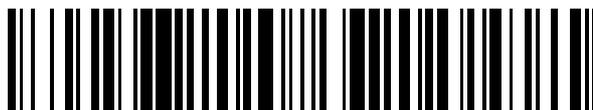


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 652**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/122** (2006.01) **A61P 21/00** (2006.01)  
**A61K 31/21** (2006.01)  
**A61P 1/04** (2006.01)  
**A61P 1/18** (2006.01)  
**A61P 3/06** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 9/12** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)  
**A61P 13/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2005 E 13177080 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2653157**

54 Título: **Astaxantina para mejorar la atrofia muscular**

30 Prioridad:

**04.02.2004 JP 2004028698**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.10.2016**

73 Titular/es:

**FUJI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD. (50.0%)**  
**55 Yokohoonji, Kamiichi-machi, Nakaniikawa-gun**  
**Toyama 930-0397, JP y**  
**NAITO, YUJI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NAITO, YUJI;**  
**TAKAHASHI, JIRO y**  
**AOI, WATARU**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 587 652 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**

Astaxantina para mejorar la atrofia muscular

**5 Campo técnico**

La presente invención se relaciona, en general, con un agente regulador de la expresión génica que comprende astaxantina y/o su éster como principio activo y con un alimento y una bebida que tienen un efecto de regulación de la expresión génica y que contienen astaxantina y/o su éster. El alcance de la invención queda definido por las reivindicaciones adjuntas.

**Técnica anterior**

En los últimos años, se ha prestado atención a la relación existente entre el daño oxidativo inducido por sustancias oxidadas y la cardiopatía coronaria, el cáncer, el envejecimiento o similares, especialmente a la relación con el deterioro de los tejidos y la inhibición de la función enzimática o la expresión génica debido a la oxidación de moléculas en el organismo vivo. La inhibición del daño oxidativo inducido por los radicales libres puede reducir el riesgo de padecer dichas enfermedades degenerativas. Existen informes sobre la inhibición de la oxidación de moléculas en el organismo vivo por medio de antioxidantes naturales o sintéticos.

En los últimos años, se ha visto que la astaxantina, que es un tipo de carotenoide al igual que el  $\beta$ -caroteno, tiene un fuerte efecto antioxidante, de 100 a 1.000 veces más fuerte que la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) y aproximadamente 40 veces más fuerte que el  $\beta$ -caroteno. La astaxantina es un colorante rojo y se ha comido desde hace mucho tiempo. Está ampliamente distribuida en la naturaleza, especialmente en el océano, y se encuentra en, por ejemplo, crustáceos tales como gambas y cangrejos, peces tales como el salmón y el pargo, algas tales como el alga verde *Haematococcus* y levaduras tales como la levadura roja *Phaffia*. La astaxantina solía ser tratada únicamente como un colorante; sin embargo, desde los descubrimientos antes mencionados, se espera que la astaxantina sea un alimento sano en la industria.

La astaxantina tiene otras propiedades funcionales, y existen muchos informes sobre ello, incluyendo, por ejemplo, un efecto antiinflamatorio, un efecto antiaterogénico, un efecto mejorador de la capacidad para recordar, un efecto de ajuste del ritmo diurno, un efecto inmunoestimulante, un efecto antiestrés, un efecto mejorador de la resistencia muscular, un efecto protector de la retina frente a los daños inducidos por la luz, un efecto mejorador de la función reguladora de los ojos, un efecto mejorador de la calidad del esperma e inhibición de la inducción del cáncer de vejiga. Además, en cuanto a los efectos sobre la piel, se reportan efectos de inhibición de la pigmentación, de la producción de melanina y del envejecimiento debido a la luz.

Se ha dicho que la administración de astaxantina a ratones diabéticos reduce el nivel de glucosa en sangre y que la astaxantina tiene un efecto sobre el mejoramiento de la nefropatía diabética (Literatura no de patente 1). Además, la Literatura de patente 1 describe que la administración de astaxantina a ratones diabéticos reduce el síntoma de nefropatía diabética y proporciona un sistema de ingestión de alimento en base a las pruebas de ADN de un organismo individual.

Sin embargo, no se conoce la regulación de la expresión génica por la astaxantina y/o su éster.

Literatura no de patente 1

Naito Y. *et al.*; Astaxanthin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Rep*, 7(5), 290-3, 2002.

Literatura de patente 1

Solicitud de Patente Japonesa Abierta al Público N° 2003-265136 US6258855 desvela un método consistente en administrar una fuente de astaxantina en una cantidad terapéuticamente efectiva para prevenir, retardar y mejorar el síndrome del túnel carpiano y la tenosinovitis.

**Divulgación de la invención**

Los inventores de la presente invención buscaron sustancias que regularan la expresión génica con objeto de resolver los problemas antes mencionados. Como resultado, vieron que astaxantina y/o su éster actúan regulando la expresión génica. La invención ha sido conseguida en base a dichos hallazgos y proporciona un agente para uso en el tratamiento de la atrofia muscular según la reivindicación 1. Se describen aquí un agente regulador de la expresión génica que incluye astaxantina y/o su éster como principio activo y un alimento y una bebida que tienen un efecto de regulación de la expresión génica que contienen astaxantina o un éster de la misma.

Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un agente regulador de la expresión génica que incluye astaxantina y/o su éster como principio activo y un alimento y una bebida que tienen un efecto de regulación de la expresión génica que contienen astaxantina o un éster de la misma. El agente y el alimento y la bebida de la

divulgación son útiles para tratar, mejorar y prevenir la enfermedad causada por la promoción de la expresión génica y la enfermedad causada por la supresión de la expresión génica mediante la regulación de la expresión génica anormal.

5 Los inventores han investigado a fondo y han visto que la astaxantina y/o su éster tienen un efecto de regulación de la expresión génica. La invención se basa en dichos hallazgos.

