



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 567**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02733330 .1**
96 Fecha de presentación : **05.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1393739**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2004**

54 Título: **Adiponectina para la regeneración hepática.**

30 Prioridad: **07.06.2001 JP 2001-172882**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **Daiichi Sankyo Company, Limited**
3-5-1, Nihonbashi Honcho
Chuo-ku, Tokyo, JP

72 Inventor/es: **Matsuzawa, Yuji;**
Funahashi, Tohru y
Tamura, Shinji

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 316 567 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

Adiponectina para la regeneración hepática.

5 **Campo técnico**

La presente invención se relaciona con adiponectina para prevenir y tratar cirrosis hepática y hepatitis crónica.

Estado de la técnica

10 Es bien conocido que el hígado es un órgano con una capacidad extremadamente alta de autoregenerarse. Sin embargo, en un caso de enfermedad hepática crónica, el hígado sufre fibrosis durante el proceso de regeneración hepática tras la necrosis continua de los hepatocitos, dando como resultado la supresión de la regeneración normal de los hepatocitos. Esto se supone que puede ser debido a un flujo sanguíneo sinusoidal reducido, resultante de un
15 aumento en una matriz extracelular implicada en fibrosis la hepática, y también debido a pérdida de espacio para la regeneración hepática resultante de la ocupación por las fibras producidas.

La producción de una matriz extracelular implicada en fibrosis hepática tiene lugar, mayormente, en una HSC activada (célula hepática estrellada). Cuando la HSC es activada por citoquinas como TGF (factor de crecimiento transformante)- β o PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) producido por células plaquetarias de Kupffer y similares, o activada por estrés oxidativo, expresa α -actina de músculo liso (α SMA) y adquiere propiedad de célula de músculo liso, a través de la cual se transforma en una célula de tipo miofibroblasto. Además, HSC activada exhibe una expresión excesiva de receptor TGF β y se promueve, por un mecanismo autocrino, la producción de proteína de matriz extracelular. El TGF β también tiene un efecto inhibitor de la proliferación de hepatocitos.

25 Por consiguiente, consideramos que si la acción del TGF β y del PDGF sobre HCS puede ser suprimida por cualquier método, podría llevar a la supresión de la fibrosis hepática y serviría para normalizar la regeneración del hígado tras una enfermedad hepática.

30 Un objetivo de la invención es proporcionar un medicamento para el tratamiento y prevención de cirrosis hepática y hepatitis crónica.

La adiponectina es una proteína específica del tejido adiposo de animales, recientemente separada a partir de tejido adiposo humano por Maeda y cols. en 1996, y también se conoce su secuencia aminoacídica (Maeda K, y cols., Biochem. Biophys. Res. Común. 221:286 (1996)).

35 Casi al mismo tiempo, otros investigadores identificaron una sustancia llamada ACRP30 clonada a partir de células 3T3-F 442A de ratón (Scherer PE y cols., J. Biol. Chem. 270:26746-26749 (1995)), el cual se cree que es idéntico a la adiponectina.

40 Esta adiponectina se presenta abundantemente no sólo en un tejido adiposo, sino también en sangre. En sangre normal humana, está presente a un nivel tan alto como de 5 a 10 μ g/ml (Arita Y y cols., Biochem. Biophys. Res. Común. 257:79-83 (1999)).

45 Paradójicamente, el nivel sanguíneo de esta adiponectina disminuye al avanzar la obesidad.

El efecto de la adiponectina no se aclaró por completo, aunque algunos investigadores describieron que tenía un efecto supresor sobre la proliferación de músculo liso vascular, un efecto supresor sobre la migración celular, un efecto anti-arteriosclerótico, un efecto supresor sobre la activación de monocitos y macrófagos, un efecto anti-inflamatorio y similares. Kihara Shinji y cols.: "Anti-atherogenic property of adipocyte-derived plasma protein, adiponectin" BIOSIS, 2001, XP002972111 describen el uso de adiponectina como agente anti-aterogénico. Ouchi N y cols.: "Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expresión in human monocyte-derived macrophages" CIRCULATION, AMERICAN HEART ASSOCIATION, DALLAS, TX, US, vol. 103, n° 8, 27 de Febrero de 2001 (2001-02-27), páginas 1057-1063, XP002970251 ISSN: 0009-7322 describen que la
50 adiponectina reduce el acumulo lipídico en macrófagos cultivados. JP 2000 256208 A del 19 de Septiembre de 2000 describe las propiedades antiinflamatorias de la adiponectina. JP 2000 336040 del 5 de Diciembre de 2000 describe un gel de colágeno de tipo IV o de tipo I para tratar hepatocirrosis. Matsuzawa; Yuji y cols.: "Molecular mechanism of metabolic síndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances" ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES vol. 892, 1999, páginas 146-154; XP002951099 describen el efecto
55 negativo de la adiponectina sobre la proliferación de células de músculo liso.

