

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 520**

51 Int. Cl.:

A61K 31/22 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2004 E 04729769 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 1621210**

54 Título: **Potenciador de la producción de adiponectina**

30 Prioridad:

28.04.2003 JP 2003123768

20.01.2004 JP 2004012265

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

03.09.2013

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (25.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku
Tokyo, JP;

SHIMOMURA, IICHIRO (25.0%);

MATSUZAWA, YUJI (25.0%) y

FUNAHASHI, TOHRU (25.0%)

72 Inventor/es:

SHIMOMURA, IICHIRO;

MATSUZAWA, YUJI;

FUNAHASHI, TOHRU y

TAKAGI, TOSHIYUKI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 421 520 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

Potenciador de la producción de adiponectina

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene como ingrediente activo uno o más inhibidores de HMG-CoA reductasa para su uso en el tratamiento o la prevención de hipoadiponectinemia.

Técnica antecedente

10 La adiponectina es una proteína que, específicamente, es producida en, y es secretada por, los adipocitos, y está íntimamente implicada en el balance energético y el metabolismo de la glucosa o lípidos (Maeda, K. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, 221, 286-289). En la actualidad, en los pacientes con enfermedades circulatorias, diabetes, obesidad, etc., la concentración en sangre de adiponectina disminuye (Ouchi, N. et al., Circulation, 1999, 100, 2473-2476; Lindsay, R.S. et al., Lancet, 2002, 360, 57-58; Arita, Y. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 257, 79-83). Además, se sabe que los pacientes con enfermedad renal que presentan bajas concentraciones de adiponectina en sangre tienen una mayor tasa de mortalidad debido a enfermedades del aparato circulatorio que los pacientes con altas concentraciones de adiponectina en sangre (Zoccali, C. et al., Journal of American Society of Nephrology, 2002, 13, 134-141). De esta manera, se cree que los estados de enfermedad que tienen bajas concentraciones de adiponectina en sangre, es decir hipoadiponectinemia, están íntimamente relacionados con enfermedades relacionadas con el estilo de vida, tales como enfermedades circulatorias (arteriosclerosis, hipertensión, etc.), diabetes u obesidad, y se cree que son una de sus causas básicas (Weyer, C. et al, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001, 86, 1930-1935, Hotta, K. et al, Diabetes, 2001, 50, 1126-1133). De esta manera, el tratamiento o la prevención de hipoadiponectinemia es útil también en el tratamiento o la prevención de las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, indicadas anteriormente causadas por hipoadiponectinemia.

25 Se conoce que la adiponectina tiene acciones que suprimen la adhesión de las células THP-1 a las células endoteliales vasculares, la expresión de las moléculas de adhesión, la diferenciación de las células vasculares de músculo liso, la formación de células espumosas de macrófagos y similares (Ouchi, N. et al. , Circulation, 1999, 100, 2473-2476; Ouchi, N. et al, Circulation 2001, 103, 1057-1063; Arita, Y. et al, Circulation 2002, 105, 2893-2898; Ouchi, N. et al, Circulation, 2000, 102, 1296-1301; Yokota, T. et al, Blood, 2000, 96, 1723-1732). Estos fenómenos biológicos son fenómenos intrínsecos que se producen durante la etapa inicial de la aparición de la arteriosclerosis (Ross, R. et al., Nature, 1993, 362, 801-809), y los efectos inhibidores demostrados por la adiponectina sobre estos fenómenos son extremadamente útiles para el tratamiento o la prevención de la arteriosclerosis. Además, se ha demostrado que el aumento de la concentración de adiponectina tiene efectos terapéuticos sobre la arteriosclerosis en un modelo animal real (Okamoto, Y. et al., Circulation, 2002, 106, 2767-2770).

30 Además, la adiponectina está también íntimamente relacionada con la resistencia a la insulina y la diabetes (Kondo, H. et al., Diabetes, 2002, 51, 2325-2328). Se sabe que la resistencia a la insulina aumenta en presencia de hipoadiponectinemia (Weyer, C. et al, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001, 86, 1930-1935, Hotta, K. et al, Diabetes, 2001, 50, 1126-1133), y en un modelo animal, se conoce que la administración de adiponectina demuestra una acción mejoradora del metabolismo de la glucosa que tiene efectos de mejora de la resistencia a la insulina, supresión de la producción de glucosa en el hígado, y similares (Yamauchi, T., et al., Nature Medicine, 2001, 7, 941-946; Berg, A.H. et al, Nature Medicine, 2001, 7, 947-953; Combs, T.P. et al, Clinical Investigation, 2001, 108, 1875-1881). De esta manera, el aumento de la concentración de adiponectina en sangre es útil para el tratamiento o la prevención de la diabetes y las complicaciones de diabetes causadas por la misma.

