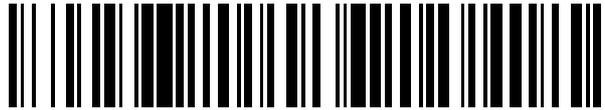


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 722**

51 Int. Cl.:

A61K 31/416 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 5/50 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2004 E 09160568 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2119441**

54 Título: **Uso de antagonistas del receptor de la angiotensina II para incrementar la sensibilidad a la insulina**

30 Prioridad:

31.07.2003 DE 10335027
06.10.2003 DE 10346260
05.12.2003 DE 10356815

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.08.2015

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH (100.0%)**
Binger Str. 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE

72 Inventor/es:

UNGER, THOMAS;
KINTSCHER, ULRICH;
SCHUPP, MICHAEL;
KAUSCHKE, STEFAN y
MARK, MICHAEL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 543 722 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

Uso de antagonistas del receptor de la angiotensina II para incrementar la sensibilidad a la insulina

La invención pertenece al sector de los antagonistas del receptor de la angiotensina II y se refiere al uso de los antagonistas del receptor de la angiotensina II irbesarteno y telmisartano para el tratamiento de personas con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 o sospecha de prediabetes, o para la prevención de la diabetes.

La diabetes mellitus de tipo 2 es la manifestación de dos fenómenos patofisiológicos, a saber, una secreción reducida de insulina de las células beta del páncreas y una resistencia a la insulina de los órganos blanco hígado, musculatura esquelética y tejido graso. Por lo general, hay un trastorno complejo de ambos componentes. La enfermedad se diagnostica como hiperglucemia en ayunas, es decir, la concentración de azúcar en sangre después de un ayuno de 10-12 horas está por encima del valor límite de 125 mg de glucosa por dl de plasma. Es posible un tratamiento dirigido de la diabetes manifiesta de tipo 2 por medio de compuestos de la clase de sustancias de las tiazolidindionas (glitazonas). Estos compuestos mejoran la utilización de la insulina circulante y conducen así a una disminución de los valores de azúcar en sangre (sensibilizadores de insulina). Al mismo tiempo, se reducen los elevados niveles de insulina por medio de mecanismos de reacoplamiento, aliviando el páncreas. Los sensibilizadores de insulina tales como troglitazona, rosiglitazona o pioglitazona, despliegan esta acción por medio de determinados receptores nucleares, denominados PPAR-gamma (*Peroxisomal Proliferator Activated Receptor*, receptor activado del proliferador de peroxisomas). Actúan como reguladores de la transcripción de una serie de genes que son importantes para el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. A través de esta función, los ligandos PPAR-gamma como las prostaglandinas o las tiazolidindionas sintéticas (glitazonas) pueden contribuir con el tratamiento de la diabetes de tipo 2. Uno de los mecanismos principales de la reducción de la glucosa por medio de ligandos PPAR-gamma es la inducción de la diferenciación de adipocitos. La diferenciación adipocítica incrementada y la remodelación del tejido graso, provocadas a través de los ligandos PPAR-gamma, llevan a un desvío o una redistribución de ácidos grasos libres de la musculatura esquelética en el tejido graso, aumentando de esta manera el metabolismo de la glucosa en los músculos.

Dado que al momento de la diagnosis, por ejemplo uno de cada dos pacientes con diabetes de tipo 2 presenta un síntoma de enfermedad cardíaca coronaria, se presumen las causas de la diabetes progresivamente en un trastorno metabólico complejo que se puede manifestar por una serie de factores de riesgo tales como tolerancia alterada a la glucosa, mayor azúcar en sangre en ayunas, resistencia a la insulina, hipertensión, dislipidemia o adiposidad. Está particularmente marcada la predominancia de una resistencia a la insulina en pacientes con hipertrigliceridemia y bajo colesterol HDL. Se habla de prediabetes de tipo 2, síndrome metabólico, síndrome X o síndrome de resistencia a la insulina. En una primera fase, una respuesta a la insulina reducida de los órganos blanco origina un aumento de la secreción de insulina del páncreas para mantener el nivel de azúcar en sangre en el intervalo normal. Después de varios años de una producción de insulina excesiva o creciente, sucede que la distribución de la insulina por las células beta del páncreas ya no puede ser aumentada. Así comienza la fase de la tolerancia alterada a la glucosa. El organismo ya no puede captar suficientemente rápido los valores pico de la glucosa. Si el azúcar en sangre en ayunas sigue siendo alto, entonces la diabetes se hace manifiesta.

El documento WO 95/06410 revela el uso de antagonistas del receptor de la angiotensina II para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo las enfermedades autoinmunes sistémicas. Como uno de varios ejemplos para las enfermedades autoinmunes sistémicas, se menciona la diabetes. A las enfermedades autoinmunes se les asigna la diabetes mellitus de tipo 1 que aparece, la mayoría de las veces, en jóvenes de menos de 30 años, y con una correspondiente disposición genética, bajo la influencia de diversos factores, se produce una insulinitis con posterior destrucción de las células B, de modo que el páncreas sólo puede producir muy poca insulina o bien no puede producirla. La diabetes mellitus de tipo 2 no es considerada una enfermedad autoinmune.

Antagonistas del receptor de angiotensina II se utilizan para el tratamiento de la hipertensión, así como de lesiones resultantes de órganos finales cardiovasculares que se asocian con la hipertensión. En la bibliografía científica se clasifican, por norma general, como metabólicamente neutros. Henriksen et al (*Hypertension* 38:884-90, 2001) informan sobre una mejora de la sensibilidad a la insulina en el modelo con animales mediante el principio activo irbesartano.

Sharma et al establecen la hipótesis, en *Hypertension* 40(5): 609-611, 2001, que un bloqueo del sistema de renina-angiotensina fomenta el reclutamiento de pre-adipocitos, con lo cual se aumentaría el número de pequeños adipocitos sensibles a insulina. La redistribución de lípidos de los músculos y otro tejido en el tejido adiposo resultaría entonces en una resistencia a la insulina mejorada.

En *American Journal of Hypertension* 14(4): 114A, 2001, Asmar et al informan que en el caso de pacientes hipertensos con diabetes del tipo 2 telmisartano disminuye la rigidez arterial.

El objetivo de la presente invención consiste en poner a disposición medicamentos que se puedan utilizar tanto para el tratamiento de una diabetes manifiesta de tipo 2, como también para el tratamiento de los primeros síntomas del trastorno metabólico complejo de la prediabetes y, con ello, para la prevención de una diabetes mellitus de tipo 2. En el marco de la presente invención, se halló ahora, sorprendentemente, que los antagonistas del receptor de angio-

tensina II irbesartano y telmisartano y sus sales, además de la conocida acción hipotensiva, pueden elevar también en un sistema celular la expresión de genes, de cuya transcripción se sabe que es regulada por el receptor PPAR-gamma. Esto abre nuevas posibilidades terapéuticas en el tratamiento y la prevención de la diabetes de tipo 2, síndrome metabólico y resistencia a la insulina. A fin de garantizar condiciones comparables, se observa y cuantifica este efecto en el marco de la presente invención con ayuda de una línea celular establemente transformada (véase el Ejemplo 2). En este caso se trata de células CHO que representan el resultado de una transformación con dos construcciones génicas. La primera de estas construcciones codifica el gen luciferasa de *Photinus pyralis* (de Wet JR, Mol Cell Biol (1987) 7:725) bajo el control de un promotor sintético con una quintuple repetición de un sitio de unión de levadura Gal4 (véase la secuencia de Genbank AF058756). La segunda construcción codifica una proteína de fusión compuesta por el dominio de unión de ligandos del factor de transcripción humano PPARgamma2 (véase la secuencia de Genbank U79012), así como el dominio de unión de ADN de levadura GAL4 (aminoácidos 1-147; Sadowski I, Nucleic Acids Res (1989) 17:7539).

