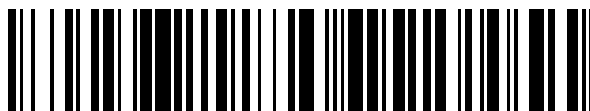


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 620**

51 Int. Cl.:

C07H 19/16 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2009 E 09818750 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2407474**

54 Título: **Triacetil-3-hidroxifeniladenosina y su uso para regular la grasa en sangre**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.12.2013

73 Titular/es:

**INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE
ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES (100.0%)
No. 1 Xian Nong Tan Street Xuanwu District
Beijing 100050, CN**

72 Inventor/es:

**ZHU, HAIBO;
WU, SONG;
HAO, LINGHUA;
QU, KAI;
ZHU, PING;
WANG, XING y
LI, WEI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 435 620 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

Triacetil-3-hidroxiifeniladenosina y su uso para regular la grasa en sangre

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a tri-acetil-3-hidroxiifenil adenosina, el procedimiento de preparación de la misma, las composiciones farmacéuticas que la contienen, y su uso en la fabricación de un producto farmacéutico para hiperlipidemia, que pertenece al campo de la tecnología médica.

10

Antecedentes de la invención

Las investigaciones básicas y los resultados de ensayos clínicos han probado que la hiperlipidemia, que incluye hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, e hiperlipidemia compleja, es un factor de riesgo clave de apoplejía, cardiopatía coronaria, infarto de miocardio, y muerte súbita debido a insuficiencia cardíaca. Además, la hiperlipidemia es un factor de riesgo clave para promover la hipertensión, intolerancia a la glucosa (IG) y diabetes. También da lugar a adiposidad hepática, cirrosis hepática, pancreatitis, hemorragia subhialoidea, acrois, angiopatía periférica, e hiperuricacidemia.

15

20

25

30

En la actualidad, los agentes reguladores de lípidos muy usados clínicamente contienen estatinas inhibidoras de enzimas biosintéticas de colesterol y fibratos activadores del factor de transcripción del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR). Las estatinas disminuyen la síntesis endógena del colesterol y reducen el colesterol con lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) por medio de la inhibición de la actividad de la HMG-CoA reductasa. Mientras tanto, las estatinas reducen en contenido en sangre de LDL incrementando o activando el nivel de expresión del receptor de LDL en la superficie hepatocelular. Los fibratos son una clase de regulador de lípidos que actúa principalmente sobre el triglicérido. Las dos clases de fármacos son la principal tendencia de reguladores de lípidos. La acción farmacodinámica clínica es exacta, la dosificación potente es baja y la biodisponibilidad es alta. Sin embargo, el efecto secundario de las dos clases, tal como lesión hepática y rabiomolisis, provoca problemas de seguridad preocupantes y que han de tratarse.

35

40

Comparado con el modelo de desarrollo de fármacos en los fabricantes de fármacos occidentales, el descubrimiento de un nuevo tipo de regulador de lípidos en la fitoterapia tradicional china es una nueva forma de desarrollo de fármacos que es adecuada para nuestro país. Gran parte de la fitoterapia china con una acción reguladora de lípidos buena y efecto adverso bajo tiene una amplia perspectiva de aplicación. Por ejemplo, los triterpenos del espiño chino inhiben la síntesis de colesterol *in vivo* y aceleran la eliminación del colesterol. La antraquinona es el componente activo contenido en ruibardo, semen, y raíz de Polygonum Multiflorum (fleeceflower), promueve la enterocinasa, e incrementa la excreción de colesterol. El efecto de disminución de lípidos de está asociado con la interferencia de los compuestos de triterpenos con el metabolismo endógeno del colesterol. El danshensu en la salvia miltiorrhiza indica una acción inhibidora sobre la síntesis del colesterol *in vitro*. La salvia miltiorrhiza incrementa la excreción de ácido biliar. Las gipenosidas en Gold Theragran pueden reducir el nivel de LDL-C en sangre, colesterol total, y triglicéridos, y elevar el nivel de HDL-C.

Divulgación de la invención

45

En un aspecto, la presente invención se refiere a un nuevo compuesto de adenosina O², O³, O⁵-tri-acetil-N⁶-(3-hidroxiifenil) adenosina.

50

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un procedimiento de preparación del compuesto O², O³, O⁵-tri-acetil-N⁶-(3-hidroxiifenil) adenosina.

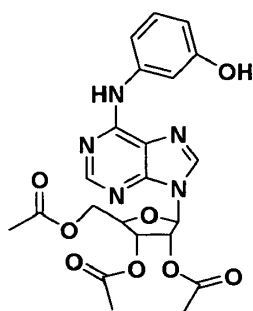
55

En otro aspecto más, la presente invención también se refiere al uso del compuesto O², O³, O⁵-tri-acetil-N⁶-(3-hidroxiifenil) adenosina para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de hiperlipidemia.