45 Se considera que los estados de enfermedad que presentan un aumento de resistencia a la insulina, concretamente, el síndrome de resistencia a la insulina, son una causa principal de la diabetes, así como la causa fundamental de las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, tales como las enfermedades circulatorias (arteriosclerosis, hipertensión, etc.) o la obesidad (McVeigh, G.E. et al., Current Diabetes Reports, 2003, 3, 87-92; Chaudhuri, A. et al., Current Diabetes Reports, 2002, 2, 305-310; Sorisky, A. et al., American Journal of Therapeutics, 2002, 9, 516-521), y la mejora de la resistencia a la insulina desempeña un papel importante en el tratamiento o la prevención de las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, indicadas anteriormente. En otras palabras, la mejora de la resistencia a la insulina es también útil para el tratamiento o la prevención de las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, indicadas anteriormente, causadas por el síndrome de resistencia a la insulina. Tal como se ha indicado anteriormente, debido a que la adiponectina tiene una acción de mejora de la resistencia a la insulina (Yamauchi, T. et al., Nature Medicine, 2001, 7, 941-946), un medicamento que mejora la producción de adiponectina es útil para el tratamiento o la prevención del síndrome de resistencia a la insulina, así como el tratamiento o la prevención de la diabetes, complicaciones de la diabetes, enfermedades circulatorias (arteriosclerosis, hipertensión, etc.) u obesidad causados por el síndrome de resistencia a la insulina.

Además, los conceptos de síndrome X, síndrome metabólico y similares han sido relegados recientemente a estados de enfermedad que aumentan el riesgo de enfermedad de la arteria coronaria a través de una compleja relación con enfermedades anormales del metabolismo de los lípidos, diabetes, síndrome de resistencia a la insulina, etc. (Reave, G.M., Diabetes, 1988, 37, 1595-1607; DeFronzo, R.A. et al, Diabetes Care, 1991, 14, 173-194; Matsuzawa, Y., Nihon-Naikagaku-Zasshi (J. Jap. Soc. Internal Medicine), 1995, 84, 209-212). Tal como se ha descrito anteriormente, debido a que la adiponectina es capaz de contribuir al tratamiento o la prevención de las respectivas causas del síndrome X, síndrome metabólico y similares, un medicamento que mejora la producción de adiponectina es también útil para el tratamiento o la prevención del Síndrome X, síndrome metabólico y similares.

En base a lo anterior, un medicamento que potencia la producción de adiponectina tiene una acción de mejora de la resistencia a la insulina y es útil como una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de la hipoadiponectinemia.

Aunque se conoce que ciertos tipos de compuestos de tiazolidina diona o antagonistas de los receptores cannabinoides CB₁ demuestran una acción potenciadora de la producción de adiponectina (por ejemplo, Maeda, N. et al, Diabetes, 2001, 50, 2094-2099; Bensaid, M. et al, Molecular Pharmacology, 2002, 360, 1623-1630; etc.), no se conoce que los inhibidores de HMG-CoA reductasa demuestran una acción potenciadora de la producción de adiponectina o efectos terapéuticos o preventivos para la hipoadiponectinemia.

Los inhibidores de HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA) reductasa son medicamentos terapéuticos bien conocidos para la hiperlipemia (por ejemplo, la patente US N° 4.346.227, etc.) Las estatinas son inhibidores típicos de la HMG-CoA reductasa, y se han confirmado efectos preventivos de enfermedades en los seres humanos en diversos estudios clínicos. Por ejemplo, se ha informado de que la pravastatina demuestra efectos (efectos preventivos) de supresión de la aparición de la arteriosclerosis, enfermedad de la arteria coronaria y diabetes en un estudio clínico dirigido a pacientes con hiperlipemia (por ejemplo, MacMahon, S. et al, Circulation, 1998, 97, 1784-1790; Pastor, J. et al., Lancet, 2002, 360, 1623-1630; Freeman, D. J. et al, Circulation, 2001, 103, 357-362; etc.).