10 Los ejemplos de referencia aquí presentados incluyen (1) un método para regular la expresión génica, que incluye la administración de al menos uno de astaxantina y un éster de la misma como principio activo; (2) un método para regular la expresión génica relacionada con citoquinas, que incluye la administración de al menos uno de astaxantina y un éster de la misma como principio activo; (3) un método para regular la expresión génica relacionada con TGF- $\beta$ , que incluye la administración de al menos uno de astaxantina y un éster de la misma como principio activo; (4) un método para regular la expresión génica relacionada con colágeno, que incluye la administración de al menos uno de astaxantina y un éster de la misma como principio activo; (5) un método para regular la expresión de un gen relacionado con el aumento y la disminución de las células musculares y de las células óseas, que incluye la administración de al menos uno de astaxantina y un éster de la misma como principio activo; (6) el método para regular la expresión génica según cualquiera de (1) a (5), donde el al menos uno de astaxantina y un éster de la misma es administrado como principio activo en forma de un alimento o de una bebida, y (7) un método para utilizar al menos uno de astaxantina y un éster de la misma para producir el agente regulador de la expresión génica de cualquiera de (1) a (6).

**Breve descripción del dibujo**

25 La FIG. 1 es una microfotografía del glomérulo renal del Ejemplo de referencia 1. db/db, db/db(Ax) y db/m son los glomérulos renales de ratones db/db, ratones a los que se ha administrado astaxantina y ratones db/m, respectivamente.

**Mejor modo de realización de la invención**

30 De aquí en adelante, se describirá la invención con detalle. En la presente divulgación, "efecto de regulación de la expresión génica" se refiere al efecto de regulación de la expresión génica anormal, que causa diversos tipos de enfermedades debido a una variedad de factores, a la expresión génica en condiciones normales, es decir, que cuando se promueve la expresión génica anormalmente, se inhibe la expresión génica, y, cuando se suprime la expresión génica anormalmente, se promueve la expresión génica, regulando así la expresión génica de una manera apropiada.

35 El gen que ha de ser regulado puede ser cualquier tipo sin limitación; como ejemplos del mismo, se incluyen genes relacionados con la oxidación, con citoquinas, con el colágeno, con el TGF y con el aumento y la disminución de células musculares y de células óseas.

40 Como ejemplos específicos del mismo, se incluyen genes relacionados con la producción de enzimas o factores implicados en la oxidación, tales como peroxirredoxina, catalasa, isocitrato deshidrogenasa (NSDAP+) y superóxido dismutasa; genes relacionados con la producción de enzimas o factores relacionados con las citoquinas, tales como septina, fibrosina, granulina, proteína dactilar RING, proteína fosfatasa, fosfoproteína segregada, tirosina kinasa de tipo FMS, receptor de eritropoyetina, factor estimulante de colonias, interleuquina y fibrosina; genes relacionados con la producción de enzimas o factores relacionados con el colágeno, tales como el receptor del factor de crecimiento de tipo insulina, los receptores de los depuradores de macrófagos, el colágeno de tipo XXV, el procolágeno de tipo IV, C1q y la proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral, el factor relacionado con C1q y la metaloproteínasa de la matriz; genes relacionados con la producción de enzimas o factores relacionados con el TGF, tales como la proteína de unión a FK506, la catenina beta, el homólogo de MAD, el transcrito inducido por TGF beta y fosfoproteínas seleccionadas; y genes relacionados con la producción de enzimas o factores relacionados con el aumento y la disminución de las fibras musculares o de las células musculares y las células óseas, tales como fosfatidil inositol 3 kinasa, lisosoma proteasa, proteasa citoplásmica, RT1 y neuronatina.

55 El agente regulador de la expresión génica de la divulgación del que la astaxantina y/o su éster forman parte y el alimento y la bebida de la divulgación de los que la astaxantina y/o su éster forman parte pueden tratar, mejorar y/o prevenir la enfermedad causada por la anomalía de la expresión génica.

60 El término "astaxantina" en la invención significa las que derivan de fuentes naturales o de fuentes sintéticas. Como ejemplos de las derivadas de fuentes naturales, se incluyen las derivadas de cáscaras de crustáceos, tales como gambas, krill y cangrejos; pieles o huevos de diversos tipos de peces y marisco; algas, tales como el alga verde Haematococcus; levaduras, tales como la levadura roja Phaffia; bacterias marinas; plantas con semillas, tales como Adonis y ranúnculo. Se puede disponer fácilmente de extractos naturales y de compuestos químicamente sintetizados.

65

La astaxantina puede ser obtenida cultivando, por ejemplo, la levadura roja *Phaffia*, el alga verde *Haematococcus* o bacterias marinas en un cultivo apropiado según un método conocido en la técnica. El alga verde *Haematococcus* es la más adecuada en términos de fácil cultivo y extracción y debido a que los productos resultantes contienen astaxantina en la más alta concentración y la productividad es elevada. Para el método de cultivo para obtener productos que contienen una gran cantidad de astaxantina a partir de algas verdes *Haematococcus*, es preferible un método de cultivo de tipo cerrado, que evita la mezcla y propagación de microorganismos heterólogos y permite que se mezclen menos impurezas. Por ejemplo, son adecuados los métodos siguientes: un método en el que se realiza el cultivo usando un aparato de cultivo que comprende un dispositivo de cultivo de tipo parcialmente abierto de forma abovedada, de forma cónica o de forma cilíndrica, y un dispositivo de descarga de gas dispuesto de forma que pueda moverse en el dispositivo de cultivo (Publicación Internacional N° WO 99/50384); un método en el que se realiza el cultivo irradiando en el interior con luz de una fuente luminosa dispuesta dentro de un dispositivo de cultivo de tipo cerrado; y un método en el que se realiza el cultivo en un fermentador tabular.