La inducción de la transcripción de los genes regulados por PPARgamma es conocida por las tiazolidindionas utilizadas como antidiabéticos (por ejemplo, rosiglitazonas) y es activada por su unión al receptor PPARgamma y su activación. En el marco del sistema de ensayo aplicado aquí, esta acción puede cuantificarse como actividad de luciferasa inducida de la línea celular transformada. La misma inducción de la actividad de una luciferasa no se presenta en el caso de los antagonistas del receptor de la angiotensina II, contrariamente a lo esperado, por unión del principio activo con el receptor PPARgamma. La inducción es particularmente marcada para el principio activo telmisartano. Una unión de, p. ej., telmisartano con el receptor PPARgamma no puede ser detectada en distintos sistemas de ensayo. Por ello, se presume que el aumento de la afinidad de proteínas de cofactores por PPARgamma por telmisartano también conduce al reclutamiento de las proteínas de cofactores, cuando no existen ligandos PPARgamma sintéticos de gran afinidad. Esto produce luego una activación de la transcripción de genes mediada a través de estos cofactores que son regulados por el receptor PPARgamma. Como la inducción de estos genes es responsable de la acción antidiabética de las tiazolidindionas, se puede partir del hecho de que la inducción de estos genes por telmisartano despliega un efecto antidiabético equiparable. Así, estos principios activos son apropiados no sólo para el tratamiento de hipertensión, sino también para el tratamiento y la prevención de la diabetes mellitus de tipo 2.

El descubrimiento de esta nueva acción terapéutica de los antagonistas del receptor de angiotensina II irbesartano y telmisartano y sus sales significa que se pueden emplear para la preparación de un medicamento para el tratamiento de personas, en las que se diagnosticó diabetes mellitus de tipo 2 o se sospecha de prediabetes, o para la prevención de la diabetes. Son apropiados sobre todo para el tratamiento y la prevención de diabetes de tipo 2 y prediabetes de tipo 2. Quedan incluidos el tratamiento y la prevención del síndrome metabólico, el síndrome X o bien el síndrome de resistencia a la insulina. Cuando en el marco de esta invención se hace referencia a las personas por tratar, la presencia del tratamiento o de la prevención de la persona está en primer lugar, pero los principios activos y combinaciones de principios activos aplicados también se pueden emplear de modo correspondiente en la medicina veterinaria en mamíferos.

La diabetes mellitus de tipo 2 se manifiesta en un valor de azúcar en sangre en ayunas que supera 125 mg de glucosa por dl de plasma, y la determinación de los valores de glucosa en sangre representa un procedimiento estándar en la analítica médica de rutina. Si se realiza un ensayo de tolerancia a la glucosa, 2 horas después de la ingesta en ayunas de 75 g de glucosa el valor de azúcar en sangre de un diabético es de más de 200 mg de glucosa por dl de plasma. En un ensayo de tolerancia a la glucosa, se administran a la persona por investigar, después de un ayuno de 10-12 horas, 75 g de glucosa por vía oral y se calcula el valor de azúcar en sangre inmediatamente antes de la ingesta así como 1 o bien 2 horas después de la ingesta de glucosa. En una persona sana, el valor de azúcar en sangre antes de la ingesta oscila entre 60 y 110 mg por dl de plasma, una hora después de la ingesta, por debajo de los 200 mg por dl y después de 2 horas, por debajo de los 140 mg por dl. Si el valor al cabo de 2 horas es de 140 a 200 mg, se habla entonces de una tolerancia alterada a la glucosa.

Es un indicio particularmente contundente de la presencia de una prediabetes cuando se puede comprobar una resistencia a la insulina. Así, puede ser que una persona requiera 2 - 3 veces más cantidad de insulina para mantener la homeostasis de glucosa que otra persona, sin que esto tenga un significado patológico directo. El método más representativo para la determinación de la resistencia a la insulina es el ensayo de clamp euglicémico-hiperinsulinémico. La relación insulina a glucosa se determina en el marco de una técnica de infusión combinada de insulina-glucosa. Se habla de una resistencia a la insulina cuando la absorción de glucosa está por debajo del percentil 25 de la población investigada en segundo plano (definición de la OMS). Algo más económico que la investigación con clamp son los llamados modelos mínimos, en los que, durante un ensayo de tolerancia a la glucosa intravenoso, se miden en intervalos temporalmente establecidos las concentraciones de insulina y glucosa en la sangre, calculando a partir de ello la resistencia a la insulina. Otro método de determinación es el modelo matemático HOMA. La resistencia a la insulina se calcula a través de la glucosa en plasma en ayunas y la concentración de insulina en ayunas. En el marco de este método no es posible distinguir entre resistencia a la insulina hepática y periférica. Para una evaluación de la resistencia a la insulina en la práctica diaria, estos procedimientos son poco apropiados. En la vida diaria clínica se toman, por lo general, otros parámetros para calcular la resistencia a la insulina. Para ello, se prefieren tomar, por ejemplo, las concentraciones de los triglicéridos del paciente, ya que elevados niveles de triglicéridos se correlacionan significativamente con la presencia de una resistencia a la insulina.

En la práctica, se parte, simplificando un poco, del hecho de que las personas son resistentes a la insulina cuando

presentan por lo menos 2 de las siguientes propiedades:

- 1) sobrepeso u obesidad
- 2) hipertensión
- 3) dislipidemia (contenido alterado de la sangre en lípidos totales)
- 5 4) por lo menos un pariente de primer grado al que se hubiera diagnosticado una tolerancia a la glucosa alterada o diabetes de tipo 2.

Sobrepeso significa aquí que el índice de masa corporal (*Body Mass Index* - BMI) está comprendido entre 25 y 30 kg/m², siendo el BMI el cociente del peso corporal en kg y del cuadrado de la estatura en metros. En caso de obesidad, el BMI es mayor que 30 kg/m².

- 10 De la definición anterior de la resistencia a la insulina se ve claramente que para su tratamiento se indican y son apropiados agentes hipotensivos cuando en el paciente se comprueba, entre otros, la propiedad hipertensión.

De esta manera se puede aplicar un tratamiento de diabéticos de tipo 2 con telmisartano simultáneamente con el tratamiento o el tratamiento de soporte de una dislipidemia. Las dosis usuales de telmisartano ocasionan una significativa reducción de los valores en plasma de colesterol LDL, colesterol total y/o triglicéridos.

- 15 Dado que la resistencia a la insulina se considera un estado que ocasiona un progresivo aumento de la tensión arterial, su tratamiento con telmisartano puede considerarse una prevención de la hipertensión, pese a valores de tensión arterial normales.