Además, se ha informado de que ciertos tipos de inhibidores de la HMG-CoA reductasa tienen una acción de mejora de la resistencia a la insulina (por ejemplo, Mangaloglu, L. et al, Metabolism, Clinical and Experimental, 2002, 51, 409-418; Cingozbay, B. Y. et al, Journal of Medical Research International, 2002, 30, 21-25; Paolisso, G. et al, Atherosclerosis, 2000, 150, 121-127, etc.),

Ballantyne C.M. et al., Am J Cardiol, 2003, vol. 91, 25C-27C informa de los efectos de la rosuvastatina sobre lípidos variables en pacientes hipercolesterolémicos con características de síndrome metabólico.

El documento EP 0 956 867 A1 teoriza sobre el uso de inhibidores de la HMG-CoA reductasa, incluyendo la pravastatina, para mejorar los estados de enfermedad de resistencia a la insulina aumentando la NO sintetasa posiblemente reduciendo las asociaciones excesivas de membrana de proteína G, y tratando, de esta manera, enfermedades que muestran resistencia a la insulina, en particular, diabetes mellitus.

El documento WO 00/45818 divulga el uso de estatinas, incluyendo pravastatina, en la mejora de la neuropatía diabética.

Freeman D.J. et al., Circulation, 2001, vol.103, no. 3, 257-362 divulga el efecto protector del tratamiento de pravastatina sobre el desarrollo de la diabetes mellitus.

Los inventores de la presente invención encontraron que un inhibidor de la HMG-CoA reductasa tenía una mayor acción potenciadora de la producción de adiponectina, y es útil como una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de hipoadiponectinemia, que conduce a la finalización de la presente invención.

La presente invención es:

(1) una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de hipoadiponectinemia que comprende como un ingrediente activo uno o más inhibidores de la HMG-CoA reductasa, solubles en agua, seleccionados de entre el grupo que consiste en pravastatina y rosuvastatina, en un animal de sangre caliente.

(2) una composición farmacéutica para su uso según (1), en la que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es pravastatina; y

(3) una composición farmacéutica para su uso según (1) ó (2), en la que el animal de sangre caliente es un ser humano.

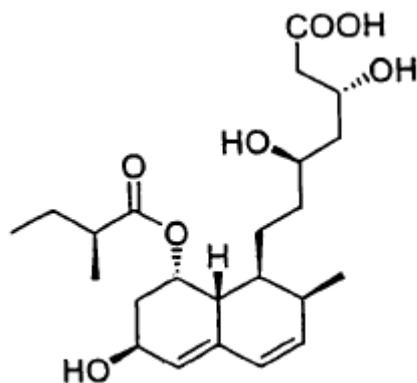
El inhibidor o los inhibidores de la HMG-CoA reductasa que sirven como un compuesto de ingrediente activo de la presente invención es un compuesto que demuestra la acción inhibidora de la HMG-CoA reductasa, seleccionado de entre pravastatina y rosuvastat, tal como se describe en la solicitud de patente japonesa (Kokai) N° Sho 57-2240 (patente US N° 4346227), solicitud de patente japonesa (Kokai) N° Hei 5178841 (patente US N° 5260440), preferiblemente pravastatina

En la presente invención, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, soluble en agua, es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa en el que el logaritmo del coeficiente de reparto medido entre una solución tampón de fosfato (pH 7,0 a 8,0, preferiblemente pH 7,0 a 7,5 y, más preferiblemente, pH 7,0) y 1-octanol [log (concentración de sustancia de ensayo en una fase de 1-octanol/concentración de sustancia de ensayo en la fase de solución tampón)] es 1,0 o inferior (preferiblemente 0,5 o inferior y, más preferiblemente, 0,0 o inferior) (McTaggart, F. et al, The American Journal of Cardiology, 2001, 87, 28B-32B; Chapman, M. J. et al, Atherosclerosis Supplements, 2002, 33-37; Shimada, Y. et al., Progress in Medicine, 1998, 18, 957-962). El coeficiente de reparto indicado anteriormente puede ser medido según los procedimientos ordinarios (Partition Coefficient (n-octanol/water), OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 1, Physical Chemical Properties, Paris, 1981, 107; Shimada, Y. et al., Progress in Medicine, 1998, 18, 957-962)) o procedimientos similares.