El esquema descrito a continuación se usó como solución en la presente invención:

60

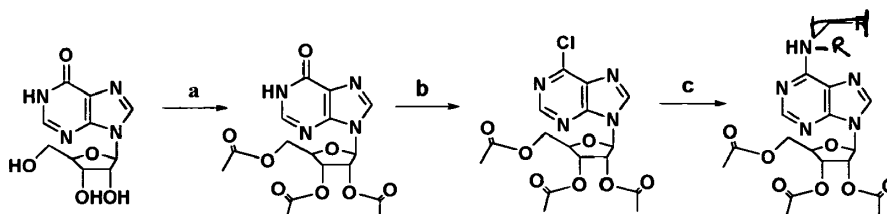
La estructura de O, O, O⁵-tri-acetil-N⁶-(3-hidroxiifenil) adenosina se describe como la fórmula (I).



(I)

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto (I) que se describe a continuación:
 Etapa 1: Se añadió anhídrido acético a una suspensión de inosina en un disolvente orgánica que dio el producto O^{2'}, O^{3'}, O^{5'}-tri-acetilinosina.

Etapa 2: El producto de la etapa 1, a saber O^{2'}, O^{3'}, O^{5'}-tri-acetilinosina se puede convertir en O^{2'}, O^{3'}, O^{5'}-tri-acetil-6-cloroadenosina llevando a cabo la reacción con SOCl₂. Etapa 3: Se disolvió O^{2'}, O^{3'}, O^{5'}-tri-acetil-6-cloroadenosina en un disolvente orgánico y tras la reacción con 3-aminofenol dio como producto el compuesto O^{2'}, O^{3'}, O^{5'}-tri-acetil-N^{6'}-(3-hidroxiifenil) adenosina.



en la que, R es 3-hidroxiifenilo

etapa uno: el disolvente orgánico se seleccionó de piridina; se añadió el anhídrido acético a de -5 a 5 °C, después se agitó a de 20 a 30 °C.

etapa dos: se llevó a cabo la reacción en presencia de trietilamina.

etapa tres: se purifica el producto final por cromatografía, el eluyente es acetato de etilo:éter de petróleo = 2:1.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de O^{2'}, O^{3'}, O^{5'}-tri-acetil-N^{6'}-(3-hidroxiifenil) adenosina como ingrediente activo. La composición farmacéutica se puede preparar de acuerdo con los procedimientos bien conocidos en la técnica. El compuesto de la presente invención se puede formular en cualquier forma de dosificación adecuada para su administración a seres humanos y animales en combinación con uno o más excipientes y/o coadyuvantes sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables. En general, el contenido del compuesto de la presente invención en la composición farmacéutica es de un 0,1 a un 95 % en peso.

El compuesto de acuerdo con la presente invención o una composición farmacéutica que comprende el compuesto se puede administrar en forma de dosis unitaria, las vías de administración pueden ser por administración intestinal o parenteral, tales como oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, nasal, bucal, mucosa, oftálmica, pulmonar y respiratoria, dérmica, vaginal, rectal, etc.

Las formas de dosificación para la administración pueden ser formas de dosificación líquidas, sólidas o semisólidas. Las formas de dosificación líquidas pueden ser soluciones (que incluyen soluciones verdaderas y soluciones coloidales), emulsiones (que incluyen el tipo aceite/agua, el tipo agua/aceite y emulsiones múltiples), suspensiones, inyecciones (que incluyen inyecciones acuosas, inyecciones en polvo e infusiones), gotas oftálmicas, gotas nasales, lociones y linimentos, etc.; las formas de dosificación sólidas pueden ser comprimidos (que incluyen comprimidos convencionales, comprimidos entéricos, comprimidos bucales, comprimidos dispersables, comprimidos masticables, comprimidos efervescentes, comprimidos de disgregación oral), cápsulas (que incluyen cápsulas duras, cápsulas blandas, cápsulas entéricas), gránulos, gránulos, bolitas, pastillas, supositorios, membranas, parches, aerosoles/inhalaciones de polvo, pulverizadores, etc.; Las formas de dosificación semisólidas pueden ser pomadas, geles, pastas, etc..

Los compuestos de la presente invención se pueden formular en formulaciones comunes, así como formulaciones de liberación sostenida, formulaciones de liberación controlada, formulaciones dirigidas y varios sistemas de

suministros de partículas.

Para formular los compuestos de la presente invención en comprimidos, se pueden usar ampliamente una variedad de excipientes bien conocidos en la técnica, que incluyen diluyentes, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes, lubricantes, deslizantes. Los diluyentes pueden ser almidones, dextrinas, sacarosa, glucosa, lactosa, manitol, sorbitol, xilitol, celulosa microcristalina, sulfato de calcio, hidrógenofosfato de calcio, carbonato de calcio y similares; los agentes humectantes pueden ser agua, etanol, isopropanol y similares; los aglutinantes pueden ser suspensión de almidón, dextrinas, jarabe, miel, solución de glucosa, celulosa microcristalina, mucílago de goma arábica, suspensión de gelatina, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, resinas acrílicas, carbómero, polivinilpirrolidonas, polietilenglicoles y similares; los disgregantes pueden ser almidones de secado, celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa poco sustituida, polivinilpirrolidonas reticuladas, croscarmelosa de sodio, carboximetil almidón de sodio, bicarbonato de sodio y ácido cítrico, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitol, laurilsulfato de sodio y similares; los lubricantes y deslizantes pueden ser talco, dióxido de silicio, estearato, ácido tartárico, parafina líquida, polietilenglicoles y similares.