- 20 Un indicio similar de la prediabetes es cuando se cumplen las condiciones para el síndrome metabólico, cuya característica principal es la resistencia a la insulina. De acuerdo con las directivas ATP IHINCEP (*Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program* (NCEP) en el *Journal of the American Medical Association* 285:2486-2497, 2001), se habla del síndrome metabólico cuando un paciente presenta por lo menos 3 de las siguientes características:

- 1) obesidad abdominal, definida como la medida del talle >40 pulgadas o 102 cm en los hombres y >35 pulgadas o 94 cm en las mujeres
- 25 2) valores de triglicéridos >150 mg/dl
- 3) valores de colesterol HDL <40 mg/dl en hombres
- 4) hipertensión >130/>85 mm Hg
- 5) azúcar en sangre en ayunas de >110 mg/dl

- 30 De esta definición del síndrome metabólico se ve claramente que, para su tratamiento, son apropiados los agentes hipotensivos cuando se detectó por ejemplo hipertensión en el paciente.

Como también el síndrome metabólico es considerado un estado que ocasiona un aumento progresivo de la tensión arterial, su tratamiento con telmisartano también puede considerarse una prevención de la hipertensión, pese a valores de tensión arterial normales.

- 35 También hay sospecha de prediabetes cuando el valor de azúcar en sangre en ayunas está por encima del valor normal máximo de 110 mg de glucosa por dl de plasma, pero no supera el valor límite relevante para la diabetes de 125 mg de glucosa por dl de plasma. Otro indicio para la prediabetes es una tolerancia alterada a la glucosa, es decir, un valor de azúcar en sangre de 140-200 mg de glucosa por dl de plasma 2 horas después de ingerir en ayunas 75 g de glucosa en el marco de una prueba de tolerancia a la glucosa.

- 40 También un valor en sangre de triglicéridos de más de 150 mg/dl permite suponer la presencia de prediabetes. Esta sospecha se refuerza con valores bajos en sangre de colesterol HDL. En las mujeres, los valores por debajo de 40 mg por dl de plasma, en los hombres, los valores por debajo de 50 mg por dl de plasma deben considerarse demasiado bajos. La determinación de triglicéridos y colesterol HDL en la sangre pertenece también a los procedimientos estándar en la analítica médica y se describe, por ejemplo, en: Thomas L (ed.): *Labor und Diagnose*, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Francfort del Meno, 2000. Hay mayor sospecha de prediabetes cuando los valores de
- 45 azúcar en sangre en ayunas superan al mismo tiempo 110 mg de glucosa por dl de plasma. Cuando los valores en sangre medidos están en el intervalo de los valores límite, se puede utilizar como ayuda adicional para la decisión la relación de la medida del contorno a la medida de las caderas. Si esta relación supera en las mujeres el valor de 0,8 o en los hombres el valor de 1, se indica un tratamiento.

- 50 Se indica en especial para el tratamiento de diabetes o prediabetes el antagonista del receptor de la angiotensina II irbesartano o telmisartano cuando también se debe tratar una hipertensión. Éste es el caso cuando la presión arterial

sistólica supera un valor de 140 mm Hg y la presión arterial diastólica supera un valor de 90 mm Hg. Si un paciente ya padece una diabetes manifiesta, en la actualidad se recomienda reducir la presión arterial sistólica a un valor inferior a 130 mm Hg y la presión arterial diastólica, a un valor inferior a 80 mm Hg. Para alcanzar estos valores se puede indicar, según el caso, la combinación del antagonista del receptor de angiotensina II con un diurético o un antagonista del calcio. El término "diurético" comprende tiazidas o análogos de tiazida, tales como hidroclorotiazidas (HCTZ), clopamidas, xipamidas o clorotalidonas, el antagonista de aldosterona tal como espironolactona o eplerenona, como también otros diuréticos que son apropiados para el tratamiento de hipertensión tales como furosemidas y piretanidas, y sus combinaciones con amiloridas y triamtereno.

La presente invención da a entender que, para personas que son tratadas por una hipertensión, siempre se indican los antagonistas del receptor de angiotensina II irbesartano y telmisartano cuando se debe prevenir el desarrollo de una diabetes o bien se debe tratar una diabetes manifiesta.

En sólo el 10 por ciento de todos los casos de hipertensión (hipertonía secundaria) se puede comprobar una causa identificable tal como, por ejemplo, una nefropatía. Por tratamiento y eliminación de la causa se puede subsanar, por lo general, la hipertonía secundaria. Sin embargo, en casi el 90 por ciento de todos los casos se trata de una hipertonía primaria, cuya causa exacta no es conocida, no siendo posible así una curación directa. Las repercusiones negativas de la hipertensión pueden reducirse por alteración de las costumbres de vida y un correcto tratamiento. La conjunción de distintos factores de riesgo o la aparición conjunta de distintos factores de riesgo parece causar la hipertensión. A menudo se observa, sobre todo, la conjunción de hipertensión con trastornos del metabolismo de las grasas y los azúcares. Estos trastornos pasan a menudo inadvertidos, pero pueden ser reconocidos por medio de valores elevados de triglicéridos en sangre y glucosa, así como reducidos valores de colesterol HDL en sangre. Se pueden reconocer adicionalmente en un estadio algo más avanzado por una obesidad de progreso lento. Estos trastornos se pueden aclarar por medio de la creciente resistencia a la insulina. Cuanto menos efectiva sea la insulina, tanto más se confunde el metabolismo de grasas y azúcares. La combinación de todos estos trastornos eleva finalmente la probabilidad de padecer de una glucemia y de fallecer prematuramente de una cardiopatía o vasculopatía.

Estimaciones parten del hecho de que aproximadamente un tercio de los adultos en las regiones de la Tierra que tienen superprovisión de alimentos está afectado por la conjunción de una hipertensión con trastornos del metabolismo de grasas y azúcares, y que esta cifra aumentará aún más. De ello resulta una necesidad de medicamentos que estén en condiciones de contribuir a ralentizar o detener el avance de los trastornos metabólicos mencionados en una fase lo más temprana posible y, al mismo tiempo, evitar las repercusiones de una hipertensión dañinas para la salud.

La presente invención revela también un medicamento que se puede usar tanto para el tratamiento de hipertonía, como también para el tratamiento de una diabetes manifiesta de tipo 2 o los primeros síntomas del trastorno metabólico complejo de la prediabetes. De esta manera, la presente invención también comprende la prevención de la diabetes en pacientes que son tratados por hipertensión. Por lo tanto, si se usa de inmediato uno de los antagonistas del receptor de angiotensina II irbesartano y telmisartano para el control de la presión arterial en caso de la presencia de uno de los síntomas mencionados de prediabetes, se puede demorar o impedir así la aparición de una diabetes manifiesta de tipo 2.

En el caso de los antagonistas del receptor de angiotensina II irbesartano y telmisartano en el marco de la presente invención se trata de compuestos para los que se puede excluir una unión con el dominio de unión de ligandos PPARgamma por test *in vitro* (véase el Ejemplo 1), mientras que activan tras añadir al medio de cultivo una línea de células reporteras PPARgamma establemente transformada, la expresión de un gen de luciferasa también establemente transfectedo (véase el Ejemplo 3).

Por lo tanto, irbesartano y telmisartano

- no muestran una unión *in vitro* con los dominios de unión de ligandos de un receptor humano PPARgamma, pero conducen a una
- inducción de una actividad de luciferasa cuando son agregados al medio de cultivo de una línea de células reporteras PPARgamma establemente transformadas que
 - a) expresa una proteína de fusión compuesta por el dominio de unión con ligandos del factor de transcripción PPARgamma humano, así como el dominio de unión de ADN de levadura GAL4, y
 - b) contiene un gel luciferasa bajo el control de un sitio de unión de levadura Gal4 repetido cinco veces.