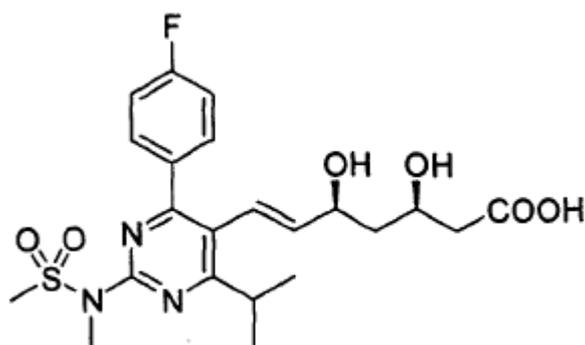
La pravastatina es ácido (+)-(3R,5R)-3,5-dihidroxi-7-[(1S,2S,6S,8S,8aR)-6-hidroxi-2-metil-8-[(S)-2-metilbutiriloxi]-1,2,6,7,8,8a-hexahidro-1-naftil]heptanóico, e incluye sus sales o ésteres farmacológicamente aceptables (por ejemplo, sal monosódica de pravastatina indicada anteriormente, etc.) tal como se describe en la solicitud de patente japonesa (Kokai) N° Sho 57-2240 (patente US N° 4346227).

La rosuvastatina es ácido (+)-(3R,5S)-7-[4-(4-fluorofenil)-6-isopropil-2-(N-metil-N-metanosulfonilamino)pirimidin-5-il]-3,5-dihidroxi-6(E)-heptenóico, e incluye sus sales o ésteres farmacológicamente aceptables (por ejemplo, 1/2 sal de calcio de la rosuvastatina indicada anteriormente, etc.) tal como se describe en la solicitud de patente japonesa (Kokai) N° Hei 5-178841 (patente US N° 5260440).

A continuación, se indican las fórmulas estructurales bi-dimensionales de estos inhibidores de la HMG-CoA reductasa.



Pravastatina



Rosuvastatina

Además, los hidratos de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa indicados anteriormente están incluidos también en el inhibidor de la HMG-CoA reductasa de la presente invención.

Para el inhibidor o inhibidores de la HMG-CoA reductasa que sirven como un compuesto de ingrediente activo en la presente invención, puede usarse un tipo de compuesto individual, o puede usarse una mezcla de dos o más tipos de compuestos. En el caso en el que se usa una mezcla de ambos tipos de compuestos, los compuestos pueden ser usados

simultáneamente o cada uno de los compuestos puede ser usado por separado, en momentos diferentes.

El inhibidor o inhibidores de la HMG-CoA reductasa que sirven como un ingrediente activo de la presente invención puede ser preparados fácilmente según procedimientos conocidos [por ejemplo, solicitud de patente japonesa (Kokai) N° Sho 57-2240 (patente US N° 4346227), solicitud de patente japonesa (Kokai) N° Hei 5-178841 (patente US N° 5260440), etc.] o procedimientos similares.

Aplicabilidad industrial

En el caso de usar el inhibidor de la HMG-CoA reductasa que sirve como un ingrediente activo de la presente invención como un producto farmacéutico (composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de las enfermedades indicadas anteriormente), puede ser administrado en forma de un medicamento a granel del propio producto farmacéutico, o puede ser administrado por vía oral en una formulación tal como comprimidos, cápsulas, gránulos, pastillas, polvo, líquido, jarabe, pastilla, suspensión, emulsión, etc., o puede ser administrado por vía parenteral en una formulación, tal como una inyección, supositorio o parche, etc., cuyas formulaciones se preparan mezclando el inhibidor de la HMG-CoA reductasa con un excipiente, aglutinante, etc., farmacológicamente aceptable adecuado.

Estas formulaciones se preparan usando procedimientos bien conocidos usando aditivos tales como excipientes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, emulsionantes, estabilizantes, correctores, diluyentes, disolventes de inyección, etc.

Un excipiente puede ser, por ejemplo, un excipiente orgánico o un excipiente inorgánico. Los ejemplos de excipientes orgánicos incluyen derivados de azúcar, tales como lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y sorbitol; derivados de almidón, tales como almidón de maíz, almidón de patata, almidón alfa, dextrina y carboximetil almidón; derivados de celulosa, tales como celulosa cristalina, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetil celulosa, carboximetil celulosa de calcio y carboximetil celulosa de sodio reticulada internamente; goma arábiga, dextrano y pululano. Los ejemplos de excipientes inorgánicos incluyen derivados de sal de ácido silícico, tales como ácido silícico anhidro ligero, silicato de aluminio sintético, silicato de calcio y metasilicato aluminato de magnesio; sales de ácido fosfórico, tales como fosfato de calcio; sales de ácido carbónico, tales como carbonato de calcio; y sales de ácido sulfúrico, tales como sulfato de calcio.