Yokota, Takafumi y cols.: "Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages" BLOOD vol. 96, n° 5, 2000, páginas 1723-1732, XP002957161 describe que la adiponectina, un colágeno soluble de defensa específico de adipocitos, inhibe el crecimiento de progenitores mielomonocíticos y la función de macrófagos, es decir, expresión de
60 citoquinas proinflamatorias.

Descripción de la invención

Se ha investigado extensamente otra acción de la adiponectina y, finalmente, se ha descubierto que la adiponectina tiene acciones que no eran conocidas hasta el momento, como un efecto supresor de la activación de las células estrelladas hepáticas, un efecto supresor de la producción de matriz extracelular, un efecto supresor de la proliferación de células estrelladas hepáticas, un efecto promotor de la regeneración hepática y similares. Sobre la base de dichos descubrimientos, los investigadores hicieron un esfuerzo adicional y concretaron la invención.

Por ello, la presente invención se refiere a: adiponectina para prevenir y tratar cirrosis la hepática o la hepatitis crónica.

Como ya se ha mencionado, la adiponectina es una proteína que se produce en el tejido adiposo de un animal, incluyendo los seres humanos y que también está abundantemente presente en sangre.

La adiponectina humana se ha obtenido como una sustancia altamente purificada por un método de recombinación génica a partir de un cDNA que la codifica (Arita y cols., Biochem. Biophys. Res. Común. 257, 79-83 (1999)). ACRP30 derivada de ratón se obtiene como una sustancia altamente purificada por técnicas de recombinación génica tal como se describe en la referencia arriba descrita y también está disponible.

Un paciente al que se administra adiponectina es un paciente cuyo hígado está sufriendo o está en riesgo de fibrosis debido a enfermedad hepática crónica, especialmente hepatitis crónica. Administrando una cantidad eficaz de adiponectina a dicho paciente, la fibrosis puede ser inhibida o prevenida y se promueve la regeneración normal de los hepatocitos.

La adiponectina puede ser administrada de forma sistémica o local a un paciente con necesidad de la misma. Una administración sistémica puede ser, por ejemplo, una administración parenteral como una inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular y similares, o una administración oral. También es aplicable la terapia génica.

La forma posológica de un medicamento de acuerdo con la presente invención puede ser, por ejemplo, una formulación líquida como una formulación inyectable, así como una formulación sólida como un polvo, gránulo, comprimido, cápsula, supositorio o similares.

Una preparación farmacéutica para ser dada parenteralmente a un ser humano puede ser, por ejemplo, una formulación inyectable y un supositorio. Cuando la preparación farmacéutica es formulada como una formulación inyectable, aquellos que pueden ser empleados son disolventes (agua destilada para inyecciones y similares), estabilizantes (edetato sódico y similares), agentes osmóticos (cloruro sódico, glicerina, manitol y similares), modificadores de pH (ácido hidróclorico, ácido cítrico, hidróxido sódico y similares), agentes suspensores (metil celulosa, carboximetil celulosa sódica y similares), mientras que una base de supositorio (manteca de cacao, macrogol y similares) puede ser seleccionada y empleada de forma apropiada cuando es formulada como supositorio.