Los comprimidos se pueden procesar adicionalmente para formar comprimidos recubiertos, por ejemplo, comprimidos recubiertos con azúcar, comprimidos recubiertos con película, comprimidos recubiertos entéricos o comprimidos con doble capa y comprimidos con múltiples capas.

Para formular la unidad de dosificación en cápsulas, los compuestos de acuerdo con la presente invención como ingrediente activo se pueden mezclar con diluyentes y deslizantes, y a continuación las mezclas se cargan directamente en cápsulas duras o blandas. Los compuestos de acuerdo con la presente invención como ingrediente activo también se pueden formular en primer lugar, junto con diluyentes, aglutinantes y disgregantes, en gránulos o bolitas, a continuación se cargan en cápsulas duras o blandas. Los diluyentes, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes, deslizantes para preparar los comprimidos de los compuestos de acuerdo con la presente invención también se pueden usar para preparar las cápsulas de los compuestos de acuerdo con la presente invención.

Para formular los compuestos de acuerdo con la presente invención en inyecciones, se puede usar agua, etanol, isopropanol, propilenglicol o una mezcla de los mismos como disolvente, y al que se puede añadir una cantidad adecuada de solubilizantes, codisolventes, modificadores de pH, agentes de control de la presión osmótica. Los solubilizantes o disolventes auxiliares pueden ser poloxámero, lecitina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, y similares; los modificadores de pH pueden ser fosfatos, acetatos, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, y similares; los agentes de control de la presión osmótica pueden ser cloruro de sodio, manitol, glucosa, fosfato, acetato, y similares. Para la preparación de inyecciones de polvo liofilizado, se pueden usar manitol, glucosa, etc. como agentes de soporte.

Además, los colorantes, conservantes, agentes de fragancia, agentes aromatizantes u otros aditivos también se pueden añadir a las formulaciones farmacéuticas si fuera necesario. Las formulaciones farmacéuticas también contienen otros agentes reguladores de lípidos.

En otro aspecto más, la invención divulga el uso de 2',3',5'-tri-O-acetil-N6-(3-hidroxifenil)adenosina para la preparación de fármacos para el tratamiento o profilaxis de hiperlipidemia. Tiene las ventajas de una actividad hipolipidémica significativa, menos toxicidad y efecto adverso así como metabolismo lento *in vivo*.

Para lograr el propósito del tratamiento y potenciar el efecto del tratamiento, el medicamento de la presente invención o la composición farmacéutica se puede administrar de cualquier modo conocido para su administración.

La dosis de los compuestos p composiciones farmacéuticas de la presente invención variarán en un amplio intervalo dependiendo de la naturaleza y la gravedad de las enfermedades que se previenen o tratan, condición individual de los pacientes o animales, vías de administración, formas de dosificación, y similares. En general, el intervalo de dosis diaria adecuado de los compuestos de acuerdo con la presente invención es de 0,001 a 150 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de 1 a 60 mg/kg de peso corporal, lo más preferentemente de 2 a 30 mg/kg de peso corporal. Dicha dosis se puede administrar como una unidad de dosis individual o unidades de dosis divididas, dependiendo de la experiencia clínica de los médicos y del régimen de dosis que incluye el uso de otros modos terapéuticos.

Los compuestos o composiciones de la presente invención se pueden administrar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos o los agentes para el tratamiento sintomático. Cuando un compuesto de la presente invención es sinérgico con otros agentes terapéuticos, su dosis se debe ajustar de acuerdo con la condición práctica.

Ejemplos

Las siguientes ejemplos ilustran la invención, pero no están destinados a que la invención esté limitada al ejemplo. Las RMN de ^1H en todos los casos son consistentes con la estructura. El desplazamiento químico (δ) característico expresado con (desplazamiento de TMS para un protón particular en Hz) / (frecuencia del espectrómetro en MHz) y el pico principal denominado con abreviaturas: por ejemplo, s, pico individual; d, pico doble; t, pico triple; q, pico cuádruple; m, pico múltiple; br, pico ancho; dd, pico doble-doble. La espectrometría de masas (m/z) se registra por

ESI. Se usa la siguiente abreviatura para el disolvente de uso común: DMSO, dimetil sulfóxido deuterado.

Ejemplo 1

5 Síntesis de O^{2'}, O^{3'}, O^{5'} -tri-acetil-N^{6'}-(3-hidroxiifenil)adenosina (ws070117)

10 Etapa 1: Se añadió anhídrido acético (16 ml) a una suspensión de inosina (5,36 g) en piridina seca (25 ml) a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. Se evaporó el disolvente *in vacuo*. Se añadieron 75 ml de agua al residuo, se agitó la suspensión durante 1/2 h, después se filtró y se lavó con agua (2 × 50 ml) proporcionando el producto blanco puro O^{2'}, O^{3'}, O^{5'} -tri-acetilinosina.