Los ejemplos de aglutinantes incluyen los compuestos descritos para el excipiente indicado anteriormente; gelatina; polivinilpirrolidona y polietilenglicol.

Los ejemplos de disgregantes incluyen los compuestos descritos para el excipiente indicado anteriormente; derivados de celulosa o almidón modificados químicamente, tales como croscarmelosa de sodio y carboximetil almidón sódico y polivinilpirrolidona reticulada.

Los ejemplos de lubricantes incluyen talco, ácido esteárico, estearatos metálicos tales como estearato de calcio y estearato de magnesio, sílice coloidal; ceras tales como goma de abeja y esperma de ballena; ácido bórico; glicol; DL-leucina; ácidos carboxílicos tales como ácido fumárico y ácido adípico; sales de sodio de ácidos carboxílicos tales como benzoato de sodio, sulfatos tales como sulfato de sodio; lauril sulfatos tales como lauril sulfato de sodio y lauril sulfato de magnesio; ácidos silícicos tales como ácido silícico anhidro e hidrato de ácido silícico, y los derivados de almidón anteriores como el excipiente indicado anteriormente.

Los ejemplos de emulsionantes incluyen arcillas coloidales tales como bentonita y goma de abeja; hidróxidos metálicos tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; tensioactivos aniónicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de calcio; tensioactivos catiónicos tales como cloruro de benzalconio, y tensioactivos no iónicos tales como éter alquilico de polioxietileno, éster de ácido graso de polioxietileno sorbitán, y éster de ácido graso de sacarosa.

Los ejemplos de estabilizantes incluyen ésteres de ácido parahidroxibenzoico tales como metil parabeno y propil parabeno; alcoholes tales como clorobutanol, alcohol bencílico y alcohol feniletílico, cloruro de benzalconio, fenoles tales como fenol y cresol, timerosal, ácido deshidroacético y ácido sórbico.

Los ejemplos de correctores incluyen edulcorantes, saborizantes amargos, fragancias, etc., usados ordinariamente.

Los ejemplos de diluyentes incluyen agua, etanol, propilenglicol, alcohol etoxi-isostearílico y éster de ácido graso de polioxietileno sorbitán.

Los ejemplos de disolventes de inyección incluyen agua, etanol y glicerina.

El inhibidor o inhibidores de la HMG-CoA reductasa que sirven como un ingrediente activo de la presente invención pueden ser administrados a un animal de sangre caliente (y particularmente un ser humano). La dosis puede ser variada en función de diversas condiciones, tales como los síntomas y la edad del paciente. En el caso de la administración oral, 0,1 mg (preferiblemente 0,5 mg) como límite inferior y 1.000 mg (preferiblemente 500 mg) como un límite superior pueden

ser administrados de una a seis veces por día para un ser humano adulto en función de los síntomas. En el caso de la administración parenteral, 0.01 mg (preferiblemente 0.05 mg) como un límite inferior y 100 mg (preferiblemente 50 mg) como un límite superior pueden ser administrados de una a seis veces por día para un ser humano adulto en función de los síntomas.

- 5 El inhibidor o inhibidores de la HMG-CoA reductasa que sirve como un ingrediente activo de la presente invención es útil como una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de la hipoadiponectinemia.

Además, la composición farmacéutica indicada anteriormente es para animales de sangre caliente y, preferiblemente, para seres humanos. Preferiblemente, una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de la presente invención es una composición farmacéutica para el tratamiento.

10 **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

A continuación se proporciona una explicación más detallada de la presente invención mediante los Ejemplos y los Ejemplos de formulación indicativos, pero la presente invención no está limitada a los mismos.

