa	tta	tgg	960
His	Pro	Ala	Ser	Glu	Glu	His	Lys	Leu	Gly	Ala	Thr	Trp	Lys	Leu	Trp	
305					310					315					320	
caa	aac	ttg	gca	gcg	caa	gat	gat	gac	ttc	ggt	cac	cca	gat	gtc	ttc	1008
Gln	Asn	Leu	Ala	Ala	Gln	Asp	Asp	Asp	Phe	Gly	His	Pro	Asp	Val	Phe	
				325					330					335		
tgc	aag	gat	att	cca	aag	gct	aac	tgg	gta	atg	tct	gct	aca	att	act	1056
Cys	Lys	Asp	Ile	Pro	Lys	Ala	Asn	Trp	Val	Met	Ser	Ala	Thr	Ile	Thr	
			340					345					350			
ttt	aag	aat	aat	gat	att	gtg	cca	ttc	att	gaa	gca	gtt	aat	aag	aag	1104
Phe	Lys	Asn	Asn	Asp	Ile	Val	Pro	Phe	Ile	Glu	Ala	Val	Asn	Lys	Lys	
		355					360					365				
gat	cca	cac	agc	ggc	tca	att	gta	act	agt	ggg	cct	act	acg	att	aag	1152
Asp	Pro	His	Ser	Gly	Ser	Ile	Val	Thr	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Ile	Lys	
	370					375					380					

ES 2 810 323 T3

gat tct aac tgg cta ctt ggt tat tca atc agt cgt cag cct cac ttt	1200
Asp Ser Asn Trp Leu Leu Gly Tyr Ser Ile Ser Arg Gln Pro His Phe	
385 390 395 400	
gaa gca caa aag cct aac gaa ttg att gta tgg ctt tat ggt ttg ttc	1248
Glu Ala Gln Lys Pro Asn Glu Leu Ile Val Trp Leu Tyr Gly Leu Phe	
405 410 415	
tca gac acc aaa ggt aac tat gtt gaa aag act atg cct gac tgt aac	1296
Ser Asp Thr Lys Gly Asn Tyr Val Glu Lys Thr Met Pro Asp Cys Asn	
420 425 430	
ggt att gaa tta tgt gaa gaa tgg ctt tac cac atg ggt gtt cct gaa	1344
Gly Ile Glu Leu Cys Glu Glu Trp Leu Tyr His Met Gly Val Pro Glu	
435 440 445	
gaa aga atc cca gaa atg gct tca gct gct acg act att cca gca cac	1392
Glu Arg Ile Pro Glu Met Ala Ser Ala Ala Thr Thr Ile Pro Ala His	
450 455 460	
atg cca tat att act tca tac ttc atg cca aga gca tta ggc gac aga	1440
Met Pro Tyr Ile Thr Ser Tyr Phe Met Pro Arg Ala Leu Gly Asp Arg	
465 470 475 480	
ccc aag gtt gtg cca gac cac tca aag aac ttg gcc ttc att ggt aac	1488
Pro Lys Val Val Pro Asp His Ser Lys Asn Leu Ala Phe Ile Gly Asn	
485 490 495	
ttt gct gaa acg cca aga gac act gtc ttt acc act gaa tac tct gtc	1536
Phe Ala Glu Thr Pro Arg Asp Thr Val Phe Thr Thr Glu Tyr Ser Val	
500 505 510	
aga act gcg atg gaa gct gta tac acc ttg ctt aac att gat cgt ggt	1584
Arg Thr Ala Met Glu Ala Val Tyr Thr Leu Leu Asn Ile Asp Arg Gly	
515 520 525	
gtg cca gaa gta ttt gca tct gcc ttc gat gtc aga atg ctc atg aac	1632
Val Pro Glu Val Phe Ala Ser Ala Phe Asp Val Arg Met Leu Met Asn	
530 535 540	
gca atg tac tac ttg aat gat caa aag aag ctt gaa gat ctt gat ttg	1680
Ala Met Tyr Tyr Leu Asn Asp Gln Lys Lys Leu Glu Asp Leu Asp Leu	
545 550 555 560	
cct att gct gaa aag ttg gca att aag ggg atg ctc aag aaa gtt aag	1728
Pro Ile Ala Glu Lys Leu Ala Ile Lys Gly Met Leu Lys Lys Val Lys	
565 570 575	
ggc act tat ata gag gaa ttg ctt aag aag tat aag ttg gtt tag	1773
Gly Thr Tyr Ile Glu Glu Leu Leu Lys Lys Tyr Lys Leu Val	
580 585 590	

<210> 2

<211> 590

5 <212> PRT

<213> Lactobacillus acidophilus

<400> 2

Met His Tyr Ser Ser Gly Asn Tyr Glu Ala Phe Val Asn Ala Ser Lys
1 5 10 15

ES 2 810 323 T3

Pro Lys Asp Val Asp Gln Lys Ser Ala Tyr Leu Val Gly Ser Gly Leu
 20 25 30
 Ala Ser Leu Ala Ser Ala Val Phe Leu Ile Arg Asp Gly His Met Lys
 35 40 45
 Gly Asp Arg Ile His Ile Leu Glu Glu Leu Ser Leu Pro Gly Gly Ser
 50 55 60
 Met Asp Gly Ile Tyr Asn Lys Gln Lys Glu Ser Tyr Ile Ile Arg Gly
 65 70 75 80
 Gly Arg Glu Met Glu Ala His Phe Glu Cys Leu Trp Asp Leu Phe Arg
 85 90 95
 Ser Ile Pro Ser Ala Glu Asn Lys Asp Glu Ser Val Leu Asp Glu Phe
 100 105 110
 Tyr Arg Leu Asn Arg Lys Asp Pro Ser Phe Ala Lys Thr Arg Val Ile
 115 120 125
 Val Asn Arg Gly His Glu Leu Pro Thr Asp Gly Gln Leu Leu Leu Thr
 130 135 140
 Pro Lys Ala Val Lys Glu Ile Ile Asp Leu Cys Leu Thr Pro Glu Lys
 145 150 155 160
 Asp Leu Gln Asn Lys Lys Ile Asn Glu Val Phe Ser Lys Glu Phe Phe
 165 170 175
 Glu Ser Asn Phe Trp Leu Tyr Trp Ser Thr Met Phe Ala Phe Glu Pro
 180 185 190
 Trp Ala Ser Ala Met Glu Met Arg Arg Tyr Leu Met Arg Phe Val Gln
 195 200 205
 His Val Ser Thr Leu Lys Asn Leu Ser Ser Leu Arg Phe Thr Lys Tyr
 210 215 220
 Asn Gln Tyr Glu Ser Leu Ile Leu Pro Met Val Lys Tyr Leu Lys Asp
 225 230 235 240
 Arg Gly Val Gln Phe His Tyr Asn Thr Val Val Asp Asn Ile Phe Val
 245 250 255
 Asn Arg Ser Asn Gly Glu Lys Ile Ala Lys Gln Ile Leu Leu Thr Glu
 260 265 270