15 Etapa 2: Se disolvió O^{2'}, O^{3'}, O^{5'} -tri-acetilinosina en CH₂Cl₂ seco (50 ml) y DMF seco (1 ml) y se calentó hasta 40 °C. Se añadió gota a gota una solución de SOCl₂ (3,3 g) en CH₂Cl₂ (2,5 ml). Se sometió a reflujo suavemente la mezcla de reacción durante 6 h adicionales. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó con CH₂Cl₂. Se lavó la capa orgánica con solución saturada de NaHCO₃ (2 × 50 ml) y salmuera (2 X 50 ml) y (sulfato de sodio anhidro seco). Se concentró la fase orgánica *in vacuo* y se usó para la reacción posterior sin purificación adicional.

20 Etapa 3: A una solución de O^{2'}, O^{3'}, O^{5'} -tri-acetil-6-cloroadenosina (5,4 g) en etanol absoluto (30 ml) se le añadió 3-aminofenol (4,28 g) y trietilamina seca (3,96 g) ,y se sometió a reflujo la mezcla durante 8 h a 60 °C. Se dejó enfriar la solución y se concentró *in vacuo* y se cromatógrafió el residuo (acetato de etilo: éter de petróleo = 2:1) para dar O^{2'}, O^{3'}, O^{5'} -tri-acetil-N^{6'}-(3-hidroxiifenil) adenosina como un sólido blanco (1,51 g).

25 RMN de ¹H (400MHz, DMSO) δ: 9,83 (s,1H); 9,32 (s,1H); 8,52 (s,1H); 8,41 (s,1H); 7,48 (t,1H); 7,30 (d,1H); 7,08 (t,1H); 6,45 (dd,1H); 6,26 (d,1H); 6,05 (t,1H); 5,64 (t,1H); 4,42 (q,1H); 4,37 (q,1H); 4,25 (q,1H); 2,11 (s,3H); 2,04 (s,1H); 2,00 (s,3H).

ESI: m/z [MH⁺] 486,3753

30 Experimento farmacológico

Ejemplo 2: Efecto de WS070117 sobre lípido de plasma en rata con hiperlipidemia

35 Procedimientos:

2.1 Modelo animal y agrupación

40 Después de una semana de alojamiento, se alimentaron todas las ratas (120 ratas), excepto el grupo de control (20 ratas), con pienso de laboratorio de alto contenido en grasa. 4 semanas después, de acuerdo con el nivel de colesterol sérico (TC) y triglicéridos (TG), se dividieron los animales en seis grupos: Grupo de simvastatina (2 mg/kg); fenofibrato (50 mg/kg); WS070117 (12 mg/kg); WS070117 (6 mg/kg); WS070117 (3 mg/kg), 20 ratas en cada grupo.

45 2.2 Tratamiento de fármaco

Después de cuatro semanas con el modelo de dieta de alto contenido en grasa, se trataron las ratas con diferentes fármacos por administración intragástrica. Los animales de control recibieron un volumen igual de vehículo.

50 2.3 Análisis de parámetros de plasma

55 Al final de las 4 semanas de tratamiento de fármaco, los animales se sometieron a ayuno durante 12 horas antes de anestesiarnos por inyección intraperitoneal de pentobarbital de sodio (45 mg/kg), y se anticoagularon por 100 U/kg de heparina a través de inyección en la vena de la cola. Se recogieron muestras de sangre de la aorta abdominal en 15 min, y se separó el suero. Se detectaron TC, TG, HDL-C, LDL-C, ALT, FFA en suero. El hígado y la capa de grasa detrás del vientre se separaron y se pesaron, también se pesaron el hígado y la grasa retroperitoneal. Se detectaron SOD y MDA en hígado por un kit después de homogeneizar. Se retiró el tratamiento de fármaco de las ratas que quedan (10 ratas de cada grupo) mientras se continuó con el modelo de dieta de alto contenido en grasa. Dos semanas después, se recogió la muestra de sangre de la órbita, y se detectaron TC, TG en suero.

60 Resultados 1: Efectos de WS070117 en el lípido de plasma en ratas con hiperlipidemia

Después de alimentar con dieta de alto contenido en grasa, se incrementaron TC, TG, LDL-C y FFA en sangre, se disminuyó el HDL-C/LDL-C, las ratas experimentaron hiperlipidemia. Después del tratamiento con WS070117, se disminuyeron TC, TG y LDL-C, se incrementó HDL-C/LDL-C. WS070117 tuvo un efecto de regulación sobre el nivel de lípidos en sangre, y 6 mg/kg de WS070117 tuvo un efecto significativo sobre FFA de ratas. (Tabla 1)