(Ejemplo 1) Acción potenciadora de la producción de adiponectina (in vitro)

(1) Cultivo de células

- 15 Una línea de células de preadipocitos 3T3-L1 se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células 3T3-L1 se sembraron en una placa de 24 pocillos, recubierta con colágeno, y se cultivaron hasta la saturación en medio de crecimiento (DMEM, glucosa 25 mM, 10% de FCS, 100 u/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin) bajo condiciones de 37°C y 5% de CO₂. Cinco días después de que la proliferación celular había llegado a un estado saturado, el medio se reemplazó con medio (DMEM, glucosa 25 mM, 10% de FCS, 100 u/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin) al que se había añadido insulina 1 µM, 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM y dexametasona 1 µM para iniciar la diferenciación de los adipocitos. Dos días más tarde, el medio se reemplazó con medio de crecimiento que contenía insulina 1 µM seguido además por un cultivo de células durante 2 días. Posteriormente, el medio se reemplazó con medio de crecimiento fresco cada 3 días, y los adipocitos 3T3-L1 se prepararon en el día 10 después del inicio de la diferenciación.

- 25 Los compuestos de ensayo que eran poco solubles en agua fueron usados después de ser disueltos en DMSO. Los compuestos de ensayo que eran fácilmente solubles en agua se disolvieron en agua estéril, seguido de la adición de la misma cantidad de DMSO que la usada para los compuestos de ensayo poco solubles en agua, indicados anteriormente. Además, en el caso de los compuestos de ensayo que son poco solubles en agua, el compuesto de ensayo puede ser disuelto en etanol y usado después de la adición de una solución acuosa 0,1 N de hidróxido de sodio después de agitación, según sea necesario.

- 30 Después de dejar que las células 3T3-L1 se diferencien adecuadamente en adipocitos, se añadió al medio un compuesto de ensayo a una concentración final de 10 µM seguido por el cultivo de las células durante 48 horas. Las células se cultivaron adicionalmente durante 24 horas después de cambiar el medio. Después del cultivo, las células se usaron para la medición de ARNm de adiponectina, mientras que el sobrenadante se usó para la medición de la cantidad secretada de adiponectina.

35 (2) Medición de ARNm de adiponectina

- Se extrajo el ARN a partir de células que habían sido tratadas con un compuesto de ensayo usando Sepasol (Nacalai-Tesque). A continuación, el ADNc se sintetizó usando el kit ThermoScript Reverse Transcriptase (marca registrada: Invitrogen) usando el ARN extraído como una plantilla. El ADNc sintetizado se amplificó usando FastStrand DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics), y el producto de PCR amplificado se detectó con LightCycler (Roche Diagnostics). Las secuencias y los números de SEQ ID en la lista de secuencias que se describirán más adelante para los cebadores usados y el 36B4 usado como un control interno se muestran a continuación.

Adiponectina: 5'-GATGGCAGAGATGGCACTCC-3'

(SEQ ID NO. 1: cebador de PCR de adiponectina)

- 45 5'-CTTGCCAGTGCTGCGGTCAT-3'

(SEQ ID NO. 2: cebador de PCR de adiponectina)

36B4: 5'-GCTCCAAGCAGATGCAGCA-3'

(SEQ ID NO. 3: cebador de PCR de 36B4)

5'-CCGGATGTGAGGCAGCAG-3'

(SEQ ID NO. 4: cebador de PCR de 36B4)

La cantidad de ARNm de adiponectina se midió según una RT-PCR cuantitativa. Las cantidades de ARNm de adiponectina en los grupos en los que se usaron pravastatina y rosuvastatina como compuestos de ensayo eran 1,6 veces y 1,3 veces mayores, respectivamente, que las del grupo de control.

(3) Medición de la cantidad de adiponectina secretada

La secreción de adiponectina en el sobrenadante de cultivo se detectó mediante Western Blot. 0,5 µl del sobrenadante de cultivo recuperado se fraccionaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12,5%, y la proteína después del fraccionamiento se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore). Posteriormente, el anticuerpo anti-adiponectina se unió a la membrana de PVDF y después de lavar con PBS, se hizo reaccionar con el anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante. Después de lavar la membrana de PVDF, se detectaron bandas de adiponectina usando reactivos de detección ECL (Amersham-Pharmacia). Las bandas se cuantificaron con un densitómetro (Molecular Devices).

Las cantidades de adiponectina secretada se analizaron mediante Western Blot. Las cantidades de adiponectina secretada en los grupos en los que se usaron pravastatina y rosuvastatina como compuestos de ensayo fueron 1,7 veces y 1,6 veces mayores, respectivamente, que las del grupo de control.