Las formas posológicas para administración oral a seres humanos pueden ser, por ejemplo, un polvo, gránulo, comprimido, cápsula, jarabe y formulación líquida. Cuando una preparación farmacéutica es formulada como un polvo, gránulo, comprimido y similares, se pueden emplear vehículos farmacéuticos apropiados para una formulación sólida, como excipientes (almidón, almidón de maíz, glucosa, fructosa, azúcar y similares), lubricantes (estearato de magnesio), disgregantes (almidón, celulosa cristalina), aglutinantes (almidón, goma arábiga y similares), y la formulación puede recubrirse con una cubierta (gelatina, azúcar, goma arábiga, cera de carnauba y similares), o cubierta entérica (ftalato de acetato de celulosa, copolímero de ácido metacrílico, ftalato de hidroxipropil celulosa, carboximetil etil celulosa y similares) apropiada. Como cubierta para formulaciones de liberación sostenida (formulación con sistema de liberación de medicamento (DDS)), aquellos que se pueden mencionar son hidroxipropilmetil celulosa, etil celulosa, hidroximetil celulosa, hidroxipropil celulosa, polioxietilen glicol, Tween 80, Pluronic F68, ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetil celulosa, succinato acetato de hidroximetil celulosa, Eudragit (Rohm, Alemania) copolímero de ácido metacrílico y ácido acrílico y similares.

Para formular una cápsula, un excipiente apropiado, incluidos aquellos para mejorar la fluidez y la lubricación, tales como estearato de magnesio, estearato cálcico, talco, anhídrido silícico ligero y similares, aquellos para obtener una fluidez bajo presión como celulosa cristalina y lactosa, así como los disgregantes arriba mencionados, son añadidos y mezclados uniformemente para formar una partícula con o sin cualquier cubierta apropiada, que luego es rellenado en una cápsula, o encapsulado utilizando una cápsula base que tiene una plasticidad aumentada obtenida complementando una base de cápsula apropiada (como gelatina) con glicerina, sorbitol o similares. Dicha cápsula, si se desea, puede ser complementada con colorantes, conservantes [dióxido de azufre, parabenos (metil, etil o propil paraoxibenzoato) y similares]. La cápsula puede ser una cápsula ordinaria o una cápsula con revestimiento entérico, cápsula gástrico-resistente, cápsula de liberación controlada y similares. Cuando se formula una cápsula entérica, se debe rellenar en una cápsula ordinaria un liposoma recubierto con una cubierta entérica, o la cápsula misma puede estar recubierta con una cubierta entérica, o puede estar moldeada utilizando un polímero entérico como base. Cuando la composición es formulada como un jarabe o una formulación líquida, aquellos que pueden ser seleccionados y empleados de forma apropiada son estabilizantes (edetato sódico y similares), agentes suspensores (goma arábiga, carmelosa y similares), condimentos (jarabe simple, glucosa y similares) y aromas.

Si bien la dosis puede variar dependiendo del tipo de enfermedad, sexo y edad del paciente, grado de la enfermedad, modo de administración y ruta y similares, por ejemplo, puede darse vía una inyección intravenosa a un adulto que sufre de cirrosis hepática a una dosis diaria de 1 a 100 mg/kg, preferiblemente 3 a 20 mg/kg.

5 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un efecto supresor de la adiponectina (ACRP 30) sobre la síntesis de ADN en RHSC.

La Figura 2 muestra un efecto supresor de la adiponectina (ACRP 30) sobre la proliferación en RHSC.

La Figura 3 muestra un efecto supresor de la adiponectina (ACRP 30) sobre la migración en RHSC.

La Figura 4 muestra un efecto supresor de la adiponectina (ACRP 30) sobre la expresión del ARNm de TGFβ.

La Figura 5 muestra un efecto supresor de la adiponectina (ACRP 30) sobre la expresión del receptor de tipo II del TGFβ.

La Figura 6 muestra un efecto supresor de la adiponectina (ACRP 30) sobre la expresión del gen de colágeno Iα1 TGFβ.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La invención se describe con detalle en los siguientes Experimentos y Ejemplos.