Se conocen diversos métodos para la extracción o purificación a partir del cultivo o de los crustáceos. La astaxantina y sus ésteres son sustancias liposolubles. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden extraer componentes que contengan astaxantina de fuentes naturales que contengan astaxantina con un solvente orgánico liposoluble, tal como acetona, alcohol, acetato de etilo, benceno y cloroformo. Además, también se puede realizar una extracción supercrítica usando dióxido de carbono y agua. Tras la extracción, se puede obtener una mezcla concentrada de la forma monoéster de astaxantina y la forma diéster de astaxantina eliminando el solvente según un método habitual. Se puede purificar luego el concentrado resultante con una columna de separación o por degradación con lipasas, de ser necesario.

De manera alternativa, la astaxantina puede ser extraída desecando algas *Haematococcus* cultivadas en el dispositivo de cultivo de forma abovedada o de tipo cerrado, extrayendo con acetona después de triturar, o realizando simultáneamente una trituración y una extracción en acetona, y eliminando luego la acetona. Este procedimiento es ventajoso porque los extractos resultantes contienen menos impurezas, es decir, menos sustancias que inhiban el efecto de regulación de la expresión génica de la invención, y por lo tanto contienen más astaxantina y triglicérido con una gran pureza.

Se puede usar la astaxantina en formas tales como extractos de astaxantina obtenidos mediante el método antes mencionado y polvos o soluciones que contienen los extractos, o productos desecados de v.g., la levadura roja *Phaffia*, el alga verde *Haematococcus* o bacterias marinas y productos triturados de los mismos.

La astaxantina es 3,3'-dihidroxi- $\beta$ , $\beta$ -caroteno-4,4'-diona y tiene estereoisómeros. Concretamente, se conocen tres estereoisómeros, (3R,3'R)-astaxantina, (3R,3'S)-astaxantina y (3S,3'S)-astaxantina, todos los cuales pueden ser usados en la invención.

En la descripción de la invención, "astaxantina" incluye astaxantina y/o su éster a menos que se describa algo diferente. Además, los ésteres de astaxantina incluyen la forma monoéster y/o la forma diéster.

Se sabe que no se ha observado que la astaxantina tenga ninguna mutagenicidad y que es un compuesto altamente seguro. Es ampliamente utilizada como aditivo alimentario (Takahashi Jiro *et al.*; Toxicity test of *Haematococcus* alga astaxanthin-Ames test, rat single-dose toxicity test, rat 90-day repeat dose oral toxicity test-, Rinsho Iyaku, 20: 867-881, 2004.).

Se puede usar al menos una de la forma libre, la forma monoéster y la forma diéster de astaxantina para el agente regulador de la expresión génica aquí descrito que incluye astaxantina y/o su éster como principio activo. La forma diéster es físicamente más estable que la forma libre y la forma monoéster y es difícil que resulte afectada por la descomposición oxidativa, ya que sus dos grupos hidroxilo están protegidos por enlaces éster. Sin embargo, cuando entra en el organismo vivo, se considera que se hidroliza rápidamente a astaxantina libre por enzimas *in vivo* para ejercer su efecto.

Como monoésteres de astaxantina, se incluyen ésteres de ácidos grasos saturados inferiores o superiores, o ésteres de ácidos grasos insaturados inferiores o superiores. Como ejemplos específicos del ácido graso saturado inferior o superior, o del ácido graso insaturado inferior o superior, se incluyen ácido acético, ácido láurico, ácido mirístico, ácido pentadecanoico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido heptadecanoico, ácido eláidico, ácido ricinoleico, ácido petroselinico, ácido vaccénico, ácido oleostearico, ácido punícico, ácido licanoico, ácido palinámico, ácido gadólico, ácido 5-eicosenoico, ácido 5-docosenoico, ácido cetólico, ácido ercinoico, ácido 5,13-docosadienoico, ácido selacólico, ácido decenoico, ácido stering, ácido dodecenoico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido linoleico, ácido linolénico y ácido araquidónico. Como diésteres de astaxantina, se incluyen diésteres de los mismos ácidos grasos o de otros diferentes seleccionados entre el grupo consistente en los ácidos grasos anteriormente mencionados.

Además, como ejemplos de monoéster de astaxantina, se incluyen monoésteres de un aminoácido, tal como glicina y alanina; un ácido mono- o policarboxílico, tal como ácido acético y ácido cítrico; un ácido inorgánico, tal como

ácido fosfórico y ácido sulfúrico; un azúcar, tal como un glucósido; un ácido graso de azúcar, tal como glicoglicero-ácido graso y esfingoglico-ácido graso; un ácido graso, tal como ácido glicerograso; ácido glicerofosfórico; y similares. Cuando es posible, también se incluyen sales de los monoésteres antes mencionados.

5 Como diésteres de astaxantina, se incluyen diésteres compuestos por los mismos ácidos u otros diferentes seleccionados entre el grupo consistente en los ácidos grasos saturados inferiores, los ácidos grasos saturados superiores, los ácidos grasos insaturados inferiores, los ácidos grasos insaturados superiores, los aminoácidos, los ácidos mono- o policarboxílicos, los ácidos inorgánicos, los azúcares, los ácidos grasos de azúcares, los ácidos grasos y los ácidos glicerofosfóricos antes mencionados. Cuando es posible, también se incluyen sales de los  
10 diésteres antes mencionados. Como ejemplos de diésteres de ácido glicerofosfórico, se incluyen ésteres de ácidos grasos saturados de ácido glicerofosfórico y ésteres de ácido glicerofosfórico que contienen ácidos grasos seleccionados entre ácidos grasos insaturados superiores, ácidos grasos insaturados o ácidos grasos saturados.