En base a los resultados descritos en (2) y (3) anteriormente, se determinó que un inhibidor de la HMG-CoA reductasa que sirve como un ingrediente activo de la presente invención tenía una mayor acción potenciadora de la producción de adiponectina, y es útil como una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de hipoadiponectinemia.

(Ejemplo 2) Acción potenciadora de la producción de adiponectina (in vivo) y acción potenciadora de la absorción de glucosa

(1) Administración de pravastatina a ratones en los piensos (i) Animales de ensayo

Se adquirieron ratones C57BL/6J (macho, de 5 semanas de edad) de Clea Japan y se usaron en el ensayo después de aclimatarlos al entorno del ensayo durante 1 semana. Los ratones fueron alojados en grupos 5 animales por jaula y tuvieron acceso sin restricciones al pienso (F2, granja Funabashi) y al agua.

(ii) Planificación

Se midieron los pesos corporales de los animales y se recogieron muestras de sangre en el día de inicio del ensayo, y los animales se dividieron en dos grupos de 5 animales por jaula en base a sus pesos corporales y los niveles de glucosa en la sangre. Las muestras de sangre se recogieron en el inicio del ensayo y en las semanas 6, 11 y 15 después del comienzo del ensayo. Se recogieron muestras de sangre de la vena de la cola en una cantidad igual a un tubo capilar heparinizado.

(iii) Procedimiento de administración

Se añadió pravastatina en polvo al polvo de F2 a 0,06% (peso/peso), se mezcló uniformemente y se proporcionó a los animales en jaulas individuales. La cantidad de alimento y el comportamiento general se comprobaron al menos una vez al día.

(iv) Medición

Los niveles de glucosa en sangre se midieron en los días en los que se recogieron las muestras de sangre. Los niveles de adiponectina se midieron simultáneamente para todas las muestras de sangre después de la finalización de la administración. El ensayo Wako de glucosa CII (Wako) y el Kit ELISA de adiponectina de ratón/rata (Otsuka Pharmaceutical) se usaron respectivamente para la medición.

(2) Ensayo de tolerancia a insulina con ratones dosificados con pravastatina

Un grupo al que se administró pravastatina mezclándola en la alimentación durante 15 semanas y un grupo no dosificado de ratones C57BL/6J (n = 5) se mantuvieron en ayunas durante 2 horas. Después de medir el peso corporal de cada animal, se administró insulina (Humalin, Lilly) por vía intraperitoneal a 0,5 u/kg, y las muestras de sangre se recogieron de la vena de la cola inmediatamente antes del inicio de la administración y a los 15, 30, 60 y 90 minutos después del inicio de la administración, seguido por la medición de los niveles de glucosa en sangre.

(3) Ensayo de absorción de glucosa usando adipocitos aislados de ratones dosificados con pravastatina

(i) El tejido adiposo epididimal se extirpó a partir de un grupo al que se administró pravastatina durante 16 semanas y un grupo no dosificado de ratones C57BL/6J (n = 5). El tejido adiposo extirpado fue manipulado bajo condiciones de 37°C en todo momento. El tejido adiposo se cortó en trozos pequeños con unas tijeras, seguido por la adición de medio (DMEM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 25 mM pH 7,4, 0,1% de BSA, 100 u/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomina) que contenía 1 mg/ml de colagenasa I (Worshington), y agitación a 37°C y 80 rpm. Después de la reacción, se añadieron 2,5 volúmenes del medio indicado anteriormente, los adipocitos se cribaron haciendo pasar la suspensión celular a través de un tamiz de malla de 260 µm, y se pasaron otra vez por un tamiz de malla de 100 µm para preparar una suspensión de adipocitos.

(ii) El ensayo de absorción de glucosa se llevó a cabo de la manera descrita a continuación. Se añadieron 100 µl de la suspensión celular indicada anteriormente, 90 µl de medio y 10 µl de solución de insulina a un tubo de poliestireno, mientras se agitaba suavemente para distribuir uniformemente los adipocitos en cada tubo, y los adipocitos se cultivaron durante 30 minutos a 30°C. Posteriormente, se añadieron 0,6 µCi de 2-desoxiglucosa marcada con ³H y se dejó reaccionar durante 30 minutos. Después de la reacción, la suspensión celular se transfirió inmediatamente a un tubo de centrifuga que contenía aceite de silicona y se centrifugó. Después de cortar con un cuchillo la capa de aceite de la capa superior que contenía los adipocitos, se transfirió a un vial de vidrio que contenía 4 ml de cóctel de líquido de contaje por centelleo Hionic Fluor (Perkin-Elmer) seguido de la medición de la radiactividad específica. La cantidad de radiactividad medida de la 2-desoxiglucosa-³H se usó como un indicador de la cantidad de glucosa absorbida por las células.

