



No. 11-036581-00000-0000

Fecha: 2011-03-25 12:06:35

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 108

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No.

11-36581

54. TÍTULO

ADIPONECTINA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD PULMONAR

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

DOMICILIO

TOKYO, JAPON

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-036581- -00000-0000

Fecha: 2011-03-25 12:06:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 106

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Japón.

Dirección: 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japón

Domicilio: Tokyo, Japón

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@caveller.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 35.456.344 T.P 23.555

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. Kounori KOTOSAI
c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 5410045, Japón

2. Kazuyoshi KIRIMA
c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 5410045, Japón

3. Kelko KARASUTANI
c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 5410045, Japón

4. Yasukazu OHMOTO
c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 5410045, Japón

5. Yoichi YABUUCHI
900-25, Ohmatsu, Kawauchi-cho, Tokushima-shi, Tokushima 7710131 Japón

5

PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/JP2009/065380 Fecha: 27 de agosto de 2009
Publicación Internacional No. WO 2010/024460 A1 Fecha: 04 de marzo de 2010

6

Título (54)
ADIPONECTINA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD PULMONAR

7

Clasificación Internacional (51) A61K 038/017

8	Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	SI ☒ NO ☐	<u>JP</u>	<u>27 de agosto de 2008</u>	<u>2008-217721</u>

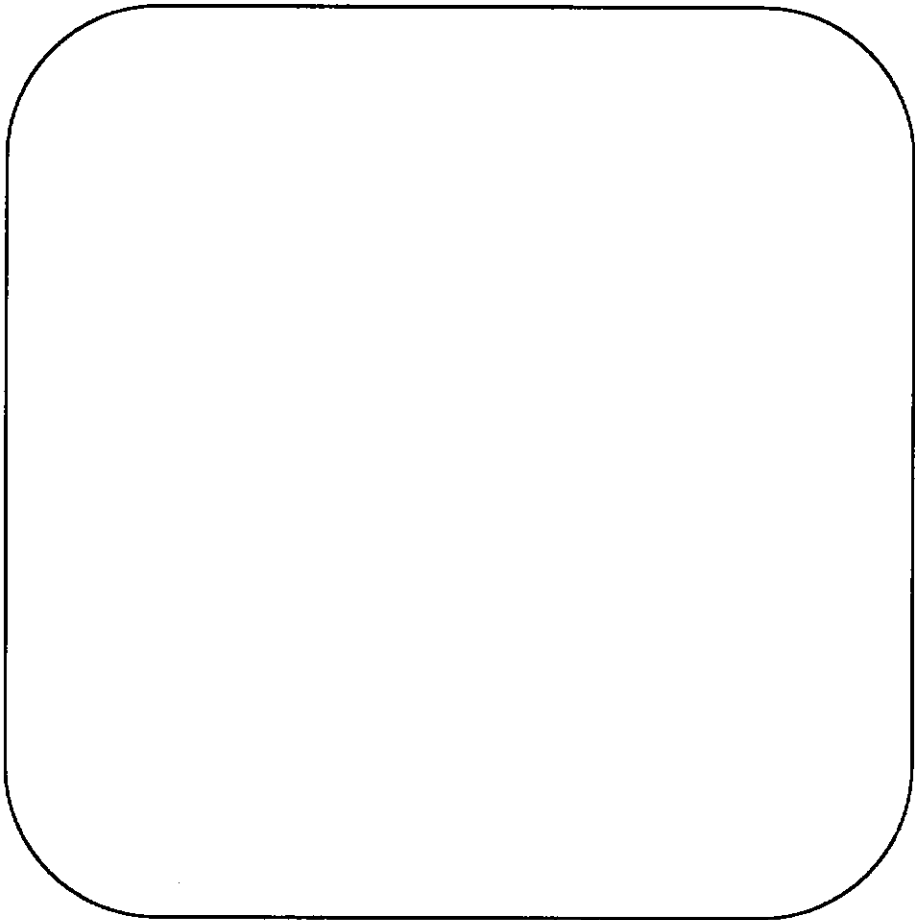
9 Comprobante de pago No.: 11-0023153 Fecha: 14 de marzo de 2011