Tabla 1. Efectos de WS070117 en el lípido de plasma en ratas con hiperlipidemia

Grupos	Dosis mg/kg	n	TC	TG	HDL-C	LDL-C	HDL/LDL	FFA
			mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	
Control	-	10	1,69±0,23	0,60±0,20	0,52±0,09	0,89±0,12	0,58±0,13)	0,88±0,23
Modelo	-	10	2,78±0,44 ^{###}	1,37±0,74 [#]	0,51±0,10	1,46±0,20 ^{###}	0,35±0,08 ^{###}	1,24±0,33 [#]
Simvastatina	2	10	2,22±0,36 ^{**}	0,76±0,21 [*]	0,59±0,13	1,24±0,24 [*]	0,50±0,16 [*]	0,96±0,39
Fenofibrato	50	10	2,23±0,53 [*]	0,70±0,19 [*]	0,59±0,17	1,16±0,28 [*]	0,53±0,16 ^{**}	1,13±0,30
WS070117	12	10	2,30±0,29 ^{**}	0,55±0,19 ^{**}	0,56±0,10	1,24±0,20 [*]	0,47±0,13 [*]	0,97±0,27
WS070117	6	10	2,11±0,24 ^{***}	0,52±0,13 ^{***}	0,59±0,18	1,19±0,18 ^{**}	0,52±0,19 [*]	0,94±0,17 [*]
WS070117	3	10	2,39±0,34 [*]	0,67±0,15 ^{**}	0,58±0,10	1,38±0,27	0,43±0,12	1,04±0,24

[#]p<0,05, ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001 frente a grupo de control; *p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 frente a grupo modelo

Resultado 2: Efectos sobre el peso de grasa retroperitoneal de ratas con hiperlipidemia

Los resultados mostraron que el peso de la grasa retroperitoneal de las ratas se incrementó significativamente alimentando continuamente con pienso de alto contenido en grasa mientras que disminuyó obviamente después de la administración de WS070117, lo que indicó que WS070117 podía inhibir significativamente la acumulación de grasa retroperitoneal (Tabla 2).

Tabla 2. Efectos en el peso de grasa retroperitoneal de ratas hiperlipidémicas tratadas por WS070117

Grupos	Dosis mg/kg	n	Ratas
			Peso de grasa (g/100 g de peso corporal)
Normal	—	10	0,64±0,24*
Modelo	—	10	0,98±0,31 [#]
Simvastatina	2	10	0,70 ± 0,28
Fenofibrato	50	10	0,68±0,16*
WS070117	12	10	0,64±0,22*
WS070117	6	10	0,67±0,12**
WS070117	3	10	0,67±0,33*

[#]p<0,05, ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001 frente a grupo de control; *p<0,05. ** p<0,01, ***p<0,001 frente a grupo modelo

Resultado 3: Efectos sobre la actividad SOD hepática y el contenido en MDA de ratas con hiperlipidemia

Los resultados mostraron que el contenido en MDA hepático de las ratas se incrementó significativamente mientras que la actividad de SOD disminuyó significativamente después de que tuvieran dietas de alto contenido en grasa durante 4 semanas. La actividad de SOD hepática se incrementó significativamente después de la administración con simvastatina, fenofibrato y WS070117. Se indicó que WS070117 tiene un efecto antioxidante por el hecho de que disminuyó el contenido en MDA hepático (Tabla 3).

Tabla 3. Efectos del tratamiento terapéutico de WS070117 sobre la actividad de SOD hepática y el contenido en MDA de ratas con hiperlipidemia

Grupos	Dosis mg/kg	Ratas	
		SOD U/g pr	MDA mmol/g pr
Normal	—	128,8 ± 36,3	5,99 ± 2,91
Modelo	—	77,7±19,2 ^{###}	10,91±2,05 ^{####}
Simvastatina	2	99,5±20,2*	9,29 ± 2,73
Fenofibrato	50	103,6±27,9*	9,35 ± 2,40
WS070117	12	107,7±26,4**	8,29±2,78*
WS070117	6	102,0±24,4*	8,71 ± 2,83
WS070117	3	93,3 ± 37,5	8,51 ± 3,32

[#]p<0,05, ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001 frente a grupo de control; *p<0,05. ** p<0,01, ***p<0,001 frente a grupo modelo

Resultado 4: Efectos sobre el peso del hígado y la actividad de ALT en suero de ratas con hiperlipidemia

Los resultados indicaron que la actividad de ALT en suero tendía a incrementarse pero sin una significación estadística en comparación con grupos normales después de que se le diera continuamente a las ratas dieta de alto contenido en grasa. El índice hepático (peso del hígado/100 g de peso corporal) se incrementó significativamente (Tabla 4).

Tabla 4. Efectos de WS070117 sobre el peso del hígado y la actividad de ALT en suero de ratas con hiperlipidemia

Grupos	Dosis mg/kg	Peso del hígado	ALT
		(g/100 g de peso corporal)	(U/L)
		Ratas	
Normal	-	3,18 ± 0,31	35,3 ± 14,4
Modelo	-	3,97±1,10 [#]	45,2 ± 18,4
Simvastatina	2	3,96 ± 0,93	40,4 ± 15,6
Fenofibrato	50	4,08 ± 0,36	40,3 ± 18,0
WS070117	12	3,26 ± 0,54	42,0 ± 16,6
WS070117	6	3,21 ± 0,38	41,6 ± 19,8
WS070117	3	3,22 ± 0,48	42,9 ± 13,7

[#]p<0,05, ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001 frente a grupo de control; *p<0,05. ** p<0,01, ***p<0,001 frente a grupo modelo

5 Resultado 5: Cambios del nivel de lípidos en sangre en ratas con hiperlipidemia después de la retirada de WS070117 durante 2 semanas

Los resultados mostraron que el contenido de TC en suero era significativamente menor que el del grupo modelo después de la retirada de los fármacos durante 2 semanas, lo que indicó que WS070117 podía mantener su efecto regulador de grasa en sangre durante más de 2 semanas (Tabla 5).