15 El agente regulador de la expresión génica aquí descrito es útil para tratar, mejorar y/o prevenir el aumento de enzimas y factores causado por una expresión anormal y la disminución o deficiencia de enzimas y factores causada por una supresión anormal. Mediante la regulación de la expresión génica, se puede regular la producción y/o la inhibición de enzimas y factores. Así, el agente regulador de la expresión génica tiene un efecto sobre el tratamiento, el mejoramiento y/o la prevención de enfermedades que se dice se desarrollan debido a una expresión génica anormal, por ejemplo, arteriosclerosis, hipertensión, diabetes, cáncer, hiperlipemia, reumatismo, gota, accidente cerebrovascular, cardiopatía isquémica, enfisema pulmonar, úlcera gástrica, pancreatitis, nefritis, catarata, enfermedad de Alzheimer, enfermedad alérgica, envejecimiento, neuropatía como complicación de la diabetes, retinopatía, enfermedades relacionadas con nefropatía y hemopatía. En caso de neuropatía, el agente tiene un efecto sobre el tratamiento, el mejoramiento y/o la prevención de la pérdida repentina de audición, de la anomalía en los ojos o en la cara (parálisis y dolor), de la hipotensión ortostática, de la dishidrosis, de la diarrea y de la constipación (síntoma digestivo), de la alteración urinaria, del dolor de las extremidades, de la anomalía sensorial, de la atrofia de los músculos y de la gangrena. En caso de retinopatía, el agente tiene un efecto sobre la degeneración macular, el glaucoma, la catarata, la retinopatía simple, la retinopatía preproliferativa y la retinopatía proliferativa. En caso de hemopatía, el agente tiene un efecto sobre el tratamiento, el mejoramiento y/o la prevención del infarto cerebral y del infarto de miocardio.  
20  
25  
30

El agente regulador de la expresión génica para uso según la invención que incluye astaxantina y/o su éster como principio activo puede ser administrado oral o no oralmente. El agente puede ser administrado oralmente en forma sólida, tal como una tableta, una tableta de desintegración oral, una cápsula, un gránulo y un gránulo fino, o en forma líquida, tal como un jarabe y una suspensión. El agente puede ser administrado no oralmente en una forma tal como una inyección, un colirio, gotas nasales, una preparación adhesiva, un ungüento y un supositorio.  
35

El agente regulador de la expresión génica para uso según la invención que incluye astaxantina y/o su éster como principio activo puede incluir diversos tipos de aditivos utilizados en la producción de formulaciones generales en una cantidad apropiada. Como ejemplos de dichos aditivos, se incluyen excipientes, ligantes, acidulantes, agentes espumantes, edulcorantes artificiales, saborizantes, lubricantes, colorantes, estabilizadores, ajustadores del pH, surfactantes y similares. Como ejemplos de excipientes, se incluyen almidones, tales como almidón de maíz, almidón de patata, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón parcialmente pregelatinizado, almidón pregelatinizado y almidón poroso; azúcares, tales como lactosa, fructosa y glucosa; alcoholes de azúcares, tales como manitol, xilitol, eritritol, sorbitol y maltitol; y compuestos inorgánicos, tales como aluminometasilicato de magnesio, hidrotalcita, fosfato de calcio anhidro, carbonato de calcio precipitado, silicato de calcio y ácido silícico anhidro ligero. Como ejemplos de ligantes, se incluyen hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, polvo de goma arábiga, gelatina y pululano. Como ejemplos de desintegrantes, se incluyen almidón, agar, carmelosa calcio, carboximetilalmidón sodio, croscarmelosa sodio, crospovidona y celulosa cristalina. Como ejemplos de acidulantes, se incluyen ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico y ácido ascórbico. Como ejemplos de agentes espumantes, se incluyen hidrógeno carbonato de sodio y carbonato de sodio. Como ejemplos de edulcorantes, se incluyen sacarina sódica, glicirrizinato dipotásico, aspartame, Stevia y taumatina. Como ejemplos de saborizantes, se incluyen aceite de limón, aceite de naranja y mentol. Como ejemplos de lubricantes, se incluyen estearato de magnesio, ésteres de sacarosa y de ácidos grasos, polietilenglicol, talco, ácido esteárico y estearilfumarato de sodio. Como ejemplos de colorantes, se incluyen colorantes alimentarios, tales como el Amarillo Alimentario N° 5, el Rojo Alimentario N° 2 y el Azul Alimentario N° 2, colorantes de lacas alimentarios y trióxido diférrico. Como ejemplos de estabilizadores, se incluyen edentato de sodio, tocoferol y ciclodextrinas. Como ejemplos de ajustadores del pH, se incluyen citrato, fosfato, carbonato, tartrato, fumarato, acetato y una sal de aminoácido. Como ejemplos de surfactantes, se incluyen polisorbato 80, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa sodio, monolaurato de polioxietilensorbitán, goma arábiga y tragacanto en polvo. La astaxantina puede ser formulada como un polvo o un gránulo tras granulación húmeda.  
40  
45  
50  
55  
60

Se pueden obtener formas líquidas, tales como un jarabe, una bebida, una suspensión, un colirio y una inyección, preparando un principio activo en presencia de un ajustador del pH, de un tampón, de un resolvente, de una suspensión, de un agente de tonicidad, de un estabilizador, de un conservante, etc. en base a lo que resulte necesario según un método habitual. Como ejemplos de suspensiones, se incluyen polisorbato 80, metilcelulosa,  
65

hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa sodio, monolaurato de polioxietilensorbitán, goma arábiga y tragacanto en polvo. Como ejemplos de resolventes, se incluyen polisorbato 80, polioxietileno aceite de ricino hidrogenado, amida del ácido nicotínico, monolaurato de polioxietilensorbitán, macrogol y éster etílico de ácido graso aceite de ricino. Como ejemplos de estabilizadores, se incluyen sulfito de sodio y metasulfito de sodio. Como ejemplos de conservantes, se incluyen p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de etilo, ácido sórbico, fenol, cresol y clorocresol.