ES 2 810 323 T3

Asn Gly Glu Lys Lys Ser Ile Asp Leu Thr Glu Asn Asp Leu Val Phe
 275 280 285
 Val Thr Asn Gly Ser Ile Thr Glu Ser Thr Thr Tyr Gly Asp Asn Leu
 290 295 300
 His Pro Ala Ser Glu Glu His Lys Leu Gly Ala Thr Trp Lys Leu Trp
 305 310 315 320
 Gln Asn Leu Ala Ala Gln Asp Asp Asp Phe Gly His Pro Asp Val Phe
 325 330 335
 Cys Lys Asp Ile Pro Lys Ala Asn Trp Val Met Ser Ala Thr Ile Thr
 340 345 350
 Phe Lys Asn Asn Asp Ile Val Pro Phe Ile Glu Ala Val Asn Lys Lys
 355 360 365
 Asp Pro His Ser Gly Ser Ile Val Thr Ser Gly Pro Thr Thr Ile Lys
 370 375 380
 Asp Ser Asn Trp Leu Leu Gly Tyr Ser Ile Ser Arg Gln Pro His Phe
 385 390 395 400
 Glu Ala Gln Lys Pro Asn Glu Leu Ile Val Trp Leu Tyr Gly Leu Phe
 405 410 415
 Ser Asp Thr Lys Gly Asn Tyr Val Glu Lys Thr Met Pro Asp Cys Asn
 420 425 430
 Gly Ile Glu Leu Cys Glu Glu Trp Leu Tyr His Met Gly Val Pro Glu
 435 440 445
 Glu Arg Ile Pro Glu Met Ala Ser Ala Ala Thr Thr Ile Pro Ala His
 450 455 460
 Met Pro Tyr Ile Thr Ser Tyr Phe Met Pro Arg Ala Leu Gly Asp Arg
 465 470 475 480
 Pro Lys Val Val Pro Asp His Ser Lys Asn Leu Ala Phe Ile Gly Asn
 485 490 495
 Phe Ala Glu Thr Pro Arg Asp Thr Val Phe Thr Thr Glu Tyr Ser Val
 500 505 510
 Arg Thr Ala Met Glu Ala Val Tyr Thr Leu Leu Asn Ile Asp Arg Gly

ES 2 810 323 T3

515		520		525											
Val	Pro	Glu	Val	Phe	Ala	Ser	Ala	Phe	Asp	Val	Arg	Met	Leu	Met	Asn
530						535					540				
Ala	Met	Tyr	Tyr	Leu	Asn	Asp	Gln	Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Leu
545					550					555					560
Pro	Ile	Ala	Glu	Lys	Leu	Ala	Ile	Lys	Gly	Met	Leu	Lys	Lys	Val	Lys
				565					570					575	
Gly	Thr	Tyr	Ile	Glu	Glu	Leu	Leu	Lys	Lys	Tyr	Lys	Leu	Val		
			580					585					590		

REIVINDICACIONES

1. Un agente que comprende el siguiente ácido graso:

(1) un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene un doble enlace trans en la posición 11 o al menos un doble enlace cis en la posición 6, la posición 12, la posición 15, que tiene 18 átomos de carbono y un hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 10, seleccionado del grupo que consiste 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-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, ácido trans-11-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-cis-6, trans-11,cis-15-octadecatrienoico, 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 10-oxo-cis-6,trans-11-octadecadienoico, ácido 10-oxo-trans-11,cis-15-octadecadienoico y ácido 10-oxo-cis-6, trans-11,cis-15-octadecatrienoico,

(2) un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 6, la posición 9, la posición 15, que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 13, seleccionado del grupo que consiste en ácido 13-hidroxi-cis-9-octadecenoico, ácido 13-hidroxi-cis-6,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-cis-9,cis-15-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-cis-6,cis-9,cis-15-octadecatrienoico, ácido 10,13-dihidroxi-octadecanoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-6-octadecenoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-15-octadecenoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-6,cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-13-hidroxi-cis-6-octadecenoico, ácido 10-oxo-13-hidroxi-cis-15-octadecenoico, ácido 10-oxo-13-hidroxi-cis-6,cis-15-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-cis-5,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-trans-5,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-oxo-cis-9-octadecenoico, ácido 13-oxo-cis-6,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-oxo-cis-9,cis-15-octadecadienoico, ácido 13-oxo-cis-6, cis-9,cis-15-octadecatrienoico, ácido 10,13-dioxo-octadecanoico, ácido 10,13-dioxo-cis-6-octadecenoico, ácido 10,13-dioxo-cis-15-octadecenoico, ácido 10,13-dioxo-cis-6, cis-15-octadecadienoico, ácido 13-oxo-cis-5,cis-9-octadecadienoico y ácido 13-oxo-trans-5,cis-9-octadecadienoico,

(3) un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 5, la posición 8, la posición 9, la posición 14, la posición 17, que tiene 18 o 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 12, seleccionado del grupo que consiste en ácido 12-hidroxi-cis-14-eicosenoico, ácido 12-hidroxi-cis-14,cis-17-eicosadienoico, ácido 12-hidroxi-cis-8,cis-14-eicosadienoico, ácido 12-hidroxi-cis-5,cis-8-eicosadienoico, ácido 12-hidroxi-cis-8, cis-14,cis-17-eicosatrienoico, ácido 12-hidroxi-cis-5,cis-8,cis-14-eicosatrienoico, ácido 12-oxo-octadecanoico, ácido 12-oxo-cis-14-eicosenoico, ácido 12-oxo-cis-14,cis-17-eicosadienoico, ácido 12-oxo-cis-8,cis-14-eicosadienoico, ácido 12-oxo-cis-5,cis-8-eicosadienoico, ácido 12-oxo-cis-8, cis-14,cis-17-eicosatrienoico y ácido 12-oxo-cis-5,cis-8,cis-14-eicosatrienoico,

(4) un ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 5, la posición 8, la posición 11, la posición 17, que tiene 20 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 15, seleccionado del grupo que consiste en ácido 15-hidroxi-cis-11-eicosenoico, ácido 15-hidroxi-cis-11,cis-17-eicosadienoico, ácido 15-hidroxi-cis-8,cis-11-eicosadienoico, ácido 15-hidroxi-cis-5,cis-8,cis-11-eicosatrienoico, ácido 15-hidroxi-cis-5,cis-11-eicosadienoico, ácido 15-hidroxi-cis-5,cis-11,cis-17-eicosatrienoico, ácido 15-oxo-cis-11-eicosenoico, ácido 15-oxo-cis-11,cis-17-eicosadienoico, ácido 15-oxo-cis-8,cis-11-eicosadienoico, ácido 15-oxo-cis-5,cis-8,cis-11-eicosatrienoico, ácido 15-oxo-cis-8, cis-11,cis-17-eicosatrienoico, ácido 15-oxo-cis-5,cis-11-eicosadienoico y ácido 15-oxo-cis-5, cis-11,cis-17-eicosatrienoico, o

(5) un ácido graso saturado que tiene 16 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 10, seleccionado del grupo que consiste en ácido 10-hidroxi-hexadecanoico y ácido 10-oxo-hexadecanoico,

para uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

2. El agente para usar de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el siguiente ácido graso:

(1) un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene un doble enlace trans en la posición 11 o al menos un doble enlace cis en la posición 6, la posición 12, que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 10, seleccionado del grupo que consiste en ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-octadecanoico, ácido 10-oxo-cis-12-octadecenoico, ácido 10-hidroxi-cis-12,cis-15-octadecadienoico, ácido 10-hidroxi-cis-6,cis-12-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-12,cis-15-octadecadienoico, ácido 10-oxo-cis-6,cis-12-octadecadienoico, ácido 10-oxo-trans-11,cis-15-octadecadienoico y ácido 10-oxo-cis-6,trans-11-octadecadienoico, o

(2) un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado que tiene al menos un doble enlace cis en la posición 6, la posición 9, la posición 15, que tiene 18 átomos de carbono y un grupo hidroxilo o grupo carbonilo en la posición 13, seleccionado del grupo que consiste en ácido 13-hidroxi-cis-9-octadecenoico, ácido 13-hidroxi-cis-6,cis-9-octadecadienoico, ácido 13-hidroxi-cis-9,cis-15-octadecadienoico, ácido 10,13-dihidroxi-octadecanoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-6-octadecenoico, ácido 10,13-dihidroxi-cis-15-octadecenoico, ácido 13-oxo-cis-9-octadecenoico, ácido

13-oxo-cis-6,cis-9-octadecadienoico y ácido 13-oxo-cis-9,cis-15-octadecadienoico.

3. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para usar en la profilaxis o mejora de una enfermedad inflamatoria que involucra macrófagos.

5 4. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho agente es un alimento o un aditivo alimentario.

5. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho agente es un producto farmacéutico.

6. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho agente es un pienso o un aditivo para pienso.

Fig. 1

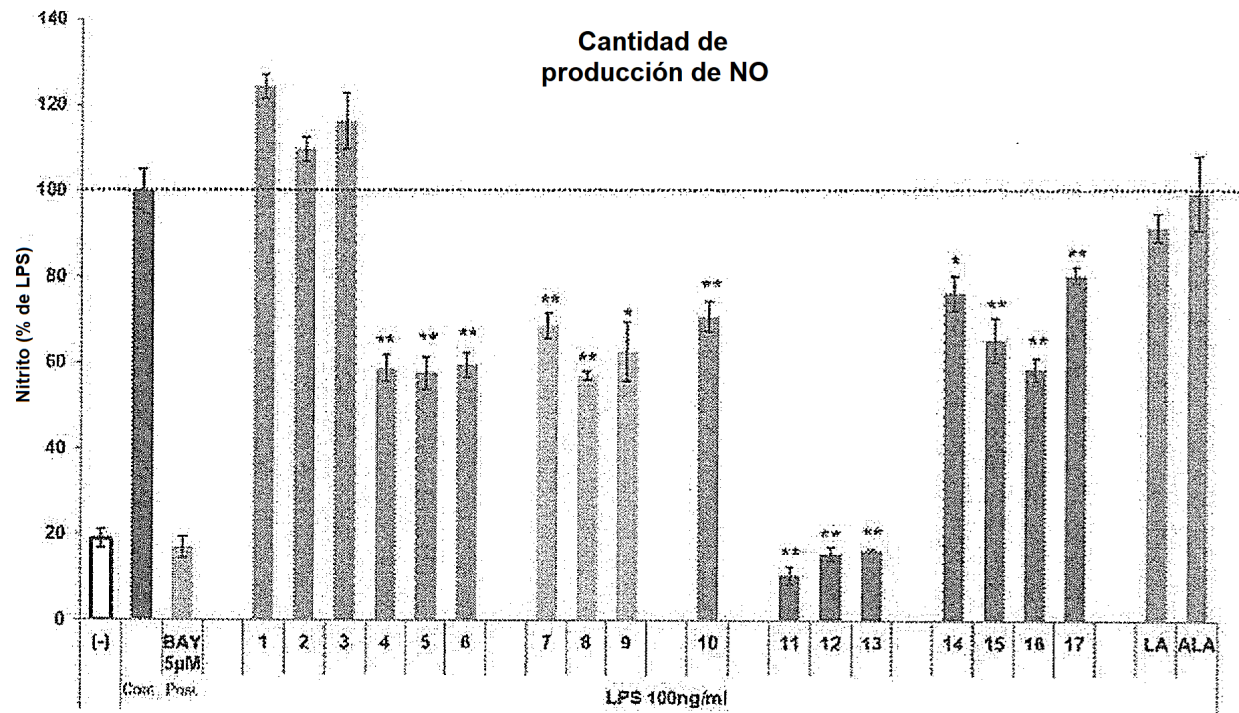
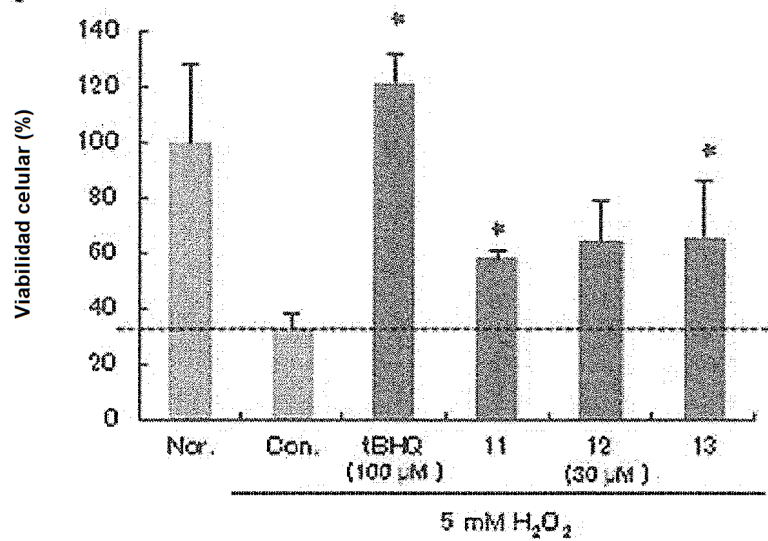


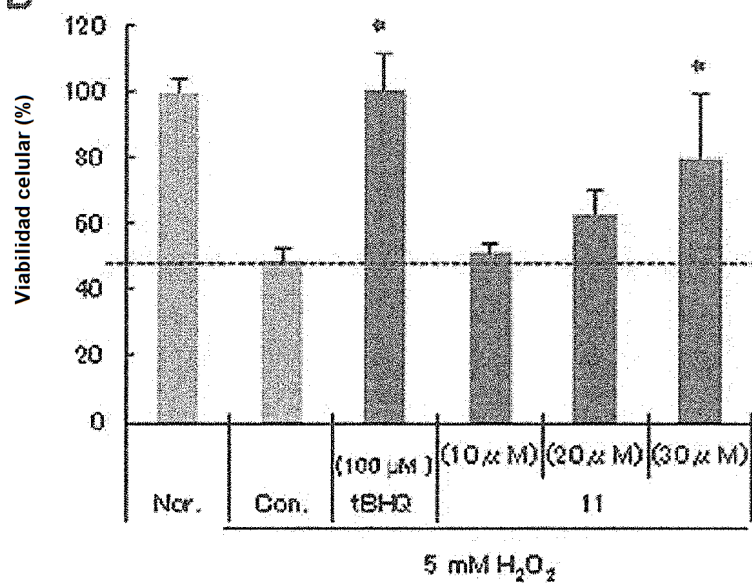
Fig. 2

A



$n=3$ (11 ($n=2$), media $\pm$ SD, * P (0,05) (Dunn-Sidak)