La preparación de una línea de células reporteras PPARgamma de este tipo se describe en el Ejemplo 2.

Una unión *in vitro* con el dominio de unión con ligandos del receptor PPARgamma2 humano no existe cuando no puede ser detectada en un AlphaScreen (Ullmann EF et al, Proc Natl Acad Sci USA (1994) 91:5426-5430). En lugar de un AlphaScreen, también se puede realizar un ensayo de SPA (Mukherjee R et al., J Steroid Biochem Mol Biol (2002) 81:217-225) o un ensayo de RMN (Johnson BA et al., J Mol Biol (2000) 298:187-194). Por lo general, con

ninguno de estos procedimientos se puede detectar una unión con el receptor.

Antagonistas del receptor de angiotensina II en el marco de la presente invención son irbesartano y telmisartano. Claramente se lograron los mejores resultados con telmisartano y sus sales. Las formas de administración preparadas contienen un equivalente de 20-200 mg, con preferencia 20, 40, 80, 120, 160 ó 200 mg del ácido libre del principio activo. Si el principio activo está combinado con HCTZ o clortalidona, la forma de administración contiene 10-50 mg, con preferencia 50, 25 ó 12,5 mg del diurético.

La ventajosa acción divulgada en el marco de esta invención de los antagonistas de angiotensina II irbesartano y telmisartano es particularmente marcada para telmisartano. Si la aplicación combinada de un bloqueante del receptor de angiotensina II con uno o varios otros principios activos terapéuticos parece conveniente o necesaria, telmisartano representa un bloqueante preferido del receptor de angiotensina II, porque combina en un único principio activo una acción hipotensiva con una metabólica, por ejemplo una acción antidiabética que también contribuye en la prevención de la diabetes.

Por este motivo, combinaciones de principios activos preformuladas de telmisartano con inhibidores de HMG-CoA reductasa tales como simvastatina o atorvastatina significan un perfeccionamiento que abre nuevos horizontes en la terapia de enfermedades cardiovasculares, cardiopulmonares, pulmonares o renales, pero también el tratamiento de dislipidemia, osteoporosis o Alzheimer. Esto es también válido para combinaciones de principios activos de telmisartano con rosiglitazona o pioglitazona o repaglinida o metformina o un inhibidor de DPP4 en la terapia contra la diabetes. También en el tratamiento de la hipertensión con inhibidores del sistema renina-angiotensina (RAS) en combinación con un antagonista de calcio tal como amlodipina o nifedipina, o un antagonista de aldosterona tal como espironolactona o eplerenona, el telmisartano debe ser considerado un inhibidor preferido de RAS. La combinación con un antagonista de aldosterona tal como eplerenona representa también un importante perfeccionamiento para el tratamiento o bien la prevención de insuficiencia cardíaca o infarto de corazón.

Junto a una presión arterial elevada, también trastornos en el metabolismo de grasas (dislipidemias) y diabetes mellitus representan un riesgo incrementado de apoplejía, de modo que telmisartano, también en unión con inhibidores de la agregación de trombocitos tales como clopidogrel o dipiridamol, en todo caso adicionalmente combinados con ácido acetilsalicílico (ASA), representa un participante en la combinación preferido, ante todo para la profilaxis de la apoplejía. Para este fin, puede emplearse dipiridamol en una dosis de 50 a 750 mg, preferiblemente de 100 a 500 mg y en particular de 200 a 450 mg. ASA puede emplearse en una dosis de 10 a 200 mg, preferiblemente de 25 a 100 mg y en particular de 30 a 75 mg.

Correspondientes composiciones farmacéuticas comprenden telmisartano o una de sus sales en combinación con

- amlodipina o nifedipina
- eplerenona o espironolactona,
- simvastatina o atorvastatina,
- rosiglitazona o pioglitazona o repaglinida o metformina,
- dipiridamol o clopidogrel, en todo caso en combinación con ácido acetilsalicílico
- una sulfonilurea,
- un antagonista de aldosterona,
- un inhibidor de la HMG-Co A reductasa,
- un inhibidor de DPP4 o
- un inhibidor de la agregación de trombocitos.

Estas combinaciones preformuladas de principios activos se elaboran, por lo general, con uno o varios excipientes de formulación tales como manitol, sorbitol, xilita, sacarosa, carbonato de calcio, fosfato de calcio, lactosa, sal sódica de croscarmelosa (sal sódica de carboximetiléter de celulosa, reticulada), crospovidona, glicolato de almidón sódico, hidroxipropilcelulosa (de baja sustitución), almidón de maíz, polivinilpirrolidona, copolimerizados de vinilpirrolidona con otros derivados de vinilo (copovidona), hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina o almidón, estearato de magnesio, estearilfumarato de sodio, talco, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, acetato-ftalato de celulosa, poli(acetato de vinilo), agua, agua/etanol, agua/glicerol, agua/sorbita, agua/polietilenglicol, propilenglicol, alcohol cetilestearílico, carboximetilcelulosa o sustancias con contenido en grasa tal como grasa dura o sus mezclas adecuadas, en preparaciones galénicas usuales tales como comprimidos, grageas, cápsulas, polvos, suspensiones o supositorios.

Se obtienen comprimidos, por ejemplo, por mezcladura del o de los principios activos con uno o varios excipientes y

posterior compresión. Los comprimidos pueden consistir también en varias capas. Ejemplos de excipientes son

- diluyentes inertes tales como manitol, sorbitol, xilita, sacarosa, carbonato de calcio, fosfato de calcio y lactosa;
- desintegrantes tales como sal sódica de croscarmelosa (sal sódica de carboximetiléter de celulosa, reticulada), crospovidona, glicolato de almidón sódico, hidroxipropilcelulosa (de baja sustitución) y almidón de maíz;
- 5 • aglutinantes tales como polivinilpirrolidona, copolimerizados de vinilpirrolidona con otros derivados de vinilo (copovidona), hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina o almidón;
- lubricantes tales como estearato de magnesio, estearilfumarato de sodio y talco;
- agentes para lograr el efecto de depósito tales como hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, acetato-ftalato de celulosa y poli(acetato de vinilo); y
- 10 • colorantes farmacéuticamente aceptables tales como óxidos de hierro coloreados.