Con objeto de aumentar el efecto de regulación de la expresión génica, se pueden añadir sustancias que tengan capacidad antioxidante. Se piensa que un antioxidante aumenta el efecto de la astaxantina, por ejemplo, inhibiendo la oxidación de la astaxantina en el agente regulador de la expresión génica de la invención, o inhibiendo la oxidación de la astaxantina en el organismo vivo. El antioxidante no está particularmente limitado y son aplicables los que tienen un efecto antioxidante. El antioxidante puede ser seleccionado entre el grupo consistente en vitaminas A, tales como el retinol y el 3,4-dideshidrorretinol; vitamina B; vitaminas C, tales como el ácido D-ascórbico y el ácido L-ascórbico; vitaminas E, tales como el tocoferol, el tocotrienol, el acetato de vitamina E, el succinato de vitamina E y el fosfato de vitamina E; carotenoides, tales como el  $\beta$ -caroteno y la luteína, y sales farmacéuticamente aceptables de éstos; coenzima Q, flavonoide, tanino, ácido elálgico, polifenoles, ácidos nucleicos, hierbas medicinales, algas marinas y sustancias inorgánicas; y sus mezclas. Se pueden usar solos o en combinación. Además, se puede conseguir el mismo efecto incluyendo un fruto, o algas, hongos o similares, que contengan éstos en el agente de la invención.

Para una preparación externa para la piel, además de los componentes anteriores se pueden incluir apropiadamente según sea necesario componentes para uso en una preparación externa para la piel, tales como cosméticos y medicinas habituales, por ejemplo, un agente blanqueante, un humectante, un antioxidante, un componente oleoso, un absorbente ultravioleta, un surfactante, un espesante, un alcohol, un componente en polvo, un material colorante, un componente acuoso, agua, un suplemento nutricional para la piel o similar.

La cantidad de astaxantina o su éster para uso en el agente regulador de la expresión génica para uso según la invención corresponde a una dosificación de 0,5 mg a 100 mg, preferiblemente de 1 mg a 20 mg, en términos de astaxantina libre al día para adultos, administrados oral o no oralmente. La dosificación puede variar dependiendo de la edad, del peso corporal o del grado de los síntomas de un paciente al que se ha de administrar, o de la forma de administración. El agente farmacéutico para uso según la invención puede contener astaxantina en una cantidad del 0,01% en peso al 99,9% en peso, preferiblemente del 0,1% en peso al 90% en peso.

La presente divulgación incluye un alimento y una bebida que tienen un efecto de regulación de la expresión génica y que contienen astaxantina o su éster.

Como ejemplos de la forma del alimento y de la bebida, se incluyen alimentos comunes, tales como margarina, mantequilla, salsa de mantequilla, queso, nata cruda, manteca vegetal, manteca de cerdo, helado, yogur, productos lácteos, productos de salsa de carne, productos de pescado, encurtidos, patatas fritas, patatas a la inglesa, aperitivos, rebanadas finas de torta de arroz desecada, palomitas de maíz, polvo condimentado para espolvorear sobre arroz, goma de mascar, chocolate, budín, gelatina, golosinas gomosas, golosinas, gominolas, caramelo, pan, bizcocho, tarta, rosquilla, galletas, galletitas dulces, galletitas saladas, macarrones, pasta, fideos chinos en sopa, fideos de alforfón, fideos de harina de trigo, aceites para ensalada, sopa instantánea, aliños, huevos, mahonesa, miso o bebidas carbonatadas o no carbonatadas, tales como bebidas de frutas, refrescos, bebidas deportivas, bebidas no alcohólicas tales como té, café y cacao, o bebidas alcohólicas tales como licor, y bebidas alcohólicas medicinales.

El alimento y la bebida para uso según la invención pueden ser producidos formulando astaxantina y/o su éster con materias primas de alimentos comunes y procesando según un método habitual. La cantidad de astaxantina y/o su éster para la formulación es diferente según la forma de alimento y no está particularmente limitada. En general, la cantidad es del 0,00001% en peso al 10% en peso, preferiblemente del 0,0001% en peso al 5% en peso, y la astaxantina y/o su éster son ajustados de tal manera que haya la cantidad necesaria de astaxantina y/o su éster para ejercer el efecto de prevención o mejoramiento. La cantidad de astaxantina y/o su éster que se ha de utilizar puede ser seleccionada apropiadamente dependiendo del tipo de alimento y bebida por los expertos en la técnica, y la cantidad corresponde a una ingesta de 0,5 mg a 100 mg, preferiblemente de 1 mg a 20 mg al día para adultos.

Cuando el alimento y la bebida son usados como alimentos nutricionales y suplementarios o como alimentos funcionales, sus formas pueden ser las mismas que la de la preparación farmacéutica antes mencionada. También se pueden usar en combinación proteína de leche, proteína de soja o proteína de albúmina de huevo, o su producto de descomposición, oligopéptido de clara de huevo, hidrolizado de soja o una mezcla de éstos con un solo aminoácido. El alimento y la bebida pueden estar en forma procesada, tal como alimentos líquidos naturales, alimentos nutricionales semidigeridos y alimentos nutricionales, bebidas, cápsulas o nutrientes enterales, etc. combinados con azúcares, grasas, elementos traza, vitaminas, emulsiones, sabores o similares. Para la forma de bebida, se puede combinar el material con la bebida como aditivos nutricionales, tales como aminoácidos, vitaminas y minerales y edulcorantes, especias, sabores, pigmentos, etc., con objeto de mantener un equilibrio de nutrientes o

de impartir un buen sabor cuando se ingiere. La forma del alimento y la bebida para uso según la invención no se limita a éstas.

5 A partir de aquí, se describirán Ejemplos para explicar la invención con más detalle, pero será obvio que la invención no se restringe a estos Ejemplos.