10 **Anexos:**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 571.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

Luz Clemencia De Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

ASA

DOCUMENTOS ANEXOS

1.  **Publicación Internacional WO 2010/024460 A1**

Descripción:

Páginas 34 en el idioma original

Páginas 28 en español

Reivindicaciones: Número (s) 4

Figuras: Número (s) 2

2.  **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**
3.  **Forma PCT/ISA/237. Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional.**
4.  **Forma PCT/IB/306. Notificación de la inscripción del cambio de nombre del inventor **Keiko SADAKANE** por **Keiko KARASUTANI**.**
5.  **Extracto de publicación.**

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

domiciliado (s) en/of 2, Kanda-Tsukasamachi 2-chome.

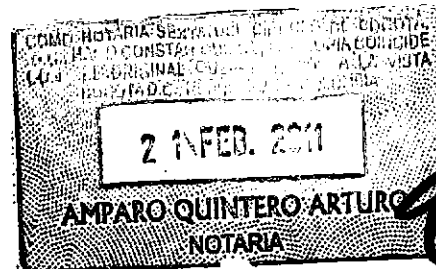
Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japan

por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA, tpa. 65620 y GERMAN MARIN, tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 343 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos;

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 343 of the Commercial Code, do hereby appoint LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA, tpa. 65620 and GERMAN MARIN, tpa. 64239, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service-marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the





6

b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, nulidad contenciosa, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contenciosos administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promuevan o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, pueda realizar este mandato, transigir, transigir, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agencias oficiales.

consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellations, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights, actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may institute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

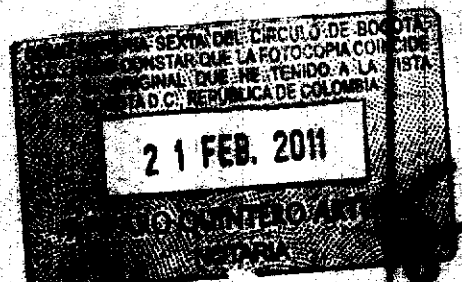
Given and Signed by/Given and signed this 26th of June, 2009

in/at Japan

for/by Yoshio SAMEZAWA, Director of Intellectual Property Department

Firma

Signature





証人

7

登簿平成 21 年第 387 号

当公証人は次の認証をする。

大塚製薬株式会社

知的財産部部長 鮫澤由夫

上記の者は代理人 三枝英二により

当公証人の面前でこの証書の署名を自認した。

上記の会社は日本国東京都千代田区神田司町 2

丁目 9 番地に所在し日本の法律に基づいて設立

された会社であることを東京法務局発行の証明

書によって相違ないことが認められるものであ

る。 _____

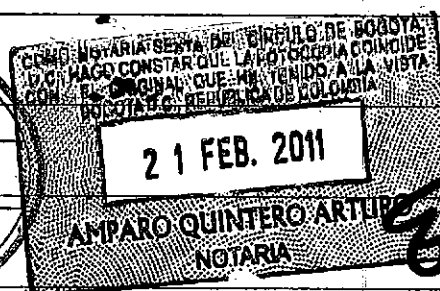
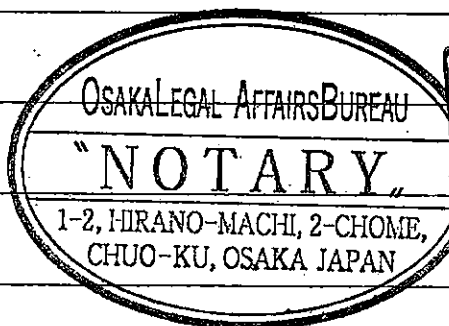
平成 21 年 6 月 26 日当公証人役場において

大阪府中央区平野町 2 丁目 1 番 2 号 (沢の鶴内)