El bloqueo de la aldosterona reduce la mortalidad y la morbilidad en pacientes con una marcada debilidad cardíaca. Si los pacientes, tratados por debilidad cardíaca sintomática e insuficiencia cardíaca izquierda con inhibidores de ACE, antagonistas del receptor de angiotensina, diurético o beta-bloqueantes, padecen un infarto de miocardio, se pudo demostrar que el tratamiento adicional con el bloqueante selectivo de aldosterona eplerenona mejora sus oportunidades de supervivencia y conduce a una reducción de posteriores ingresos en el hospital (NEJM 348:1309-1321, 2003). En el grupo de pacientes investigados también se contemplaron los pacientes con diabetes, en los que había una insuficiencia cardíaca izquierda, pero no una debilidad cardíaca sintomática, ya que para este grupo de pacientes el riesgo de un evento cardiovascular es comparativamente igual que en pacientes con insuficiencia cardíaca izquierda y debilidad cardíaca sintomática. Si se tiene en cuenta esto, el descubrimiento aquí divulgado del efecto antidiabético del bloqueante del receptor de la angiotensina II telmisartano significa que está indicada su combinación con eplerenona en el tratamiento posterior de un infarto de miocardio sobre todo en aquellos pacientes que ya padecen de diabetes y en todo caso de proteinuria diabética, o en los que existe una sospecha de prediabetes. Formas de administración farmacéuticas, en las que los dos principios activos telmisartano y eplerenona se presentan combinados, pueden contener, por ejemplo, un equivalente de 40-320 mg, con preferencia 80 ó 160 mg de telmisartano y un equivalente de 20-200 mg, con preferencia 25 ó 50 mg de eplerenona. Para el tratamiento de estos pacientes con síntomas simultáneos de una dislipidemia (p. ej., hipertrigliceridemia o hipercolesterolemia) es útil a menudo la combinación adicional con un reductor de lípidos tal como simvastatina o atorvastatina en la dosificación habitual de 2,5-40 mg, preferiblemente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ó 40 mg. Una correspondiente forma de administración de telmisartano, eplerenona y atorvastatina o simvastatina puede prepararse, p. ej., como comprimido de tres capas. El principio activo eplerenona se utiliza sobre todo en forma micronizada con un tamaño de partícula D_{90} de 25-400 micras (véase el documento WO 00/33847).

La metformina es un antidiabético acreditado que logra su efecto principal reduciendo la hiperproducción de glucosa en el hígado de un diabético. En el control terapéutico de la diabetes mellitus, el valor HbA1c, el producto de una glicación no enzimática de la cadena B de hemoglobina, tiene un significado sobresaliente. Dado que su formación depende esencialmente del nivel de azúcar en sangre y del tiempo de vida de los eritrocitos, el HbA1c refleja, en el sentido de una "memoria de azúcar en sangre" el nivel medio de azúcar en sangre de las últimas 4-6 semanas. Pacientes diabéticos, cuyo valor HbA1c está bien regulado a largo plazo por una terapia intensiva antidiabética (es decir, < 6,5% de toda la hemoglobina de la muestra), están claramente mejor protegidos frente a una microangiopatía diabética. La metformina sola logra en el diabético una mejora media del valor HbA1c en el orden de magnitud de 1,0 – 1,5%. Esta reducción del valor HbA1c no es suficiente en todos los diabéticos para llegar al intervalo objetivo deseado de < 6,5% y preferiblemente < 6% de HbA1c. Por ello, se requieren medidas terapéuticas adicionales para incrementar la acción de la metformina.

En el marco de la presente invención se halló, sorprendentemente, que el telmisartano actúa como activador de PPAR-gamma. De esta manera, el telmisartano posee el potencial de elevar la sensibilidad de la insulina del tejido graso, muscular y hepático para lograr, de esta manera, una reducción del azúcar en sangre. Esto hace al telmisartano un participante en la combinación particularmente apropiado para agentes antidiabéticos tales como metformina o repaglinida (fomenta la liberación de insulina de las células B del páncreas), dado que su efecto se basa en otro principio activo y, por consiguiente, refuerza favorablemente el modo de acción de estos principios activos. Formas de administración de una combinación de repaglinida y telmisartano contienen, por ejemplo, un equivalente de 0,25 a 5 mg, preferiblemente 0,25 a 2 mg, y de manera particularmente preferida 0,5 ó 1 ó 2 mg de repaglinida y un equivalente de 40-320 mg, preferiblemente 80 ó 160 mg de telmisartano.

Una combinación de telmisartano y metformina es particularmente apropiada en diabéticos adiposos de tipo 2, ya que, por una parte, la metformina, a diferencia de otros antidiabéticos orales, no conduce a un aumento del peso corporal y, por otra parte, telmisartano reduce la resistencia a insulina como característica importante y causa del nivel elevado de azúcar en sangre en estos diabéticos de tipo 2. En la mayoría de los diabéticos adiposos de tipo 2, como también en los prediabéticos, se comprueba un aumento de la presión arterial que pertenece también a los criterios del síndrome metabólico. Para este grupo de pacientes, el telmisartano significa un antihipertensivo preferi-

do, cuyas propiedades adicionales actúan favorablemente como sensibilizante de la insulina con un antidiabético acreditado, a fin de tratar al mismo tiempo y de la misma manera distintos aspectos de las enfermedades diabetes de tipo 2, prediabetes de tipo 2 o síndrome metabólico o resistencia a la insulina. Con la administración complementaria de telmisartano, se puede lograr una mejora adicional del valor HbA1c en el orden de magnitud 0,25 - 2%, con preferencia 0,25 - 1% y con preferencia especial 0,25 - 0,5%. También una mejora del valor HbA1c inferior a 0,25% de la hemoglobina total significa un aporte conveniente al tratamiento de un diabético de tipo 2, pero actualmente no es mensurable de modo confiable. Tal como demostró el estudio UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*), una reducción de la hipertensión también es activa como una terapia para reducir el azúcar en sangre, a fin de reducir en los diabéticos de tipo 2 complicaciones tardías tales como nefropatía, neuropatía, retinopatía al igual que también todas las complicaciones macrovasculares. Con ello, la combinación propuesta de telmisartano y metformina significa una aportación esencial para la reducción o incluso el impedimento de las secuelas graves de la diabetes.

Formas de administración de una combinación de metformina y telmisartano contienen, por ejemplo, un equivalente de 450-900 mg, preferiblemente 500 u 850 mg de metformina y un equivalente de 40-320 mg, preferiblemente 80 ó 160 mg de telmisartano. Hidrocloruro de metformina es bien soluble y se puede formular sin problemas con coadyuvantes y agentes lubricantes. Una forma de administración preferida son comprimidos bicapa. La combinación de las cantidades preferidas de principios activos y coadyuvantes resulta en las siguientes masas:

Tabla 1: Comprimidos con 80 mg de telmisartano

	Telmisartano/Metformina	
	80/500 mg	80/850 mg
Hidrocloruro de metformina (correspondiente a 500 mg o bien 850 mg de metformina)	643 mg	1094 mg
Coadyuvantes (aglutinantes y lubricantes) al menos	27 mg	46 mg
Telmisartano granulado SD (correspondiente a 80 mg de telmisartano)	135 mg	135 mg
Coadyuvantes a base de la matriz del comprimido de telmisartano (sorbitol y lubricantes)	345 mg	345 mg
Suma del comprimido (al menos)	1150 mg	1620 mg

Tabla 2: Comprimidos con 160 mg de telmisartano

	Telmisartano/Metformina	
	160/500 mg	160/850 mg
Hidrocloruro de metformina (correspondiente a 500 mg o bien 850 mg de metformina)	643 mg	1094 mg
Coadyuvantes (aglutinantes y lubricantes) al menos	27 mg	46 mg
Telmisartano granulado SD (correspondiente a 160 mg de telmisartano)	270 mg	270 mg
Coadyuvantes a base de la matriz del comprimido de telmisartano (sorbitol y lubricantes)	690 mg	690 mg
Suma del comprimido (al menos)	1630 mg	2100 mg

Formas de administración de una combinación de repaglinida y telmisartano contienen, por ejemplo, un equivalente de 0,25 mg a 5 mg, preferiblemente 0,25 mg a 2 mg, y de manera particularmente preferida 0,5 ó 1 ó 2 mg de repaglinida y un equivalente de 40-320 mg, preferiblemente 80 ó 160 mg de telmisartano.