### Ejemplo de referencia 1

[Aparición de complicación diabética]

10 Se compraron ratones db/db hembra con diabetes de tipo II y db/m no diabéticos a Clea Japan, Inc. Se mantuvo a los ratones en condiciones de un ciclo de 12 horas de luz-obscuridad a una temperatura de 21°C a 25°C. Para su aclimatación, se alimentó a los ratones con CE-2 (Clea Japan, Inc.) y libre acceso al agua durante una semana. Se dividió a los ratones en tres grupos de 8 ratones cada uno (db/m no diabéticos, db/db diabéticos y db/db a los que se administró astaxantina) y se mantuvo a cada grupo con alimento *ad libitum*. Se alimentó a los ratones del grupo al que se administró astaxantina con una dieta que combinaba un 0,02% de astaxantina en términos de astaxantina libre con CE-2. Se mantuvo a cada grupo durante 12 semanas y se midieron el peso corporal, los niveles de glucosa en sangre, los niveles de 8-OHdG en orina, los niveles de albúmina en orina y la histopatología del riñón. La astaxantina aquí utilizada era AstaReal (marca registrada, Fuji Chemical Industry Co., Ltd.) 50F, que es un aceite compuesto por éster de astaxantina y ácido graso y triglicéridos y contiene un 5% de astaxantina en términos de astaxantina libre.

[Tabla 1] Cambio en el peso corporal y el nivel de glucosa en sangre

Grupo	Nivel de albúmina en orina (mg/dl)	Nivel de 8-OHdG en orina (mg/dl)
db/db	46,9±0,6	421,5±22,5
db/db (Ax)	46,2±1,5	325,2±38,5
db/m	30,2±1,2	119,4±3,6

25 Cada valor representa la desviación estándar \* p<0,01 grupo al que se realizó la administración frente al control (prueba t). db/db, db/db (Ax) y db/m son ratones db/db, ratones db/db a los que se administró astaxantina y ratones db/m, respectivamente.

30

[Tabla 2] Cambio en el nivel de albúmina en orina y el nivel de 8-OHdG en orina

Grupo	Nivel de albúmina en orina (mg/dl)	Nivel de 8-OHdG en orina (mg/dl)
db/db	236,2±173,5	335,8±67,9
db/db (Ax)	77,8±44,6	160,5±43,5
db/m	75,5±43,9	75,0±15,1

35 Cada valor representa la desviación estándar \* p<0,01 grupo al que se realizó la administración frente al control (prueba t).

Las Tablas 1 y 2 muestran el efecto de la astaxantina sobre los niveles de glucosa en sangre, los niveles de albúmina en orina y los niveles de 8-OHdG en orina en ratones diabéticos.

40 Estos resultados indican que la astaxantina en la diabetes reduce los niveles de glucosa en sangre, los niveles de albúmina en orina y los niveles de 8-OHdG en orina y, por lo tanto, tiene un efecto sobre la diabetes y la nefropatía diabética.

45 Se extirpó el riñón de cada uno de los ratones db/db, db/db(Ax) y db/m, se hicieron cortes finos y se observó entonces el glomérulo al microscopio. El mesangio glomerular de los ratones db/db estaba aumentado; sin embargo, el aumento del mesangio glomerular resultaba aparentemente inhibido en el caso de los db/db (Ax) a los que se había administrado astaxantina. La FIG. 1 es una microfotografía del tejido glomerular. Se reveló que, dado que la astaxantina inhibía la lesión del glomérulo renal, se reducía el aumento en los niveles de albúmina en orina y en los niveles de 8-OHdG en orina en la nefropatía diabética.

50

[Medición del grado de expresión génica]

55 Tras el período de mantenimiento de la prueba, se extirpó el riñón y se congeló a -80°C. Utilizando un sistema LM200 (Olympus Corporation), se cortó el glomérulo renal del riñón de los ratones manteniendo una baja temperatura. Se extrajo el ARNt del glomérulo renal usando el reactivo de extracción de ARNt "Isogen" (producido por Nippon Gene Co., Ltd.) y se llevaron luego a cabo la preparación de ARNc y la hibridación según el Affymetrix

GeneChip Eukaryotic Small Sample Target Labeling Assay Ver. II.