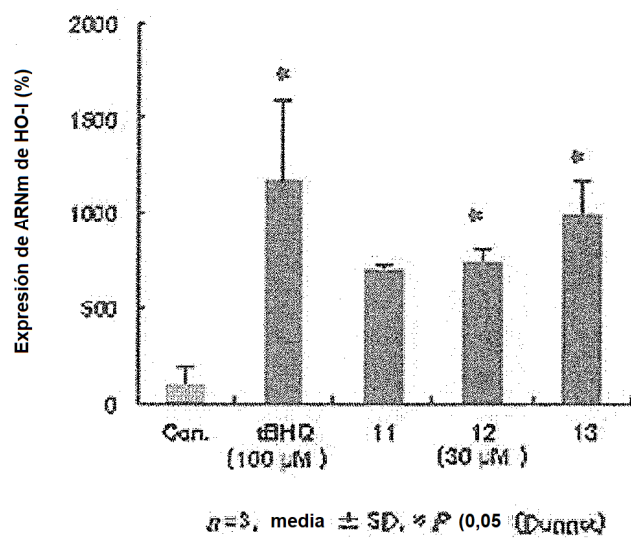
B



$n=3$, media $\pm$ SD, * P (0,05) (Dunn-Sidak)

Fig. 3

A



B

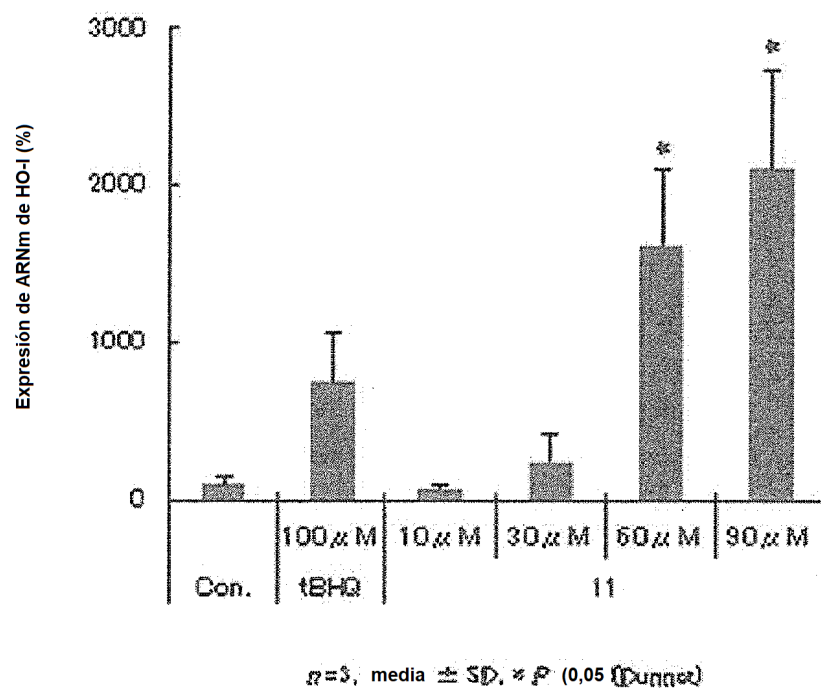
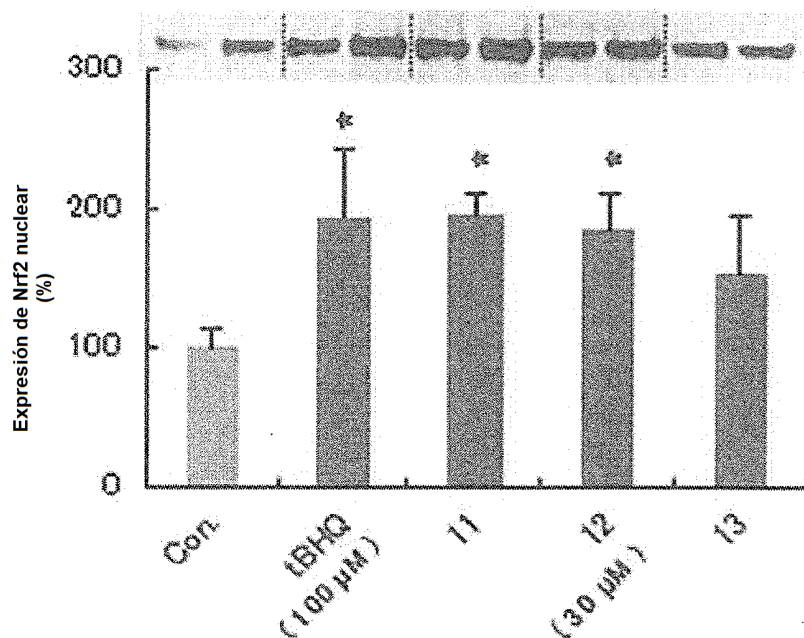
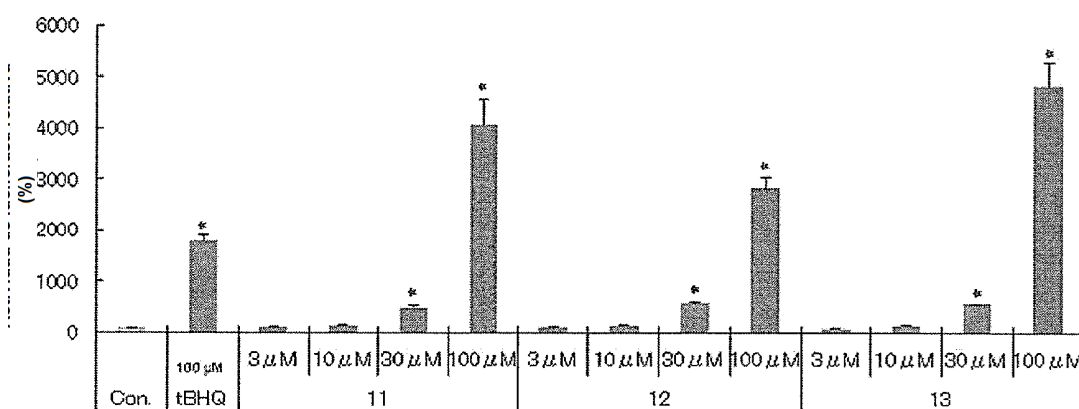


Fig. 4



$n=3$, media $\pm$ SD, * P (0,05) (Dunnett)

Fig. 5



$n=3$, media $\pm$ SD, * P (0,05) (Dunnett)