Ejemplos:

Ejemplo 1 Telmisartano, losartano* e irbesartano no se unen *in vitro* con el dominio de unión de ligandos PPARgamma (* Ejemplo de Referencia)

5 La proteína que contiene los dominios de unión de ligandos PPARgamma humanos (LBD) se produce como proteína de fusión de GST en E.coli y se purifica por cromatografía por afinidad.

10 Para ello se subclona un segmento de ADN que codifica los aminoácidos 205-505 del factor de transcripción PPAR-gamma2 humano (véase el Acceso en Genbank [U79012](#)) a través de los sitios de restricción insertados adicionalmente BamH I y Xho I en el vector de expresión pGEX-4T-1 (Amersham) y se controla la secuencia del segmento. La expresión de la proteína de fusión se realiza en la cepa de E. coli BL21 (DE3) recomendada para vectores pGEX después de la inducción con IPTG 0,2 mM durante 4 horas a 25°C. Las bacterias se nodulan después de la inducción y se congelan en porciones en PBS, pH 7,4. Después de la desintegración en una prensa de French, se purificó la proteína de fusión GST-PPARgamma-LBD disuelta con ayuda de una columna GSTrap (Pharmacia). La elución se produjo por adición de glutatión reducido 20 mM.

15 Las fracciones de proteína GST-PPARgamma-LBD se desalinizan con ayuda de una columna de desalinización HiTrap (Pharmacia) y se determina la concentración de proteínas con un ensayo estándar.

20 La proteína que contiene el dominio de unión de ligandos RXRalpha humanos (LBD) se produce como proteína de fusión His tag en E. coli y se purifica por cromatografía por afinidad. Para ello se subclona un segmento de ADN que codifica los aminoácidos 220-461 del factor de transcripción RXRalfa humano (véase el Acceso en Genbank [NM_002957](#), nt 729-1457) a través de los sitios de restricción insertados adicionalmente BamH I y Not I en el vector de expresión pET28c (Novagen) y se controla la secuencia del segmento. La expresión de la proteína de fusión se realiza en la cepa de E. coli BL21 (DE3) recomendada para vectores pET después de la inducción con IPTG 0,2 mM durante 4 horas a 25°C. Las bacterias se nodulan después de la inducción y se congelan en porciones en PBS, pH 7,4. Después de desintegrar en una prensa de French, se purifica la proteína de fusión His-RXRalfa-LBD disuelta con ayuda de una columna quelante HiTrap (Pharmacia). La elución se realizó a través de una etapa de 500 mM de imidazol. Las fracciones de proteína His-RXRalfa-LBD se desalinizan con ayuda de una columna de desalinización HiTrap (Pharmacia) y se determina la concentración de las proteínas con un ensayo estándar.

a) AlphaScreen

30 Los ensayos Alpha Screen se describieron por primera vez en Ullmann EF et al, Proc Natl Acad Sci USA (1994) 91:5426-5430. Las mediciones realizadas en el marco de este ejemplo se llevaron a cabo tal como se describe en [Glickman JF et al.](#), J Biomol Screen (2002) 7:3-10. El tampón de ensayo está compuesto de Hepes 25 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, Tween-20 al 0,1%, BSA al 0,1%. Se incuban proteína de fusión GST-PPARgamma-LBD 3 nM, péptido LXXLL biotinilado 15 nM del cofactor CBP (equivalente al péptido divulgado en la página 218 de Mukherjee R et al., J Steroid Biochem Mol Biol (2002) 81:217-225 con una cisteína N-terminal adicional) y en cada caso 10 µg/ml de perlasceptoras anti-GST o bien perlas donantes de estreptavidina (Applied Biosystems) en un volumen total de 12,5 µl en presencia de distintas concentraciones de una sustancia de ensayo (en DMSO) durante 4 horas a temperatura ambiente. La concentración final de DMSO en el ensayo es del 1% (v/v). Como control de fondo (NSB) sirve una disolución de DMSO al 1%. La medición se realiza en el medidor de fusión Packard.

Conc. / M	Telmisartano		Rosiglitazona	
	PM	SD	PM	SD
NSB	619	21	573	17
1,00E-08			820	18
3,00E-08	642	41	1720	48
1,00E-07	606	10	8704	59
3,00E-07	644	56	27176	1232
1,00E-06	677	14	43233	1083
3,00E-06	720	35	52691	3771
1,00E-05	847	82	56366	4303
5,00E-05	1111	135		

Contrariamente a rosiglitazona, un agonista PPARgamma conocido en la bibliografía con unión en LBD, no tiene lugar una activación directa de PPARgamma-LBD por mayores concentraciones de telmisartano, losartano e irbesartano (concentraciones de hasta 50 µM) y, ligado a ello, un reclutamiento significativo del péptido LXXLL.

b) Ensayo de SPA

- 5 Se halla una descripción del formato de ensayo de SPA en Mukherjee R et al., J Steroid Biochem Mol Biol (2002) 81:217-225. El tampón de ensayo está compuesto de Tris 20 mM pH 7,5, KCl 25 mM, DTT 10 mM y Triton X-100 al 0,2%. Se incuban proteína de fusión GST-PPARgamma-LBD 30 nM, His-RXRalfa-LBD 30 nM y anticuerpos anti-GST (1:600, Amersham Pharmacia), 0,25 mg de perlas de unión con anticuerpos de proteína A SPA PVT (Amersham Pharmacia), rosiglitazona 30 nM marcada con ³H en un volumen total de 100 µl con diluciones de sustancia de ensayo durante 5 horas a temperatura ambiente.

10 Como control de fondo (NSB) se añaden 10 µM de rosiglitazona sin marcar en lugar de la rosiglitazona radiactiva, como valor máximo (Bmáx) se añade en lugar de una sustancia de ensayo el disolvente utilizado, por ejemplo DMSO.

- 15 A continuación de la incubación, se centrifugan las tandas de ensayo durante 5 minutos a 2000 rpm en una centrífuga Hettich Universal 30Rf y se miden en el contador Packard TopCount NXT.

Conc / M	Telmisartano		Irbesartano		Losartano	
	PM	SD	PM	SD	PM	SD
NSB	217	9	217	9	217	9
Bmáx	911	15	911	15	911	15
1,00E-07	837	49	913	54	915	43
3,00E-07	802	28	810	49	835	11
1,00E-06	818	27	815	51	901	10
3,00E-06	818	20	779	26	814	53
1,00E-05	703	30	723	37	787	46
3,00E-05	691	222	648	40	784	96
1,00E-04	545	18	510	81	611	17

Contrariamente a los agonistas PPARgamma directos que se unen con PPARgamma-LBD, tampoco tiene lugar con muy grandes excesos de telmisartano, losartano o irbesartano un desplazamiento de la rosiglitazona radiactiva dependiente de la concentración del saco de unión.

20 c) Ensayos por RMN

Contrariamente a un ligando PPARgamma directo, por ejemplo rosiglitazona, no tiene lugar en la medición del espectro ¹⁵N TROSY de PPARgamma-LBD en presencia de las sustancias de ensayo telmisartano una interacción de la sustancia de ensayo con aminoácidos del saco de unión. Los aminoácidos del saco de unión presentan en presencia de las sustancias de ensayo el mismo posicionamiento que en ausencia de un ligando.