Experimento 1

1. Materiales y métodos

Separación de células estrelladas hepáticas de rata (RHSC)

Una rata SD macho de 8 semanas de vida se anestesió con nembutal y se sometió a laparotomía y se canuló la vena porta. El hígado, primero se digirió por perfusión con solución Hanks libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , seguida de perfusión con solución de collagenasa, y los hepatocitos se separaron por centrifugación a baja velocidad y se tamizaron a través de una malla para obtener una suspensión de células no parenquimales. Luego, las células estrelladas hepáticas se aislaron utilizando un rotor de elutriación (3250 rpm/min, 18 ml/min). Las células estrelladas resultantes se sembraron en placas de plástico, se sub-cultivaron por el método de tripsina/EDTA, y se emplearon los pases 3° a 5° en los siguientes experimentos.

El medio de cultivo fue medio DMEM complementado con FCS al 10% y 25 mg/l de cefamedina y 30 mg/l de canamicina como antibióticos.

2. Efecto supresor de síntesis de ADN en RHSC

El efecto supresor de la síntesis de ADN en RHSC se evaluó en base a la incorporación de ^3H -timidina en la célula.

Esto es, las RHSC tras sub-cultivo a lo largo de 4 pases se sembraron a 9×10^3 células/pocillo en una placa β de 96 pocillos. Tras verificar la adhesión de las células al día siguiente, se lavaron las células dos veces con PBS y se incubaron con medio libre de suero. Tras 48 horas, se efectuó la estimulación con adiponectina (ACRP30), a respectivos 0, 3, 10 y 30 μg/ml, durante 18 horas cada una en 6 pocillos que contienen el medio en presencia o ausencia de 10 ng/ml de PDGF. Posteriormente, cada pocillo se pulsó con 1,0 μCi/ml de ^3H -timidina durante 5 horas y luego, se analizó la radiactividad. Los resultados se presentan como cuentas por 30 segundos por pocillo (Figura 1).

Como evidencia la Figura 1, la adiponectina suprimió la síntesis de ADN por PDGF de una forma dependiente de dosis.

3. Efecto supresor de la proliferación de RHSC

Las RHSC tras sub-cultivo a lo largo de 4 pases se sembraron a 2×10^4 células/pocillo en una placa β de 12 pocillos. Tras verificar la adhesión de las células al día siguiente, se lavaron las células dos veces con PBS y se incubaron con medio libre de suero. Tras 48 horas, se añadieron 10 ng/ml de adiponectina complementada con PDGF a 0, 10 y 30 μg/ml a cada uno de los 3 pocillos, con lo que se efectuó la estimulación. En los días 1°, 2°, 4° y 6°, se recogieron las células por el método de tripsina/EDTA, y se contó el número de células con un hemocitómetro.

Los resultados se representan en la Figura 2, como porcentajes basados en el recuento celular promedio en el día 0 como 100%.

Tal como evidencia la Figura 2, la adiponectina suprimía, de forma dependiente de dosis, la proliferación de células RHSC inducidas por PDGF.

4. Efecto supresor de la capacidad de migración de las células estrelladas

La capacidad de migración se probó utilizando una placa β de 24 pocillos y un cultivo celular insertado, cuyo tamaño de poro era de $8\ \mu\text{m}$ (Chemotaxicell, KURABO). Previamente, un plato y un cultivo celular insertado se había
 5 recubierto con colágeno de tipo I durante 1 hora. Tras lavar las RHSC subconfluentes dos veces con PBS, utilizando dos platos de 10 cm de diámetro, las células se incubaron con medio libre de suero durante 48 horas. Tras lavarlas dos veces con PBS, las células se incubaron durante 30 minutos en presencia o ausencia de $30\ \mu\text{g/ml}$ de adiponectina, y luego se recolectaron por el método de tripsina/EDTA. Las células se introdujeron en DMEM libre de suero. Se permitió a los insertos permanecer suavemente en una placa β de 24 pocillos que contenía varias formulaciones de
 10 medio. Todas las formulaciones del medio eran libres en suero, y no contenían adiponectina, o contenían $10\ \text{ng/ml}$ de PDGF y $30\ \mu\text{g/ml}$ de adiponectina, y a cada una se le proporcionaron 3 insertos. Cada inserto se sembró con 4×10^4 RHSC. Posteriormente, las células se incubaron a 37°C durante 5 horas y luego, las RHSC que emergieron al final del inserto se sometieron a tinción con May-Giemsa y se observaron a 200 aumentos para contar las células. Los resultados están representados en la Figura 3 como porcentajes basados en el recuento celular promedio en el control
 15 como 100%.