- (1) Síntesis de la primera hebra de ADNc: Se mezclaron 1 µl de solución de ARN total y 1 µl de cebador T7-Oligo(dT) 5 µM, se calentó a 70°C durante 6 minutos y se enfrió después a 4°C durante 2 minutos. Se añadieron 3 µl de RT\_Premix\_1 (1,5 µl de agua tratada con DEPC, 4 µl de tampón de primera hebra 5x, 2 µl de DTT (0,1 M), 1,5 µl de Mezcla dNTP (10 mM), 1 µl de inhibidor de ARNasa (40 U/µl) y 2 µl de SuperScript II (200 U/µl)) y se realizó una transcripción inversa a 42°C durante 1 hora. Se calentó la muestra a 70°C durante 10 minutos para inactivar el Super Script II y se enfrió después hasta 4°C.
- (2) Síntesis de la segunda hebra de ADNc: Se añadieron 32,5 µl de SS\_Premix\_1 (91 µl de agua tratada con DEPC, 30 µl de tampón de segunda hebra 5x, 3 µl de dNTP (10 mM), 1 µl de ADN ligasa de *E. coli* (10 U/µl), 4 µl de ADN polimerasa de *E. coli* (10 U/µl) y 1 µl de ARNasa H (2 U/µl)) a la solución de primera hebra de ADNc y se dejó que reaccionaran durante 2 horas a 16°C.
- (3) Se añadió al ADNc resultante 1 µl de ADN polimerasa T4 (5 U/µl) y se dejó que reaccionaran durante 10 minutos a 16°C, y se purificó por precipitación con etanol.
- (4) Transcripción *in vitro*: Se añadieron a la pella de ADNc de doble hebra seca 10 µl de reactivos (4 µl de agua tratada con DEPC, 4 µl de NTP premezclados, 1 µl de tampón de reacción 10x y 1 µl de mezcla enzimática 10x) y se dejó que reaccionaran a 37°C en un baño de agua durante 6 horas.
- (5) Se purificó el ARNc de primer ciclo usando el RNeasy Mini Kit de acuerdo con el protocolo del manual (QIAGEN).
- (6) A continuación, para la amplificación y el marcaje, se mezcló la muestra de ARNc con cebadores aleatorios (0,2 µg/µl), se trató a 70°C durante 10 minutos, se enfrió sobre hielo durante 2 minutos, se añadieron 5 µl de RT\_Premix\_2 (tampón de primera hebra 5x, DTT (0,1 M), mezcla de dNTP (10 mM), inhibidor de ARNasa (40 U/µl) y SuperScript II (200 U/µl)) y se dejó que reaccionaran a 42°C durante 1 hora.
- (7) Se llevó después a cabo la síntesis de la segunda hebra de ADNc añadiendo promotor T7-Oligo(dT) 5 µM, tratando a 70°C durante 6 minutos, enfriando a 4°C y añadiendo 62 µl de SS\_Premix\_2 (43 µl de agua tratada con DEPC, 15 µl de tampón de segunda hebra 5x, 1,5 µl de mezcla de dNTP (10 mM) y 2 µl de ADN polimerasa de *E. coli* (10 U/µl)).
- (8) Se añadió al ADNc resultante 1 µl de ADN polimerasa T4 (5 U/µl), se dejó que reaccionaran a 16°C durante 10 minutos y se purificó por precipitación con etanol.
- (9) Para llevar a cabo la transcripción *in vitro* y el marcaje con el Kit de Marcaje de Transcritos de ARN de Alto Rendimiento de Biomatriz ENZO, se añadieron 40 µl de reactivos (22 µl de solución tratada con DEPC, 4 µl de tampón de reacción HY 10x, 4 µl de ribonucleótidos marcados con biotina 10x, 4 µl de DTT 10x, 4 µl de mezcla de inhibición de ARNasa 10x y 2 µl de ARN polimerasa T7 20x) y se dejó que reaccionaran a 37°C durante 4 horas.
- (10) Se purificó el ARNc diana marcado con columnas RNeasy.
- (11) Se llevaron a cabo la fragmentación y la hibridación según el "GeneChip Expression Analysis Technical Manual".

Se hibridó el ARNc marcado preparado con un "Conjunto de Expresión en ratón 430A, que representaba un total de 22.690 transcritos de ratón" GeneChip (Affymetrix). Para el análisis de los datos, se usó el GeneChip Analysis Suite Ver. 5.1 (Affymetrix). Se llevaron a escala todas las micromatrices hasta una intensidad diana de 1.000 y se compararon con el ruido de fondo y la intensidad de tinción global. Se identificaron los transcritos expresados diferencialmente mediante algoritmos del programa Affymetrix.

[Tabla 3] Índice de intensidad de la expresión génica relacionada con el estrés oxidativo

Nº de acceso	db/db:db/m	db/db:db/db(Ax)	db/db(Ax):db/m	Descripciones
1424111_at	13,00	0,87	11,31	Receptor del factor de crecimiento de tipo insulina 2
1448061_at	5,28	0,25	1,32	Receptor del depurador macrofágico 1
1438655_a_at	4,59	0,19	0,87	Colágeno, tipo XXV, alfa 1
1425476_at	4,00	0,50	2,00	Procolágeno, tipo IV, alfa 5
1424762_at	0,62	2,00	1,23	C1q y proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral 5
1422777_at	0,54	1,32	0,71	Factor relacionado con C1q
1449366_at	0,31	2,00	0,62	Metaloproteinasa de la matriz 8

\* El Nº de acceso es el número del sitio del "Conjunto de Expresión en ratón 430A" al que se unen las sondas; db/db:db/m, db/db(Ax):db/m y db/db(Ax):db/m representan el índice de intensidad de expresión génica entre los ratones db/db y los ratones db/m, el índice de intensidad de expresión génica entre los ratones db/db y los ratones db/db a los que se administró astaxantina y el índice de intensidad de expresión génica entre los ratones db/db a los que se administró astaxantina y los ratones db/db, respectivamente. En las "Descripciones", se muestran los factores con los que se asocia la sonda unida. Las Tablas 4 a 6 que se muestran a continuación son descritas de la

misma manera.

[Tabla 4] Índice relativo de expresión génica relacionada con citoquinas

Nº de acceso	db/db:db/m	db/db(Ax):db/db	db/db(Ax):db/m	Descripciones
1434099_at	78,79	0,87	68,59	Caspasa 7
1420811_a_at	32,00	0,38	12,13	Catenina beta
1422486_a_at	27,86	1,00	27,86	Homólogo MAD 4 (Dorosophia)
1448184_at	9,85	0,66	6,50	Proteína de unión a FK506 1a
1454971_x_at	5,66	0,57	3,25	Transcripto 4 inducido por el factor de crecimiento transformante beta 1
1449254_at	4,92	0,13	0,66	Fosfoproteína segregada 1
1425742_a_at	4,29	0,33	1,41	Transcripto 4 inducido por el factor de crecimiento transformante beta 1

5

[Tabla 5] Índice relativo de expresión génica relacionada con citoquinas

Nº de acceso	db/db:db/m	db/db(Ax):db/db	db/db(Ax):db/m	Descripciones
1436691_x_at	64,00	0,14	9,19	Peroxirredoxina 1
1416430_at	25,99	0,33	8,57	Catalasa
1419821_s_at	21,11	0,33	6,96	Isocitrato deshidrogenasa 1 (NADP+), soluble
1448184_at	17,15	0,23	4,00	Superóxido dismutasa 1, soluble
1448733_at	10,56	0,76	8,00	Región de inserción blinfoma Mo-MLV 1

[Tabla 6] Índice relativo de expresión génica relacionada con citoquinas

Nº de acceso	db/db:db/m	db/db(Ax):db/db	db/db(Ax):db/m	Descripciones
1454610_at	48,5	0,76	36,76	Septina 7
1433816_at	25,99	0,31	8	Fibrosina 1
1438629_x_at	16	0,19	3,03	Granulina
1449036_at	16	0,1	1,62	Proteína dactilar ring 128
1423344_at	0,31	2,30	0,71	Receptor de eritropoyetina

10

Se ve que los genes excesivamente expresados de los ratones db/db en los que ha tenido lugar una expresión génica anormal son moderados.