25 Ejemplo 2: **Producción de una línea de células reporteras PPARgamma establemente transformadas**

- 30 Un segmento de ADN que codifica los aminoácidos 205-505 del factor de transcripción PPARgamma2 humano (equivalente a los nucleótidos 703-1605 de la secuencia de Genbank U79012) se incorpora a través de sitios de restricción BamH I e Hind III insertos adicionalmente en el sitio de clonación múltiple del vector pFA-CMV (Stratagene) y se verifica la secuencia. El plásmido resultante pFA-CMV/hPPARgamma2-LBD codifica de modo N-terminal del PPARgamma-LBD en el mismo marco de lectura un dominio de unión de ADN Gal4. Adicionalmente, el plásmido codifica una resistencia a neomicina.

La línea celular CHO-K1 (ATCC CCL-61) se cotransfecta con los plásmidos pFA-CMV/hPPARgamma2-LBD y pFR-Luc (Stratagene). pFR-Luc codifica el gen de luciferasa bajo el control de un sitio de unión de levadura Gal4 repetido cinco veces. La transfección se realiza con Lipofectamin2000 de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

- 35 Después de la transfección, las células se cultivan en medio (Ham's F12 con suero fetal de ternero al 10%) en presencia de 0,5 mg/ml de G-418. Después de un cultivo de seis días, se pasan las células y se mantienen en cultivo

durante otros 10 días. Las colonias resultantes, resistentes a la neomicina, se separan en el microscopio, se colocan en placas de 96 pocillos y se cultivan. Se obtienen distintas líneas celulares transformadas con los plásmidos contenidos (por ejemplo, clones N^os. 10, 11, 13 etc.), que se siguen conservando en medio de cultivo.

5 Las líneas celulares se investigan en cuanto a la inducibilidad del gen de luciferasa por un agonista PPARgamma, por ejemplo rosiglitazona, y se hacen reaccionar con una señal aumentada de luciferasa a la estimulación con un agonista PPARgamma.

Ejemplo 3: **Telmisartano, losartano* e irbesartano activan PPARgamma de modo celular (*Ejemplo de Referencia)**

10 La línea celular CHO-K1 derivada del clon transformado 11 del Ejemplo 2 se siembra en placas de fondo plano de 96 pocillos con una densidad de 3×10^4 células/200 µl/pocillo y se cultiva durante la noche en medio Ham's F-12 con suero fetal de ternero al 10% y 0,5 mg/ml de G-418. Al cabo de 24 horas, se cambia a un medio sin adición de G-418.

15 Las sustancias de ensayo se llevan con un disolvente apropiado, por ejemplo DMSO, a 100 veces la concentración deseada y se diluyen con el medio colocado de la placa de cultivo celular 1:100. Como control de fondo sirve el disolvente utilizado, por ejemplo DMSO, en igual concentración. 24 horas después de incorporar la sustancia, se descartan los sobrenadantes y se lavan las células dos veces con 150 µl de tampón de lavado por vez (tricina 25 mM, MgSO₄ 16,3 mM, pH 7,8). Después de los pasos de lavado, se añaden por tanda de ensayo 50 µl de tampón de lavado con 150 µl de tampón de ensayo de luciferasa (tricina 25 mM, EDTA 0,5 mM, NaTPP 0,54 mM, MgSO₄ 16,3 mM ATP 1,2 mM, luciferina 0,05 mM, 2-mercaptoetanol 56,8 mM, Triton X-100 al 0,1%, pH 7,8). La medición de la luminiscencia se realiza después de un tiempo de espera de cinco minutos en el contador Packard TopCount NXT. La actividad de la luciferasa se obtiene por la integración de las unidades relativas de luciferasa (RLU) de los primeros diez segundos de empezada la medición.

Conc / M	Telmisartano		Irbesartano		Losartano		Rosiglitazona	
	PM	SD	PM	SD	PM	SD	PM	SD
NSB	466	188	466	188	466	188	741	141
1,00E-08							2761	178
3,00E-08							8256	708
1,00E-07							35265	2947
3,00E-07	760	255	491	70	874	475	86859	6139
1,00E-06	2859	455	657	65	589	70	106252	30018
3,00E-06	24498	2290	1028	342	672	88	143232	14064
1,00E-05	61397	7853	3292	556	709	163	150989	24245
3,00E-05	58790	2055	22133	4202	3271	585		
1,00E-04			29600	6936	11322	1668		

25 Por medio del antagonista del receptor de angiotensina II telmisartano se produce una activación particularmente potente de la vía de PPARgamma en la línea de células reporteras PPARgamma. Una activación a través de otros antagonistas del receptor de angiotensina II como losartano e irbesartano sólo tiene lugar con mayores concentraciones de ensayo y en pequeña escala.

Ejemplo 4 **Experimentos con adipocitos 3T3-L1 y células PC12W**

30 Se cultivan preadipocitos de ratón 3T3-L1 en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) con suero fetal de ternero (FBS) al 10%. Se cultivan células PC12W en DMEM con FBS al 5% y suero de caballo al 10%. En ambos casos, los medios contienen 1% de penicilina / estreptomina.

La diferenciación de adipocitos se induce durante 2-3 días después de la confluencia celular con la adición de una disolución de diferenciación. Ésta contiene

- 1 $\mu\text{mol/L}$ de dexametasona,
- 0,5 mmol/L de 3-isobutil-1-metilxantina,
- 5 1,67 $\mu\text{mol/L}$ de insulina y
- FBS al 10%.

Para la comparación, se induce la diferenciación también con una disolución de diferenciación que contiene adicionalmente telmisartano. Al cabo de 48 horas (día 2), se reemplaza el medio por DMEM que contiene FBS al 10% y 1,67 $\mu\text{mol/L}$ de insulina o bien FBS al 10% y 1,67 $\mu\text{mol/L}$ de insulina y telmisartano. Luego se estimulan las células durante otras 48 horas y antes de ser finalmente analizadas (día 4).

Acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1

Se lavan células con PBS y se fijan con una disolución al 3,7% de formaldehído durante 2 minutos. Después de la fijación, las células se colorean durante 1 hora a temperatura ambiente con una disolución de depósito al 0,5% diluida con agua 3:2 de Oil Red-O en isopropanol. Después de lavar, las células se investigan en el microscopio óptico.

15 10 $\mu\text{mol/L}$ de telmisartano producen una mayor acumulación de lípidos que se hace visible por medio de una coloración incrementada de Oil Red-O. La diferenciación de adipocitos 3T3-L1 también es favorecida por el telmisartano.

Estimulación de la expresión de aP2 en células 3T3-L1

El aislamiento de ARN, la transcripción inversa y la cuantificación de la expresión génica se producen con un sistema de detección de secuencias ABI 7000 para la PCR en tiempo real (descrito en Janke et al, Diabetes 51:1699-707, 2002). Como control endógeno para la PCR en tiempo real sirven los genes domésticos 18S rRNA e hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (hprt).

La inducción observada depende de la concentración aplicada de telmisartano. 10 $\mu\text{mol/L}$ de telmisartano estimulan la expresión de la proteína 2 adiposa del gen marcador adipogénico (aP2) en células 3T3-L1 $3,1 \pm 0,3$ veces ($p < 0,01$). En comparación, una concentración de 10 $\mu\text{mol/L}$ del ligando PPARgamma pioglitazona estimula la expresión de aP2 $4,5 \pm 1$ veces ($p < 0,01$).