Tal como evidencia la Figura 3, la adiponectina suprimió la migración de HSC en una extensión casi similar a la del control, que no fue estimulado con PDGF.

20 5. Efecto de adiponectina en la estimulación de $\text{TGF}\beta$

Las RHSC se sembraron en una placa β de 6 pocillos y se lavaron dos veces en subconfluencia con PBS, y se incubaron con DMEM libre de suero. Tras incubar durante 48 horas, las células se cultivaron durante 24 horas en varias formulaciones de medio que incluían un control (libre en $\text{TGF}\beta$, libre en adiponectina), $50\ \text{pg/ml}$ de $\text{TGF}\beta$, $50\ \text{pg/ml}$ de $\text{TGF}\beta$ + $30\ \mu\text{g/ml}$ de adiponectina. Posteriormente, se extrajo el ARN de las RHSC en cada pocillo por el
 25 método del Trizol. La concentración de ARN se midió por un espectrofotómetro, y se utilizó $1\ \mu\text{g}$ como plantilla para preparar cDNA con RT(transcriptasa reversa). Se utilizó una alícuota de $0,5\ \mu\text{l}$ como plantilla para realizar PCR. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, y se tiñó con Cyber Green. La PCR se llevó a cabo con el número de ciclos que dieron una amplificación lineal de cada cebador, incluyendo $\text{TGF}\beta$ receptor tipo II de $\text{TGF}\beta$ o colágeno $\text{I}\alpha 1$ (25 ciclos para $\text{TGF}\beta$ 24 ciclos para el receptor tipo II de $\text{TGF}\beta$ y 23 ciclos para el colágeno $\text{I}\alpha 1$). Tras correr el gel, se escanearon las bandas en una escáner de imagen y se introdujeron en un ordenador, donde se cuantificaron por un software Image Quant.

Se realizó un análisis estadístico por la prueba de Kruskal-Wallis para comparar entre grupos, y por la prueba de
 35 Scheffe para comparar entre parejas. Se definió una diferencia estadística significativa como $P < 0,05$.

Tal como evidencia la Figura 4, la adiponectina dio una marcada supresión de la expresión de ARNm de $\text{TGF}\beta$ por el mecanismo autocrino de $\text{TGF}\beta$. Tal como evidencia la Figura 5, la expresión del receptor de tipo II de $\text{TGF}\beta$ también está suprimida. Por consiguiente, se demostró que la adiponectina tiene un efecto supresor de la señal de $\text{TGF}\beta$. Como
 40 se evidencia también en la Figura 6, la expresión del gen de colágeno $\text{I}\alpha 1$, cuya expresión está aumentada por $\text{TGF}\beta$, también se suprimió por la adiponectina.

Ejemplo 1

45 Formulación inyectable

Adiponectina	2 mg
Tampón fosfato (pH 7,0)	cantidad adecuada
50 Total	1 ml

La formulación de arriba se dispersó dentro de ampollas de vidrio de 2 ml y se sellaron.

55 Ejemplo 2

Comprimido (revestimiento entérico)

60 Adiponectina	0,8 g
Almidón de maíz	12 g
Lactosa	27,2 g
65 Estearato de magnesio	0,4 g

ES 2 316 567 T3

La adiponectina, lactosa y almidón de maíz se combinaron y mezclaron minuciosamente para obtener un granulado para compresión de comprimidos de acuerdo con un proceso de compresión en húmedo. Se añadió estearato de magnesio y la mezcla se comprimió en 400 comprimidos. Cada comprimido se revistió con copolímero de metacrilato para revestimiento entérico.