大阪法務局所属

公証人

三枝英二



大阪法務局所属 公証人役場

登 平 如 12 年 第 387 号

当 公 司 人 員 之 公 司 公 司

大 公 司 公 司 公 司 公 司

夫 由 署 効 具 陪 陪 童 慎 的 映

の 上 二 英 妹 三 人 駐 升 公 司 公 司

。 公 司 公 司 公 司 公 司 公 司 公 司

と 同 田 軒 又 田 升 干 陪 京 東 国 本 日 公 司 公 司

立 婦 下 公 司 公 司 公 司 公 司 公 司 公 司

公 司 公 司 公 司 公 司 公 司 公 司

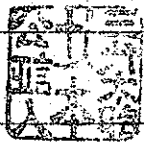
公 司 公 司 公 司 公 司 公 司 公 司

平 如 12 年 8 月 26 日 公 司 公 司 公 司

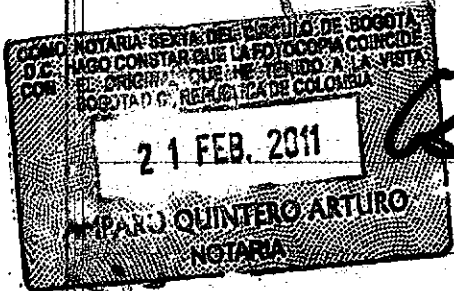
大 公 司 公 司 公 司 公 司 公 司 公 司

大 公 司 公 司 公 司 公 司

公 司 公 司



Handwritten signature in Japanese.



大 公 司 公 司 公 司 公 司

Registration No. 387-2009

CERTIFICATE

I, the undersigned, hereby certify :

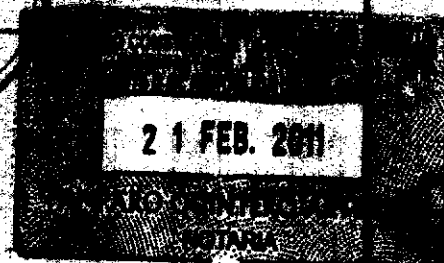
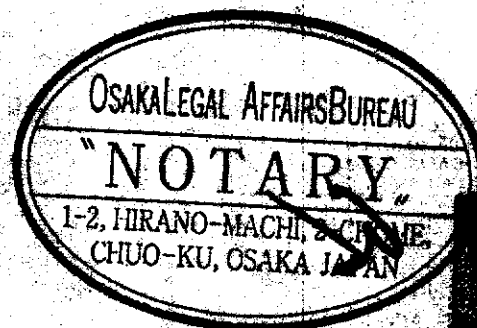
that Eiji SAEGUSA, a proxy for Yoshio SAMEZAWA, Director of Intellectual Property Department of OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., has stated in my presence that Eiji SAEGUSA has acknowledged as true the signature of Yoshio SAMEZAWA on the attached REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY.

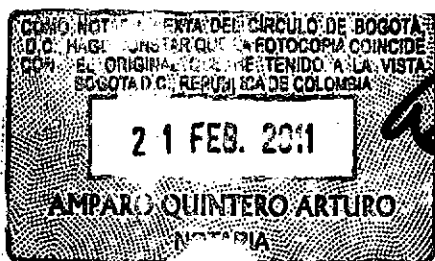
that the abovementioned company is a corporation located at 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japan;

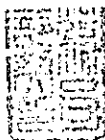
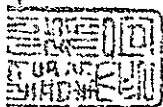
and was established under the laws of Japan ; as verified by the certificate issued by Tokyo District Legal Affairs Bureau.

Dated on this 26th day of June, 2009


Miyotaro TSUJIMOTO
Notary
Osaka Legal Affairs Bureau







9

総 第 2833 号

証 明

大阪法務局所属公証人

辻本 三代太郎

平成 21 年 6 月 26 日付

平成 21 年 登簿 第 387 号

この認証の付与は、在職中の公証人が
その権限に基づいてしたものであり、
かつ、その押印は、真実のものであること
を証明する。

For legalization by the foreign consul in Japan,
this is to certify that the Seal affixed hereto
is genuine.