Fig. 6

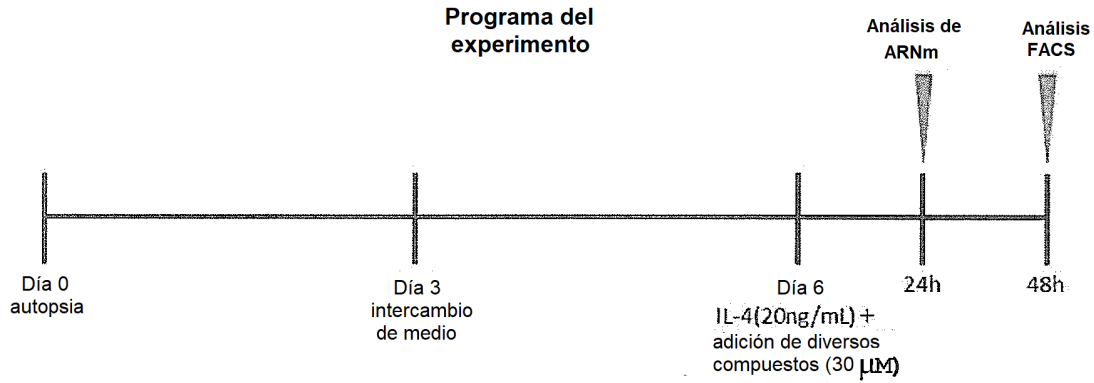


Fig. 7

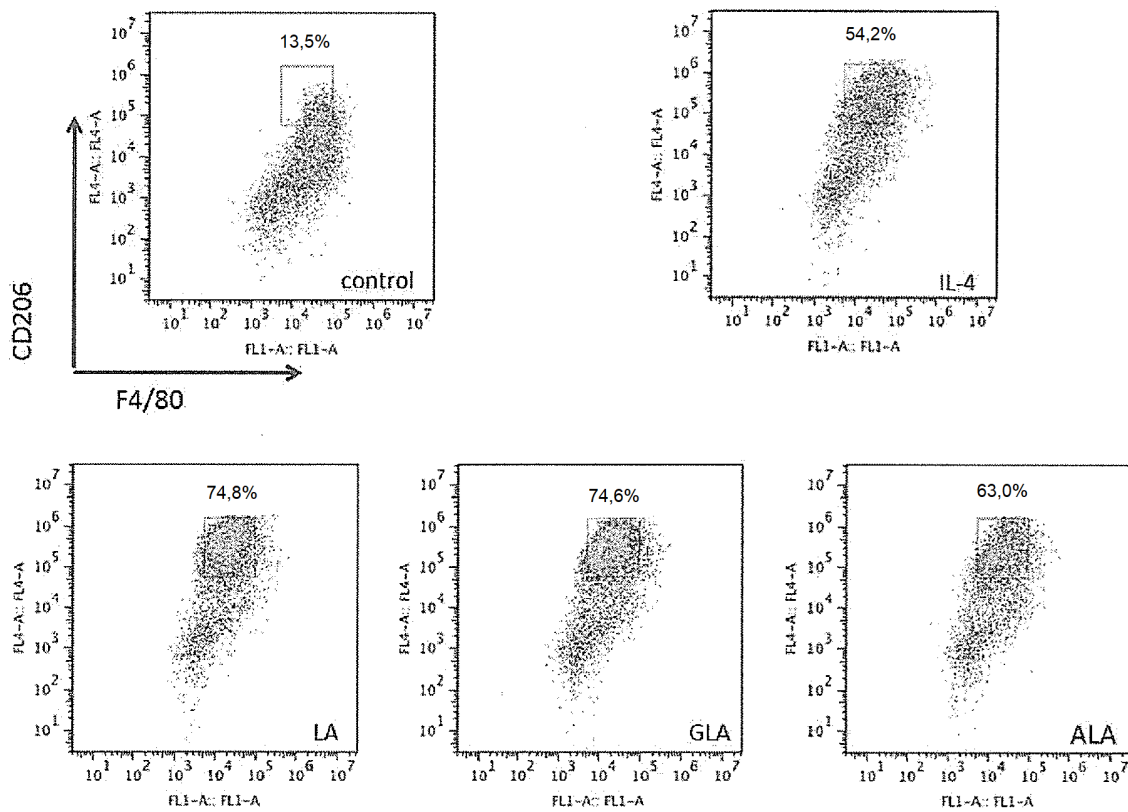


Fig. 8

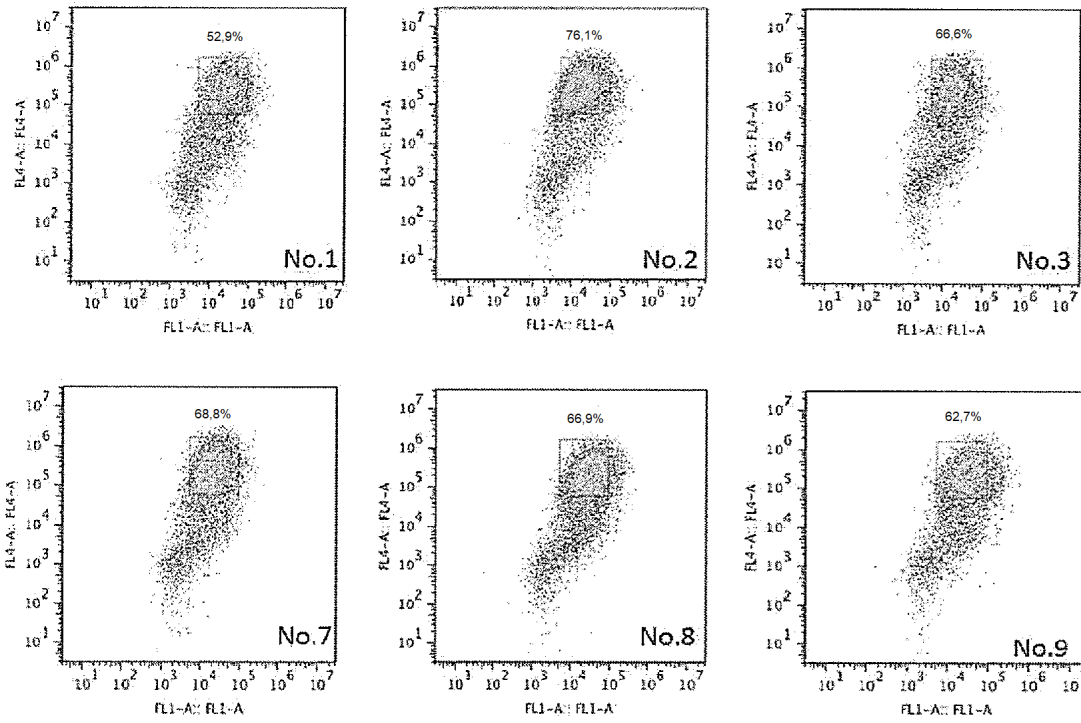


Fig. 9

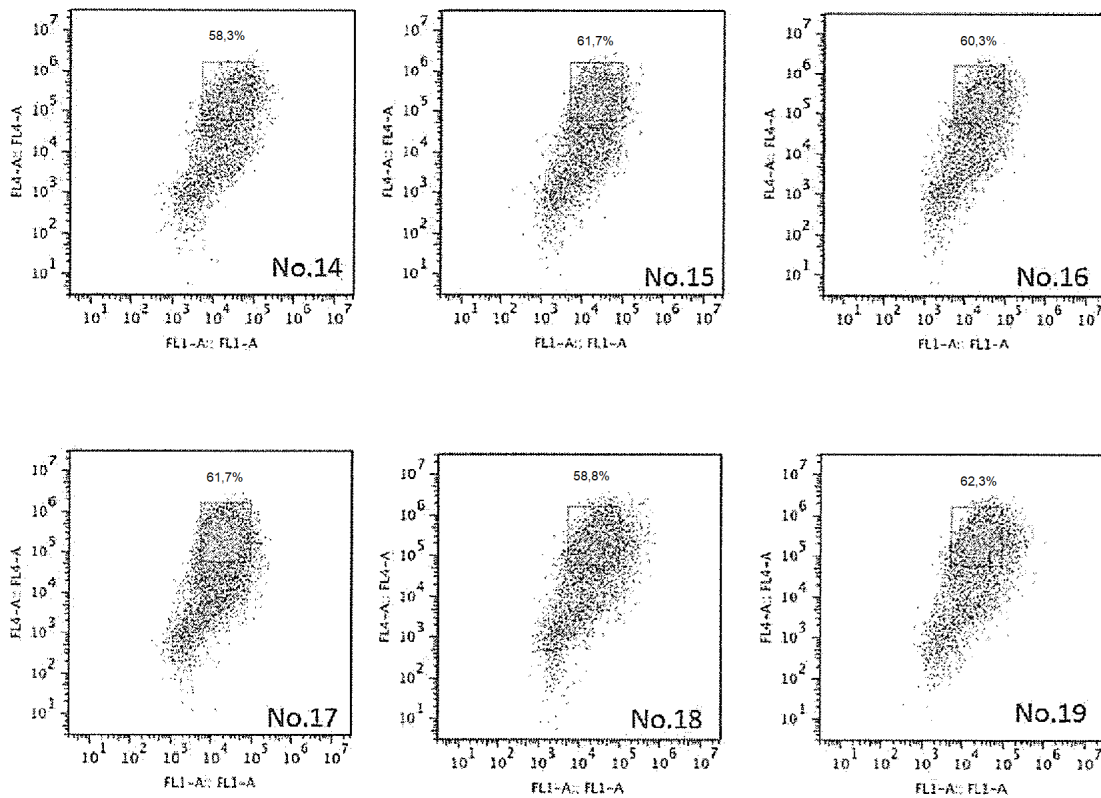