5

Aplicabilidad industrial

Debido a que la adiponectina suprime una fibrosis hepática inducida por células estrelladas hepáticas activadas y promueve regeneración y proliferación normal de hepatocitos, puede promover la regeneración hepática y normaliza las funciones hepáticas cuando se administra a un paciente que sufre fibrosis hepática o está en riesgo de fibrosis hepática debido a cirrosis hepática o hepatitis crónica.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Adiponectina para uso en el tratamiento y prevención de cirrosis hepática y hepatitis crónica.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

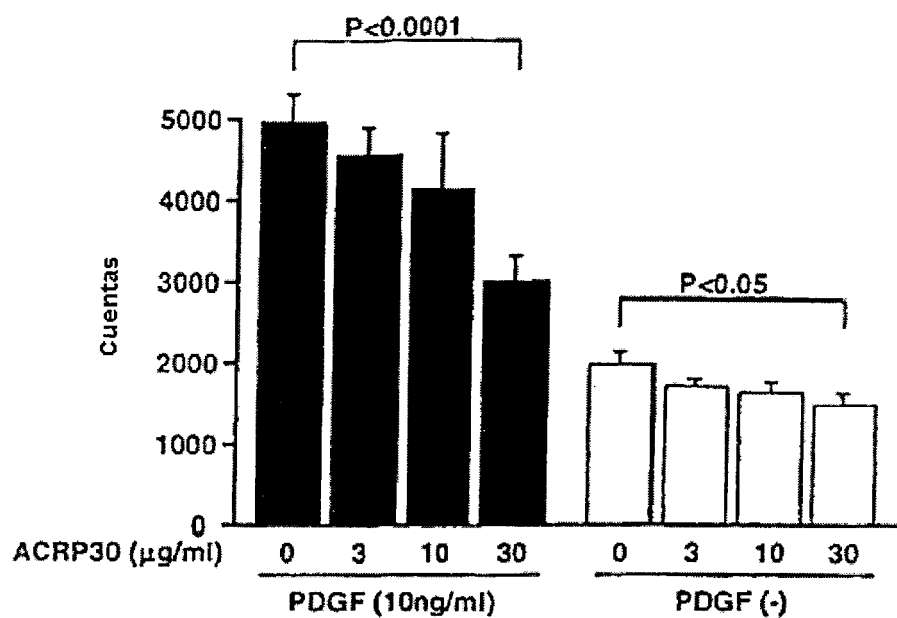


Fig. 2

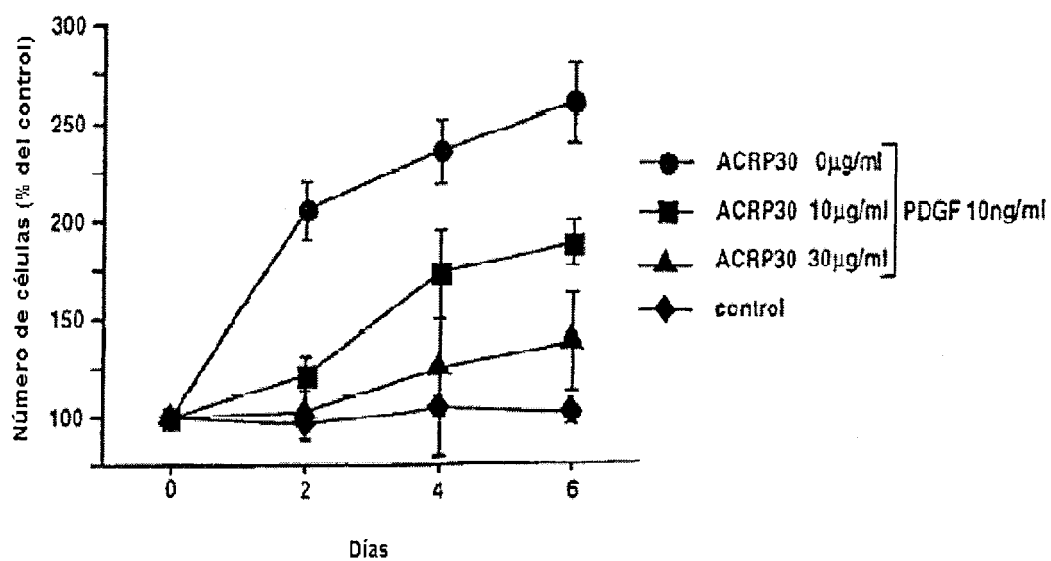


Fig. 3

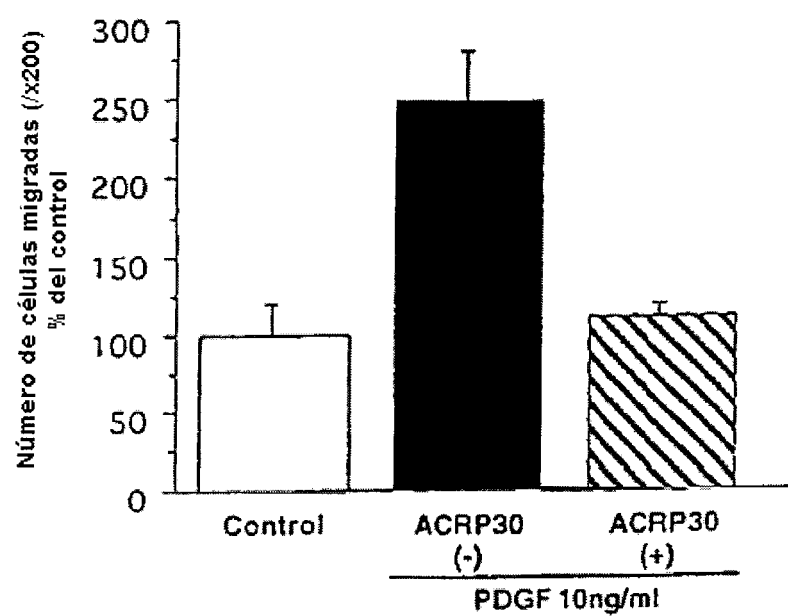


Fig. 4

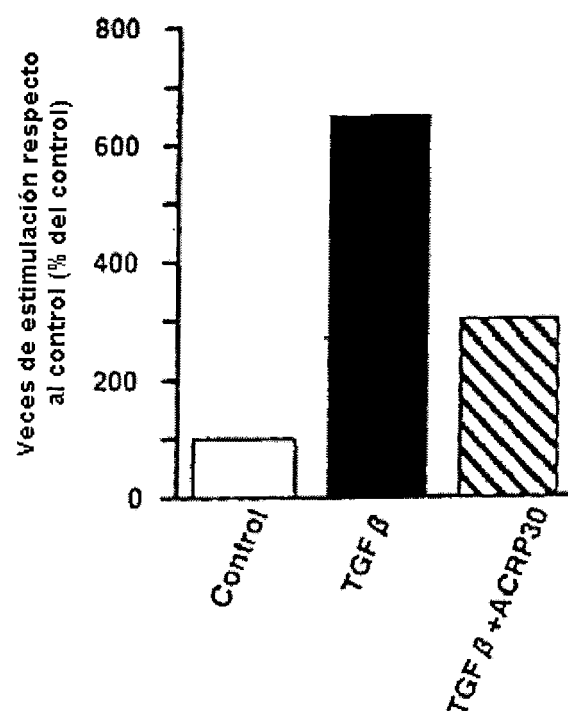


Fig. 5

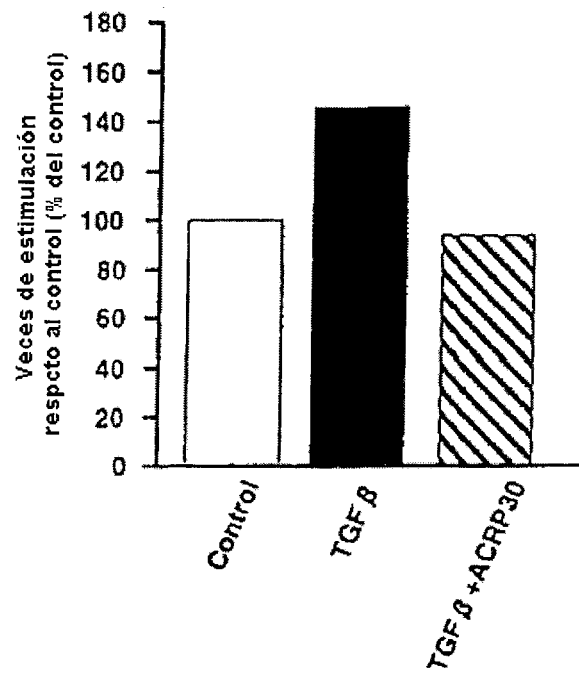


Fig. 6