[Tabla 7] Peso del gastrocnemio y cambio en el índice de atrofia

15

		Grupo control	Grupo Ax
Peso corporal (g)		343,8	338,7
Gastrocnemio	Peso de la extremidad posterior derecha (mg)	5,05±0,32	4,94±0,27
	Peso de la extremidad posterior izquierda (mg)	2,84±0,28	3,08±0,10
	Porcentaje de contracción (%)	43,8	37,7

El grupo Ax tenía un valor menor de índice de atrofia en comparación con el grupo control, lo que indica que Ax tiene un efecto de moderación de la atrofia muscular. El índice de riesgo era del 5% o inferior y se obtuvieron resultados significativos.

20

[Tabla 8] Expresión génica relacionada con el aumento y la disminución de células musculares y de células óseas (aumento de expresión)

Nº de acceso	ad/nc	ad/nd	nd	nc	ad	ac	Descripciones
1369999_a_at	4,75	0,61	1043,2	135	640,7	106,4	Neuronatina
1377334_at	2,27	0,51	615,4	137,6	312	220,5	RT1 clase II, locus Ba
1387172_a_at	1,50	0,57	1179	452,6	677,8	479,9	Factor de crecimiento transformante, beta 2
1387353_at	1,21	0,67	1564	862,6	1042,	715,4	Homólogo 2 del oncogén vírico del timoma murino (v-akt)

\* El Nº de acceso es el número del sitio del "Conjunto de Expresión en ratón 430A" al que se unen las sondas; nd, nc, ad y ac son las intensidades de luminiscencia del sitio al que se unen las sondas de los genes en el músculo sóleo de la extremidad posterior izquierda (miembro en el que se extirparon los nervios) del grupo control, en el

músculo sóleo de la extremidad posterior derecha (control) del grupo control, en el músculo sóleo de la extremidad posterior izquierda (miembro en el que se extirparon los nervios) del grupo al que se administró astaxantina y en el músculo sóleo de la extremidad posterior derecha (control) del grupo al que se administró astaxantina, respectivamente; ad/nc y ad/nd representan el índice de intensidad de expresión génica del gen en el músculo sóleo de la extremidad posterior izquierda (miembro en el que se extirparon los nervios) del grupo al que se administró astaxantina en relación al gen en el músculo sóleo de la extremidad posterior derecha (control) del grupo control y el índice de intensidad de expresión génica del músculo sóleo de la extremidad posterior izquierda (miembro en el que se extirparon los nervios) del grupo al que se administró astaxantina en relación al músculo sóleo de la extremidad posterior izquierda (miembro en el que se extirparon los nervios) del grupo control, respectivamente. En las "Descripciones", se muestran factores con los que se asocia la sonda unida. La Tabla 9 es descrita de la misma manera.

Se ve que la administración de astaxantina modera el aumento de la expresión de los genes relacionados con la atrofia muscular con mayor expresión.

- 5 [Tabla 9] Expresión génica relacionada con el aumento y la disminución de células musculares y de células óseas (supresión de la expresión)

Nº de acceso	ad/nc	ad/nd	nd	nc	ad	ac	Descripciones
1398469_at	1,09	1,90	175,1	479,2	333,1	523,6	Proteína fosfatasa 3, isoforma gamma de la subunidad catalítica
1369098_at	1,00	1,49	213,1	501,2	318	500,5	Receptor de la lipoproteína de muy baja densidad
1369161_at	1,34	1,41	217,3	503,5	306,9	677,1	Cassette de unión a ATP, miembro de la subfamilia B (MDR/TAP)

- 10 Se ve que la administración de astaxantina aumenta la expresión de los genes relacionados con la atrofia muscular con supresión de la expresión.

**[Ejemplo de preparación de referencia 1] (Tableta)**

- 15 Se mezclaron uniformemente los ingredientes mostrados a continuación en la siguiente proporción de composición (% en peso) para preparar tabletas, cada una de 180 mg.

Astaxantina	5%
Lactosa	75%
Óxido de magnesio pesado	20%

20

**[Ejemplo de preparación de referencia 2] (Cápsula)**

- 25 Se introdujo aceite extraído de Haematococcus (que contenía un 10% en peso de astaxantina) en una película de cápsula blanda consistente en los siguientes componentes según un método habitual para preparar cápsulas blandas, cada una de 100 mg.

Gelatina	70%
Glicerina	23%
p-Hidroxibenzoato de propilo	0,5%
Agua	Cantidad apropiada
Total	100%

30

**Aplicabilidad industrial**

- 35 La presente divulgación reveló que la astaxantina tiene un efecto de regulación de la expresión génica y lleva la expresión génica a condiciones normales. A saber, el agente regulador de la expresión génica de la presente divulgación es útil como agente regulador de la expresión génica que incluye astaxantina o su éster como principio activo.

**REIVINDICACIONES**

1. Un agente para uso en el tratamiento de la atrofia muscular que incluye:
  - 5 al menos uno de astaxantina y un éster de la misma.
  2. El agente para uso según la reivindicación 1, donde el éster de astaxantina es un éster de astaxantina y ácido graso.
- 10 3. El agente para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que es un alimento o una bebida.