10 **Tabla 5. Efectos de WS070117 en el lípido de suero de ratas con hiperlipidemia experimental después de la retirada de los fármacos**

Grupos	Dosis mg/kg	n	TC mmol/l	Ratas
				TG mmol/l
Normal	—	8	1,85 ± 0,41	0,71 ± 0,23
Modelo	—	8	2,48±0,33 ^{###}	1,20±0,29 ^{###}
Simvastatina	2	8	2,14±0,33*	0,94±0,24*
Fenofibrato	50	8	2,08±0,49*	1,03 ± 0,19
WS070117	12	8	2,15±0,32*	1,01 ± 0,38
WS070117	6	8	2,02±0,43*	1,03 ± 0,22
WS070117	3	8	2,12 ± 0,45	1,04 ± 0,19

[#]p<0,05. ^{##}p<0,01. ^{###}p<0,001 frente a grupo de control; *p<0,05. ** p<0,01, ***p<0,001 frente a grupo modelo

15 Ejemplo 3: Efectos de WS070117 sobre la regulación de lípidos en plasma en un hámster con hiperlipidemia

Procedimientos:

3.1 Modelo animal y agrupación

20 Después de una semana de alojamiento, se alimentaron todos los hámsteres (n = 72), excepto el grupo de control (n = 12), con pienso de laboratorio de alto contenido en grasa. 4 semanas después, de acuerdo con el nivel de colesterol en suero (TC) y triglicéridos (TG), se dividieron los animales en seis grupos: grupo modelo; grupo de simvastatina (2 mg/kg); fenofibrato (50 mg/kg); WS070117 (12 mg/kg); WS070117 (6 mg/kg); WS070117 (3 mg/kg), 12 hámsteres en cada grupo.

25 3.2 Tratamiento de fármaco

Después de cuatro semanas con el modelo de dieta de alto contenido en grasa, se trataron las ratas con diferentes fármacos por administración intragástrica. Los animales de control recibieron un volumen igual de vehículo.

30

3.3 Análisis de parámetros de plasma

Al final de 4 semanas de tratamiento de fármacos, los animales se sometieron a ayuno durante 12 horas (10 de cada grupo). Al día siguiente, se anestesiaron por inyección intraperitoneal de pentobarbital de sodio (45 mg/kg). Se recogieron muestras de sangre de la aorta abdominal en 15 min, y se separó el plasma. Se detectaron TC, TG, HDL-C, LDL-C, ALT, FFA en plasma. El hígado y la grasa retroperitoneal se separaron y se pesaron y se calcularon los índices de hígado y de grasa. Se detectaron SOD y MDA en hígado por un kit después de homogeneizar. Se retiró el tratamiento de fármaco de los hámsteres que quedan (10 hámsteres de cada grupo) mientras se continuó con el modelo de dieta de alto contenido en grasa. Dos semanas después, se recogió la muestra de sangre de la órbita, y se detectaron TC y TG en suero.

Resultados 1: Efectos de WS070117 en el lípido de plasma en hámsteres con hiperlipidemia

Después de alimentar con dieta de alto contenido en grasa, se incrementaron TC, TG, LDL-C y FFA en sangre, pero disminuyó la tasa de HDL-C/LDL-C. Después de tratamiento con WS070117, se disminuyeron TC, TG y LDL-C en sangre, se incrementó la tasa HDL-C/LDL-C. WS070117 tuvo un efecto de regulación sobre el nivel de lípidos en sangre. (Tabla 6)

Tabla 6. Efectos de WS070117 en el lípido de plasma en hámsteres con hiperlipidemia

Grupos	Dosis mg/kg	n	TC mmol/l	TG mmol/l	HDL-C mmol/l	LDL-C mmol/l	HDL/LDL
Control	-	10	2,40 ± 0,76	1,77 ± 0,44	0,76 ± 0,17	1,60 ± 1,14	0,59 ± 0,24
Modelo	-	10	7,05±2,89 ^{###}	5,23±1,36 ^{###}	1,24±0,21 [#]	5,03±2,70 ^{##}	0,30±0,17 ^{##}
Simvastatina	2	10	4,46±1,63*	3,20±1,70**	1,12 ± 0,21	2,57±0,53*	0,45±0,12*
Fenofibrato	50	10	4,76±1,58*	3,80±1,04*	1,48 ± 0,40	3,04±0,82*	0,50±0,13**
WS070117	12	10	3,60±1,84**	3,44±1,29**	1,24 ± 0,40	2,26±0,47**	0,59±0,31*
WS070117	6	10	4,19±1,14**	3,67±1,46*	1,14 ± 0,18	3,00±0,90*	0,40±0,09*
WS070117	3	10	4,35±0,93*	4,26 ± 1,52	1,24 ± 0,26	3,68 ± 1,44	0,37 ± 0,11

[#]p<0,05, ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001 frente a grupo de control; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 frente a grupo modelo

Resultado 2: Efectos de WS070117 en la grasa retroperitoneal de hámsteres con hiperlipidemia