Fig. 10

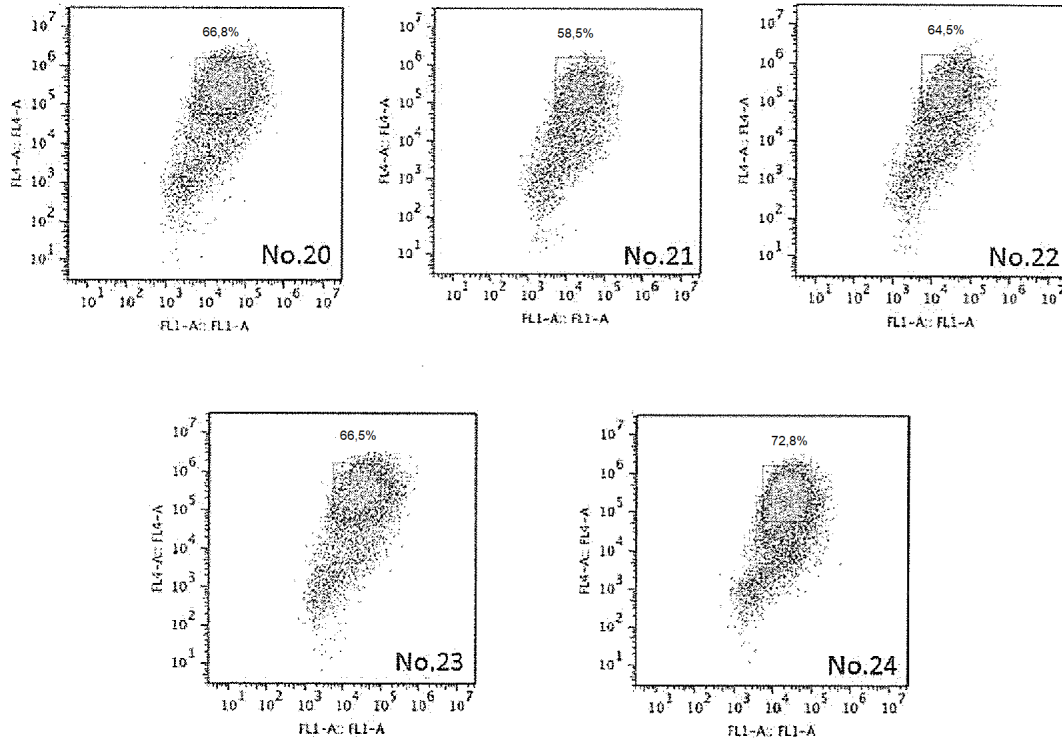


Fig. 11

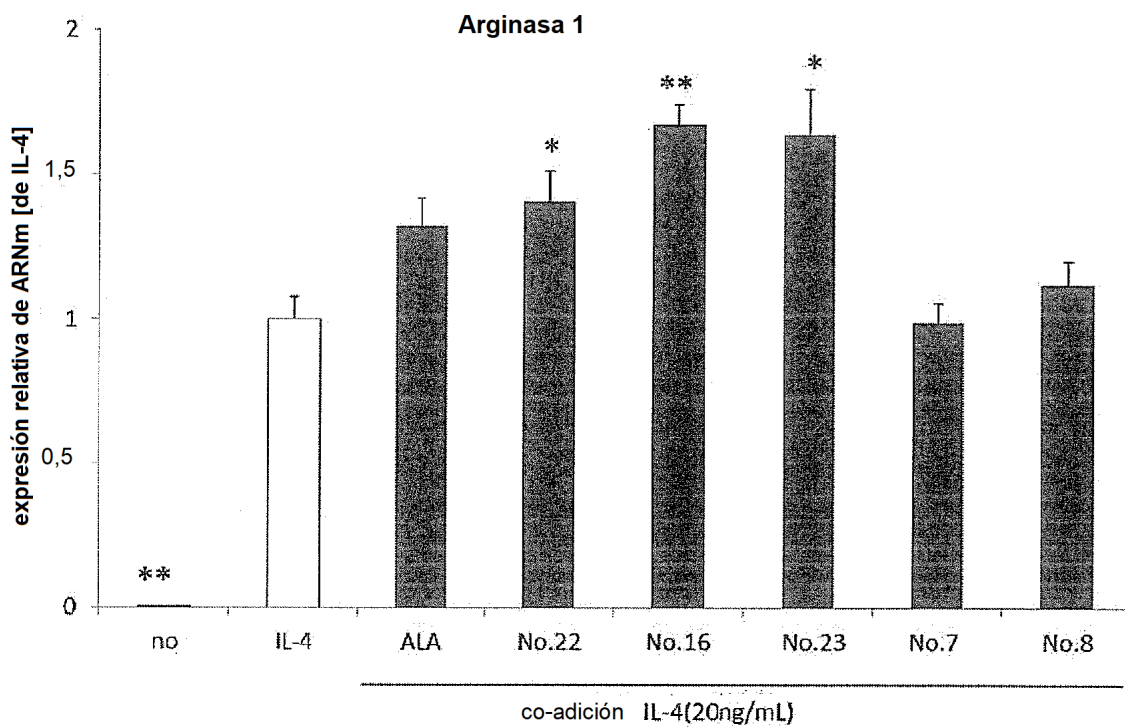


Fig. 12

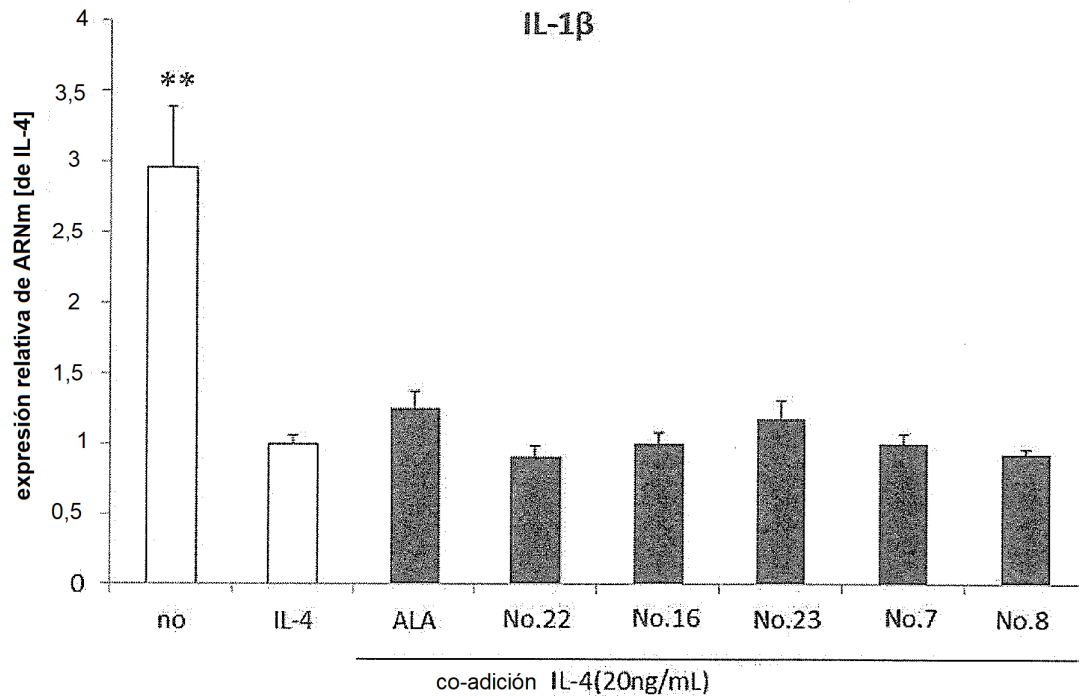