Ensayo de reporteros de transcripción

Para investigar si la inducción de la adipogénesis por medio de telmisartano es el resultado de una estimulación de la actividad PPARgamma, se realizan experimentos de transfección con construcciones reporteras de PPRE (elemento de respuesta PPAR). La transfección transitoria y los ensayos de luciferasa empleados se describen en Kintcher et al, Circ Res. 91:e35-44, 2002. Se transfectan adipocitos 3T3-L1 (día 4) o bien células PC12W con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en presencia de 1 μg (para células 3T3-L1) o bien 50 ng (para células PC12W) de una construcción reportera, vectores de expresión de PPARgamma2 y RXRalfa, así como 10 ng de un vector de control reportero de renilla luciferasa. En el caso de la construcción reportera se trata de una fusión del elemento de respuesta PPAR de 3xácil-CoA oxidasa (PPRE) con Tk-luciferasa. Los vectores de expresión PPARgamma2 y RXRalfa utilizados se corresponden con los vectores descritos por Elbrecht et al, Biochem Biophys Res Com 224: 431-437, 1996 y Joseph et al, J Biol Chem 277(13): 11019-11025, 2002. En el caso del vector de control reportero de luciferasa se trata del plásmido pRL-CMV (Promega). Después de 4 horas, se reemplaza el medio de transfección por DMEM con FBS al 10%, que adicionalmente contiene telmisartano, pioglitazona o el portador DMSO. Se mide la actividad de la luciferasa al cabo de 24 horas.

40 El tratamiento con adipocitos 3T3-L1 con 10 $\mu\text{mol/L}$ de telmisartano conduce a una inducción de la actividad de transcripción de PPARgamma $3,4 \pm 0,9$ veces ($p < 0,05$) en comparación con una inducción de $5,2 \pm 1,1$ veces por 10 $\mu\text{mol/L}$ de pioglitazona.

Las células PC12W tienen déficit de receptores AT₁. PPARgamma 2 y su compañero heterodímero RXRalfa se sobre-expresan en células PC12W y se mide la transcripción dependiente de PPARgamma en presencia o ausencia de 10 $\mu\text{mol/L}$ de telmisartano o pioglitazona. Como las células PC12W no expresan PPARgamma, no se mide en ausencia de PPARgamma2 / RXRalfa exógeno una regulación de la actividad de PPARgamma. Después de la sobre-expresión del heterodímero PPARgamma 2 / RXRalfa, el telmisartano induce también en las células PC12W deficientes en receptores AT₁ la actividad de PPARgamma $1,9 \pm 0,4$ veces ($p < 0,05$). En comparación, la pioglitazona induce la actividad de PPARgamma $4,2 \pm 1,4$ veces ($p < 0,01$). Esto demuestra que la activación de la actividad de PPARgamma por medio de telmisartano se realiza de modo independiente el bloqueo del receptor AT₁.

Los datos significan también que las concentraciones de telmisartano, necesarias para la estimulación de la actividad de PPARgamma, se pueden lograr en el plasma sanguíneo de pacientes que se tratan contra hipertensión con telmisartano. Esto significa que un tratamiento contra hipertensión con telmisartano puede mejorar adicionalmente la

sensibilidad a la insulina, lo cual repercute positivamente sobre el nivel de azúcar en sangre.

Ejemplo 5: **Ejemplos de formulación**

Comprimido 1

5 Mediante compresión directa de la sal sódica de telmisartano con excipientes y estearato de magnesio, se obtienen comprimidos de la siguiente composición:

Componentes:	mg
Sal sódica de telmisartano	41,708
Manitol	149,542
Celulosa microcristalina	50,000
10 Sal sódica de croscarmelosa	5,000
Estearato de magnesio	3,750
Total	250,000

Comprimido 2

15 Mediante compresión directa de la sal sódica de telmisartano con excipientes y estearato de magnesio, se obtienen comprimidos de la siguiente composición:

Componentes:	mg
Sal sódica de telmisartano	83,417
Sorbitol	384,083
Polividona K25	25,000
20 Estearato de magnesio	7,500
Total	500,000

Comprimido 3

25 Se mezclan hidroclorotiazida, sal sódica de telmisartano, sorbitol y óxido de hierro rojo en un mezclador de caída libre ("Free Fall Blender"), se pasan por un tamiz de 0,8 mm y, tras añadir estearato de magnesio, se elabora en un mezclador de caída libre hasta formar una mezcla pulverulenta.

Esta composición de principios activos y coadyuvantes se prensa en comprimidos con una prensa para comprimidos apropiada (por ejemplo, Korsch EK0 o Fette P1200). Se preparan comprimidos con la siguiente composición, en donde la cantidad de sal sódica de telmisartano contenida por comprimido equivale a una cantidad de 80 mg del ácido libre del telmisartano.

Ingrediente	mg/comprimido	%
Sal sódica de telmisartano	83,417	13,903
Hidroclorotiazida	12,500	2,083
Sorbitol	494,483	82,414
Óxido de hierro rojo	0,600	0,100
Estearato de magnesio	9,000	1,500
Total	600,000	100,000

30 Las sales sódicas de telmisartano de los comprimidos de los tres lotes se disuelven tras agitar durante 30 minutos (75 rpm) en 900 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,5 a $92 \pm 1,5$ %, $96 \pm 1,8$ % o $100 \pm 1,0$ %. La hidroclorotiazida se disolvió después de 30 minutos en 900 ml de HCl 0,1 M (100 rpm) a $69 \pm 6,3$ %, $72 \pm 2,1$ % o $78 \pm 1,8$ %.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende un antagonista del receptor de angiotensina II elegido de irbesartano y telmisartano o una de sus sales, para uso en un procedimiento para el tratamiento de personas a las que se diagnosticó diabetes mellitus de tipo 2 o existe sospecha de una prediabetes, o para la prevención de diabetes
- 5 2. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, caracterizada porque en las personas por tratar el valor de azúcar en sangre en ayunas supera 125 mg de glucosa por dl de plasma.
3. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, caracterizada porque en las personas por tratar el valor de azúcar en sangre en ayunas es de 110-125 mg de glucosa por dl de plasma.
- 10 4. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, caracterizada porque en las personas por tratar se mide 2 horas después de la ingesta en ayunas de 75 g de glucosa un valor de azúcar en sangre superior a 200 mg de glucosa por dl de plasma.
5. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, caracterizada porque en las personas por tratar se mide 2 horas después de la ingesta en ayunas de 75 g de glucosa un valor de azúcar en sangre de 140-200 mg de glucosa por dl de plasma.
- 15 6. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, caracterizada porque en las personas por tratar el valor de triglicéridos en sangre supera 150 mg/dl.
7. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, caracterizada porque en las personas por tratar el valor de HDL en sangre en mujeres es inferior a 40 mg por dl de plasma, en los hombres, inferior a 50 mg por dl de plasma.
- 20 8. Composición farmacéutica para uso según las reivindicaciones 6 y 7, caracterizada porque en las personas por tratar el valor de azúcar en sangre en ayunas supera 110 mg de glucosa por dl de plasma.
9. Composición farmacéutica para uso según las reivindicaciones 1, 2 y 4, caracterizada porque en las personas por tratar la presión arterial sistólica supera un valor de 130 mm Hg y la presión arterial diastólica supera un valor de 80 mm Hg.
- 25 10. Composición farmacéutica para uso según las reivindicaciones 1-9, caracterizada porque en las personas por tratar la relación de medida de cintura a medida de cadera en las mujeres supera el valor 0,8 y en los hombres supera el valor 1.