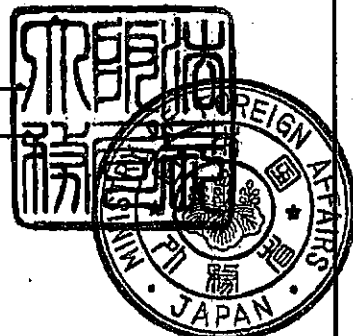
Osaka, JUN. 26 2009

M. Kawahito

平成 21 年 6 月 26 日
平成 21 年 6 月 26 日

Official
Ministry of Foreign Affairs
(Consular Service Division)

大阪法務局長 白石 研二

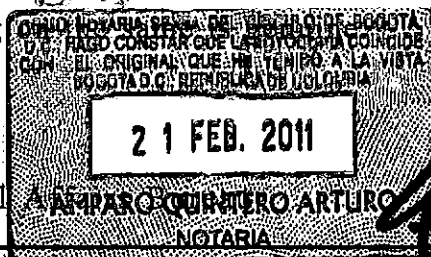


CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial Certificate has
been executed by Notary, duly authorized and practising in Osaka,
Japan, and that the Official Seal appearing

Date JUN. 26. 2009

Director of the Osaka Legal



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

016576

Jose Diaz
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 AGO -3 A 10-12

REGISTRACIONES
BOGOTA D.C.

EMBAJADA DE COLOMBIA - SECCION CONSULAR

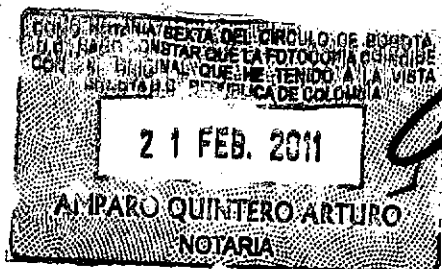
Tokio, Japón, JUNIO 30, 2009

No. 173

El encargado de las funciones consulares de Colombia
CERTIFICA:

Que el (la) Señor(a) NORIKO KAWAHITO, quien autoriza el presente documento, es la persona legalmente facultada para representar en la fecha señalada al (a la) MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, JAPON y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son las que usa y acostumbra para sus actos oficiales.

El Encargado de Funciones Consulares no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.



Firma del Encargado de Funciones Consulares

JOSE FRANCISCO DIAZ VILLOA
Segundo Secretario

Encargado de Funciones Consulares

Derechos: US\$30.00

10

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 08.04/09b realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia, registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual **OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.**, domiciliada en 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokio 1018535, Japón, otorga derechos de representación y poder a los Doctores Luz Clemencia de Páez, 23555; Daniel Peña, tpa. 65620 y Germán Marín, tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4 No. 12-35, Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el 26 de junio de 2009 en Japón por Yoshio SAMEZAWA, Director del Departamento de Propiedad Intelectual.

Firma Firma Ilegible

Registro No. 387 - 2009

CERTIFICADO

Yo, el suscrito, por el presente certifico:

que el señor Eiji SAEGUSA, apoderado de Yoshio SAMEZAWA, Director del Departamento de Propiedad Intelectual de OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., ha declarado en mi presencia que Eiji SEAGUSA ha reconocido como verdadera la firma del señor Yoshio SAMEWAZA en el adjunto documento de Representación y Poder.

que la anterior compañía es una sociedad domiciliada en 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokio 1018535, Japón; y que fue constituida de conformidad con la Ley de Sociedades; como lo constata el certificado expedido por el Consulado de Japón en Bogotá el 24 JUN 2009. Los sellos Legales de Tokio.