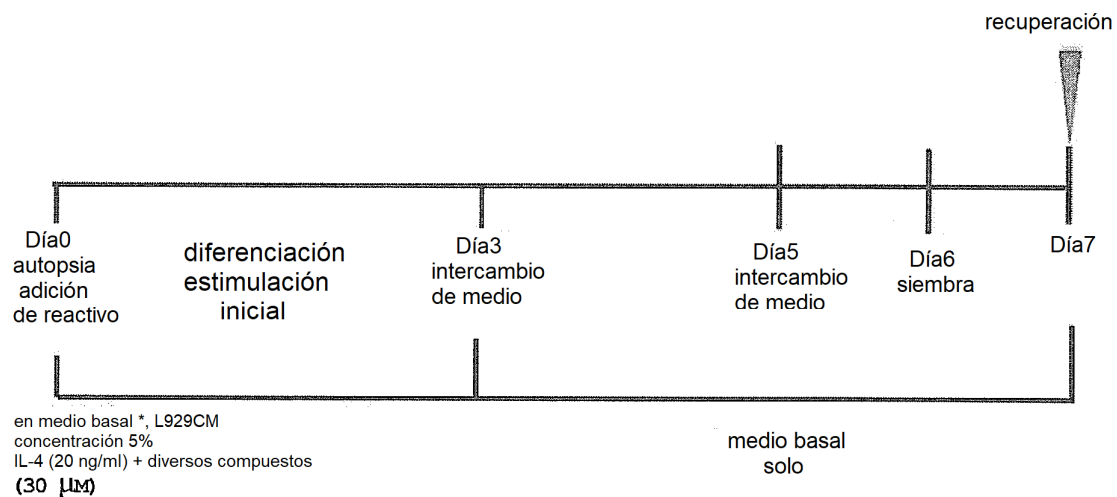


Fig. 13



*medio basal :	PRMI1640, 10% FBS, 1% Penicilina/Estreptomicina, 55 μ M β - mercaptoetanol 20%(v/v) medio acondicionado L929
----------------	---