Después de alimentar con dieta de alto contenido en grasa, se incrementó la grasa retroperitoneal. Después de tratamiento con WS070117, se disminuyó la grasa retroperitoneal. (tabla 7)

Tabla 7. Efecto de WS070117 en la grasa retroperitoneal de hámsteres con hiperlipidemia

Grupo	Dosis mg/kg	n	grasa retroperitoneal (g/100 g)
Control	—	10	0,87±0,25 ^{***}
Modelo	—	10	1,61±0,30 ^{###}
Simvastatina	2	10	0,97±0,19 ^{***}
Fenofibrato	50	10	1,07±0,16 ^{***}
WS070117	12	10	1,31±0,27*
WS070117	6	10	1,23±0,23**
WS070117	3	10	1,26±0,34*

[#]p<0,05, ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001 frente a grupo de control; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 frente a grupo modelo

Resultado 3: Acción de antioxidación de WS070117 en hámsteres hiperlipidémicos

Como se muestra en la tabla 8, en comparación con el grupo de control, los hámsteres alimentados con dieta de alto contenido en grasa manifestaron un nivel mayor de MDA, y la actividad de SOD era significativamente menor. Sin embargo, la concentración de MDA de los hámsteres tratados con simvastatina, fenofibrato o WS070117 era menor que el grupo modelo, lo que indicó que WS070117 posee un efecto antioxidante.

Tabla 8. Efectos de WS070117 en la actividad de SOD hepática y concentración de MDA en hígados de hámsteres hiperlipidémicos

grupo	dosis mg/kg	SOD U/g pr	MDA mmol/g pr
control	—	132,0 ± 44,4	4,99 ± 1,86
modelo	—	74,6±30,0 ^{###}	8,50±2,65 ^{###}
Simvastatina	2	94,6 ± 38,0	4,48±0,96 ^{***}
Fenofibrato	50	94,0 ± 16,3	5,94±1,05*
WS070117	12	91,9 ± 22,9	4,60±0,92 ^{***}
WS070117	6	95,1 ± 31,6	4,23±0,72 ^{***}
WS070117	3	84,0 ± 19,6	4,80±1,20 ^{***}

#p<0,05, ^{###}p<0,01, ^{###}p<0,001 frente a grupo de control; *p<0,05. **p<0,01, ^{***}p<0,001 frente a grupo modelo

Resultado 4 Efectos de WS070117 en el peso del hígado y la actividad de ALT en animales hiperlipidémicos

Como se muestra en la tabla 9, la actividad de ALT en suero de hámsteres alimentados con dieta de alto contenido en grasa o administrados con emulsión de lípidos se incrementó ligeramente, pero sin mostrar significación. En el grupo modelo, el índice de hígado de rata fue mayor (p<0,05). Y la actividad de ALT en suero se redujo en ratas hiperlipidémicas administradas con WS070117.

Tabla 9. Efectos de WS070117 en el peso del hígado y la actividad de ALT en hámsteres hiperlipidémicos

grupo	dosis mg/kg	Peso del hígado	ALT (U/L)
		(g/100 g de peso corporal) rata	hámster
control	—	3,18 ± 0,31	81,9 ± 19,9
modelo	—	3,97±1,10 [#]	110,9 ± 43,1
Simvastatina	2	3,96 ± 0,93	99,9 ± 23,5
Fenofibrato	50	4,08 ± 0,36	97,3 ± 37,8
WS070117	12	3,26 ± 0,54	95,2 ± 34,8
WS070117	6	3,21 ± 0,38	91,7 ± 23,1
WS070117	3	3,22 ± 0,48	100,7 ± 38,2

#p<0,05, ^{###}p<0,01, ^{###}p<0,001 frente a grupo de control; *p<0,05. **p<0,01, ^{***}p<0,001 frente a grupo modelo

Resultado 5 Efecto hipolipidémico de WS070117 prolongado durante 2 semanas al menos después de la interrupción del fármaco.

Como se muestra en la tabla 10, los niveles de lípidos en suero de hámsteres tratados con WS070117 a 12 mg/kg y 6 mg/kg eran significativamente menores que los del grupo modelo, lo que indicaba que el efecto hipolipidémico de WS070117 duró durante 2 semanas al menos después de la interrupción del fármaco.

Tabla 10. Efectos de WS070117 en el nivel de lípidos en suero en hámsteres hiperlipidémicos después de la interrupción del fármaco

grupo	dosis mg/kg	TC mmol/l	TG mmol/l
control	—	2,47 ± 0,99	1,80 ± 0,41
modelo	—	6,73±1,84 ^{####}	5,45±1,46 ^{####}
Simvastatina	2	4,91±1,18*	4,58 ± 1,01
Fenofibrato	50	5,29 ± 2,13	4,16±0,86*

(Continuación)

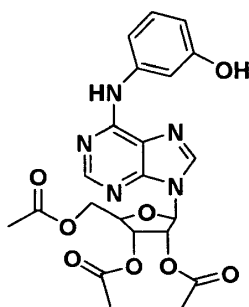
grupo	dosis mg/kg	TC mmol/l	TG mmol/l
WS070117	12	4,61±1,11*	3,82±0,66*
WS070117	6	5,02±1,35*	4,16±0,77*
WS070117	3	5,34 ± 1,32	4,36 ± 1,27