(4) Resultados

En la etapa (1) anterior, se administró pravastatina a ratones C57BL/6J durante 15 semanas, seguido por la medición de los niveles de glucosa en sangre y las concentraciones de adiponectina. Las concentraciones de adiponectina se midieron de la misma manera que en el Ejemplo 1. Aunque no había diferencias considerables en los niveles de glucosa en sangre entre el grupo de dosis de pravastatina y el grupo de no-dosis, las concentraciones de adiponectina en el grupo de dosis fueron 1,28 veces más altas que en el grupo no-dosis.

En el ensayo de tolerancia a la insulina descrito en (2), el grupo de dosis de pravastatina demostró niveles de glucosa en sangre considerablemente más bajos que el grupo de no-dosis a los 60 minutos después de la administración de la insulina (nivel de glucosa en sangre del grupo de no-dosis: 148 mg/dl, nivel de glucosa en sangre del grupo de dosis: 110 mg/dl).

En los adipocitos de los ratones C57BL/6J en (3), el grupo de dosis de pravastatina demostró una mayor sensibilidad a la insulina y una mayor absorción de glucosa que en el grupo de no-dosis. La cantidad de absorción de glucosa por el grupo de dosis de pravastatina fue 1,4 veces mayor que la del grupo de no-dosis.

A partir de los resultados indicados anteriormente, se encontró que un inhibidor de la HMG-CoA reductasa que sirve como un ingrediente activo de la presente invención potencia la producción de adiponectina, para aumentar la sensibilidad a la insulina y para mejorar la absorción de glucosa inducida por insulina, y se determinó que era útil como una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de hipoadiponectinemia.

Comprimidos (Ejemplo de formulación 1)

Después de mezclar 10 partes de pravastatina sódica, 71,55 partes de lactosa, 20 partes de hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (LH21, Shin-Etsu Chemical), 20 partes de celulosa cristalina (Avicel PH101, Asahi Kasei) y 6,5 partes de metasilicato aluminato de magnesio (Neusilin FL2, Fuji Chemical Industry) con un mezclador Henschel (Mitsui Mining), 13 partes de una solución acuosa al 10% de hidroxipropil celulosa (Nippon Soda) y una cantidad adecuada de agua se añadieron a la mezcla resultante seguido de amasado con un mezclador Henschel. El producto amasado resultante se secó durante 1 hora a 60°C con un secador de aire. El producto seco resultante fue molido con un molino de potencia (Dalton) equipado con un tamiz de 1 mm de diámetro, y 129,35 partes de los gránulos resultantes y 0,65 partes de estearato de magnesio (NOF Corporation) se mezclaron con un mezclador en V (Tokuju Seisakusho). La mezcla resultante se conformó en comprimidos para producir comprimidos que tenían un diámetro de 7,0 mm.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Shimomura, Iichiro Matsuzawa, Yuji Funahashi, Tohru Sankyo Company, Limited

<120> Potenciador de la producción de adiponectina

<130> FP0412KB

50 <160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Inventor: Shimomura, Iichiro Inventor: Matsuzawa, Yuji Inventor: Funahashi, Tohru Inventor: Takagi, Toshiyuki

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para PCR de adiponectina.

<400> 1

10 gatggcagagatggcactcc 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para PCR de adiponectina.

<400> 2

cttgccagtgtgcggatcat 20

<210> 3

20 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para PCR de 36B4.

25 <400> 3

gctccaagcagatgcagca 19

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador para PCR de 36B4.

<400> 4

ccggatgtgaggcagcag 18

35

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo uno o más inhibidores de la HMG-CoA reductasa seleccionados de entre el grupo que consiste en pravastatina y rosuvastatina, para su uso en el tratamiento o la prevención de hidoadiponectinemia en un animal de sangre caliente.
- 5 2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa, soluble en agua es pravastatina.
3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el animal de sangre caliente es un ser humano.