Fig. 14

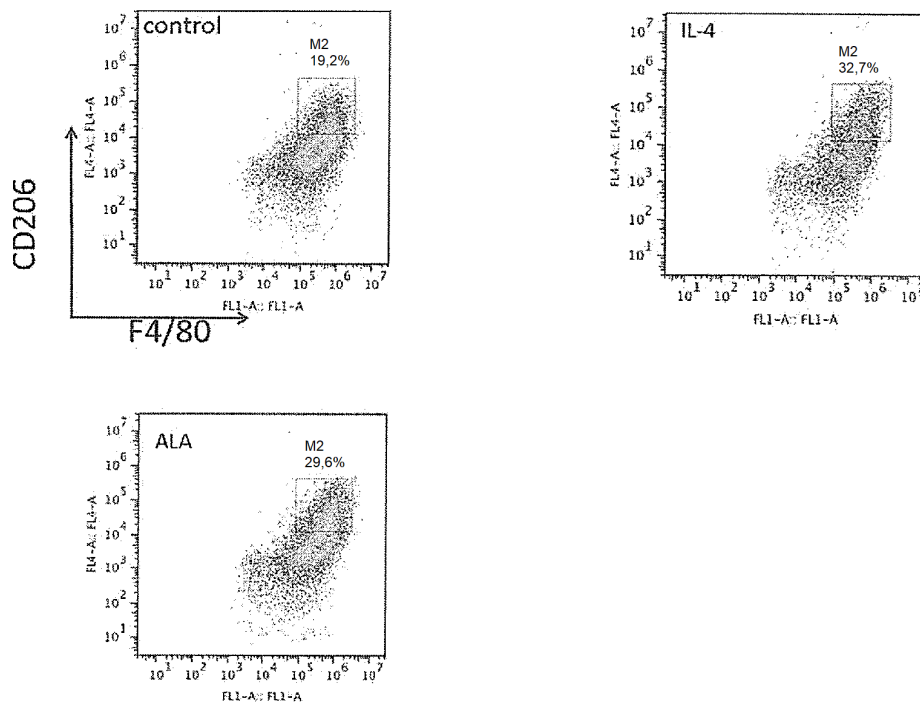


Fig. 15

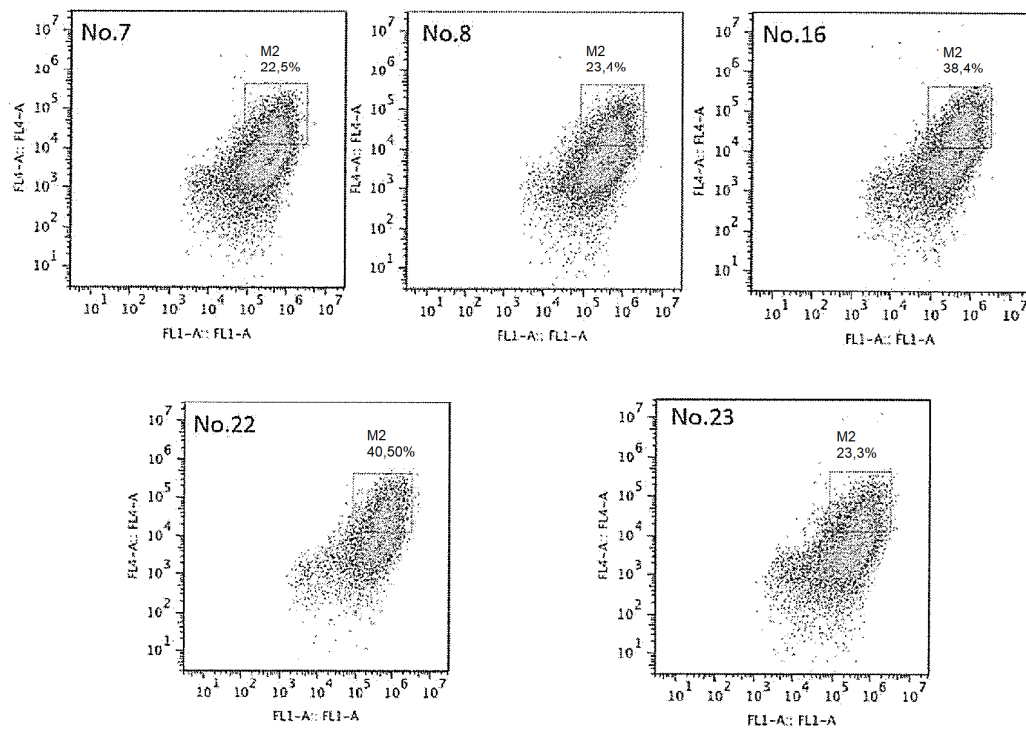


Fig. 16

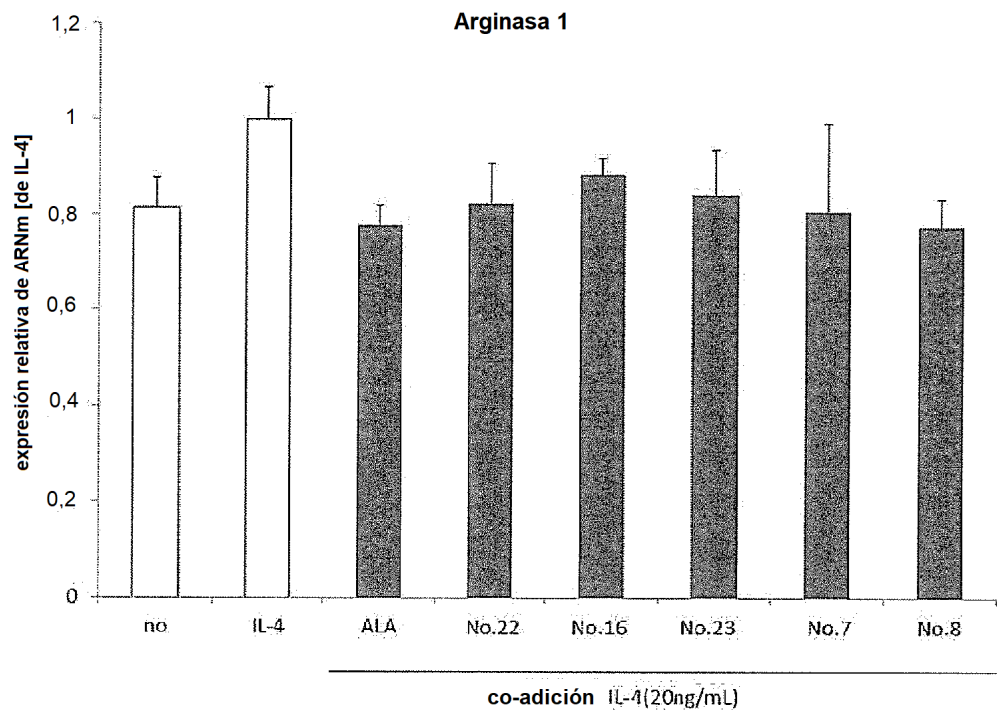


Fig. 17

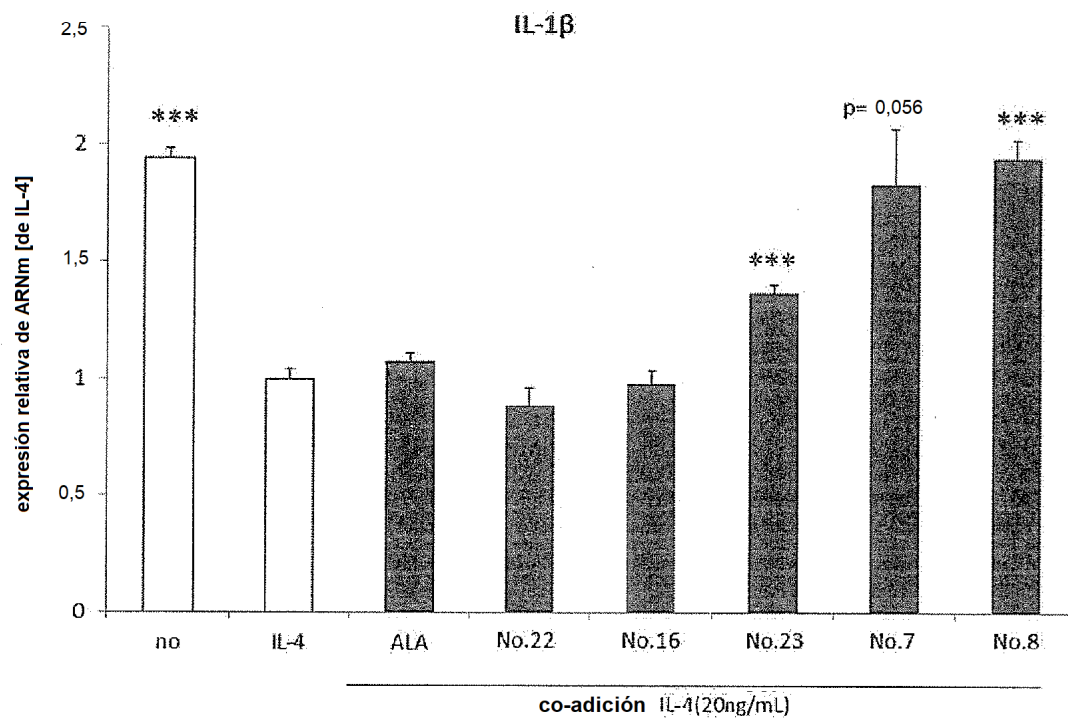


Fig. 18

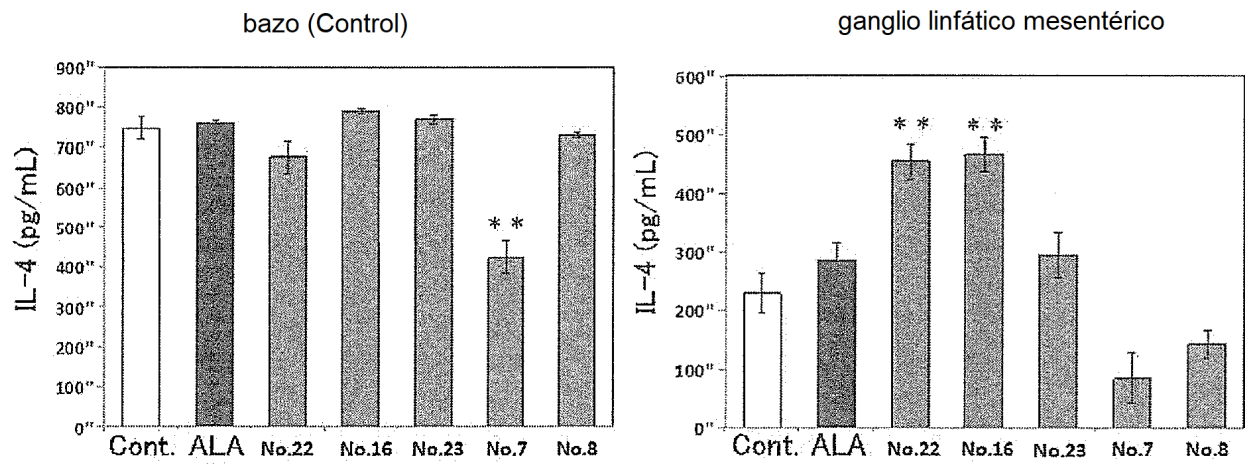


Fig. 19