#p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 frente a grupo de control; *p<0,05. **p<0,01, ***p<0,00 frente a grupo modelo

5 En conclusión, los estudios farmacodinámicos demostraron que O2',O3',O5'-tri-acetil-N6-(3-hidroxilfenil) adenosina (WS070117), un compuesto sintetizado novedoso, pudo regular los niveles de lípidos de animales de modelo hiperlipidémicos tales como hámsteres y ratas, lo que indicó que O2',O3',O5'-tri-acetil-N6-(3-hidroxilfenil) adenosina desempeñó un papel terapéutico en la hiperlipidemia experimental.

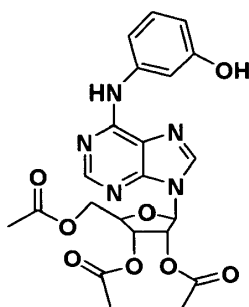
REIVINDICACIONES

1. O^2, O^3, O^5 -tri-acetil- N^6 -(3-hidroxifenil) adenosina representada por la siguiente fórmula general (I)



(I)

2. Un procedimiento para preparar O^2, O^3, O^5 -tri-acetil- N^6 -(3-hidroxifenil) adenosina representada por la siguiente fórmula general (I)



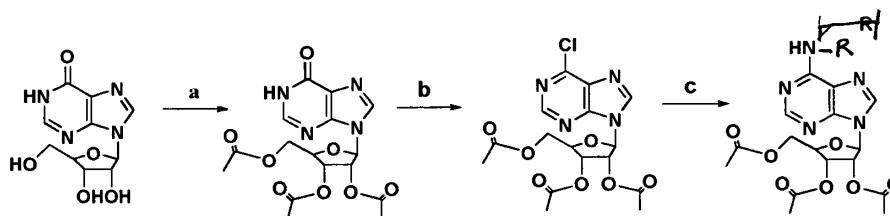
(I)

que está **caracterizado por que** el procedimiento incluye las siguientes etapas:

Etapla 1: Se añadió anhídrido acético a una suspensión de inosina en un disolvente orgánica que dio el producto O^2, O^3, O^5 -tri-acetilinosina.

Etapla 2: O^2, O^3, O^5 -tri-acetilinosina reacciona con $SOCl_2$, y se convierte en O^2, O^3, O^5 -tri-acetil-6-cloroadenosina.

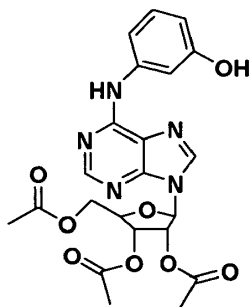
Etapla 3: Se disolvió O^2, O^3, O^5 -tri-acetil-6-cloroadenosina en un disolvente orgánico y tras la reacción con 3-aminofenol dio como producto el compuesto O^2, O^3, O^5 -tri-acetil- N^6 -(3-hidroxifenil) adenosina, después se purificó.



en la que, R es 3-hidroxifenilo

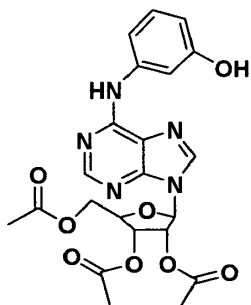
3. Un procedimiento para preparar el compuesto de la reivindicación 2, que está **caracterizado por que** el disolvente orgánico se selecciona de piridina en la etapa uno.
4. Un procedimiento para preparar el compuesto de la reivindicación 2, que está **caracterizado por que** en la etapa uno se añadió anhídrido acético a de -5 a 5 °C, después se agitó a de 20 a 30 °C.
5. Un procedimiento para preparar el compuesto de la reivindicación 2, que está **caracterizado por que** en la etapa dos la reacción se llevó a cabo en presencia de trietilamina.

6. Un procedimiento para preparar el compuesto de la reivindicación 2, que está **caracterizado por que** en la etapa tres el producto final se purifica por cromatografía, el eluyente es acetato de etilo:éter de petróleo = 2: 1.
- 5 7. Una composición farmacéutica **caracterizada por que** comprende una dosificación farmacéuticamente eficaz de O^{2'},O^{5'},O^{5'}-tri-acetil-N6-(3-hidroxifenil) adenosina representada por la siguiente fórmula general (I), y un vehículo farmacéuticamente aceptable



(I)

- 10 8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada por que** comprende otro fármaco hipolipidémico.
- 15 9. La composición farmacéutica de acuerdo con cada una de las reivindicaciones 7-8, **caracterizada por que** dicha composición farmacéutica es comprimidos, cápsulas, pastillas, inyecciones, preparaciones de liberación sostenida, liberación controlada o dirigida y varios sistemas de administración de partículas finas.
10. Uso de O^{2'},O^{3'},O^{5'}-tri-acetil-N6-(3-hidroxifenil) adenosina representada por la siguiente fórmula general (I)



(I)

20

para la preparación de fármacos para el tratamiento o la profilaxis de hiperlipidemia.