Fecha hoy 26 de junio de 2009

DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS, ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

Firma ilegible

Miyotaro TSUJIMOTO

Notario

Oficina de Asuntos Legales de Osaka

Sello: Oficina de Asuntos Legales de Osaka

NOTARIO

1-2 HIRANO-MACHI, 2-CHOME,

CHUO-KU, OSAKA, JAPÓN

TEXTO EN JAPONÉS

CERTIFICADO

El presente es para certificar que el Certificado Notarial anexo fue suscrito por un Notario debidamente autorizado y en ejercicio en Osaka, Japón y que el sello oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha JUN.-26.2009

Director de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka

Se anexa certificación No.173 expedida por la Sección Consular de la Embajada de Colombia en Tokio, Japón con fecha del 30 de junio de 2009 en donde se certifica la firma anterior del señor NORIKO KAWAHITO como funcionario del Ministerio de Relaciones Exteriores, Japón, así como el sello que aparece en el documento anexo. Certificación firmada por José Francisco Díaz Ulloa, Segundo Secretario de las Funciones Consulares. Pagados los Derechos Consulares.

Legalización de la firma anterior por parte del Jefe de Legalizaciones en Bogotá D.C. del Ministerio de Relaciones Exteriores con número 016576 del 28 de agosto de 2004.

Es traducción fiel y completa de la firma anterior en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-155360\WPCL002H\COLO 14055-841-003-5

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL

ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL

RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

019140

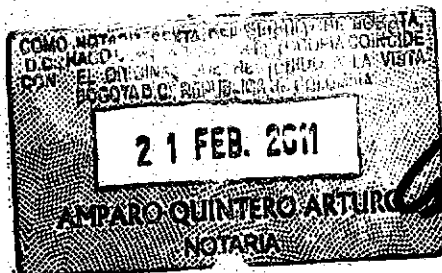
2009 AGO 11 A 9 27

DICGO JAZZAS
CUYA FIRMA ATANDE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

CAFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
RECIBO LEGALIZACION 3/3

No. 925583746596.



CESION

ASSIGNMENT

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)	I (we), the undersigned
	Please see the attached sheet.
domiciliado(s) en	of Please see the attached sheet.
declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es) de la invención:	state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention: ADIPONECTIN FOR TREATING PULMONARY DISEASE
declaro(amos) así mismo que cedo(amos) y transfiero(amos), sin limitación, a favor de la sociedad	state as well, that assign, without reservations or limitations in favour of OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
constituida y existente de conformidad con las leyes de	a corporation constituted and existing in conformity with the laws of
	Japan
domiciliada en	domiciled in
	9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japan
todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.	all rights inherent to said invention and that the above mentioned company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding patent invention, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/Given and signed this January 31, 2011
en/in Osaka, Japan

por/by Please see the attached sheet.

Firma/Signature Please see the attached sheet.



13

The undersigned

- 1) Kounori KOTOSAI,
- 2) Kazuyoshi KIRIMA,
- 3) Keiko KARASUTANI,
- 4) Yasukazu OHMOTO, and
- 5) Yoichi YABUUCHI

Domiciled in

- 1)-4) c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.,
1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka
5410045, Japan; and
- 5) 900-25, Ohmatsu, Kawauchi-cho, Tokushima-
shi, Tokushima 7710131, Japan

Singed

Kounori Kotosai

Kounori KOTOSAI

Kazuyoshi Kirima

Kazuyoshi KIRIMA

Keiko Karasutani

Keiko KARASUTANI

Yasukazu Ohmoto

Yasukazu OHMOTO

Yoichi - Yabuuchi

Yoichi YABUUCHI



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: **JAPAN**

This public document

2. has been signed by

Miyotaro TSUJIMOTO

3. acting in the capacity of

Notary Public of the Osaka
Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of

Miyotaro TSUJIMOTO, Notary Public

Certified

5. at **Osaka**

6. **FEB. - 8, 2011**

7. by **the Ministry of Foreign Affairs**

8. No. **0913**

9. Seal/stamp:



10. Signature:

Naomi Asano

Naomi ASANO

For the Minister for Foreign Affairs



14

登簿平成 23 年第 60 号

殊才孝則、桐間一嘉、鳥谷恵子、大本安一
及び藪内洋一は、代理人三枝 英二により当
公証人の面前でこの証書の署名を自認した。

よってこれを認証する。 _____

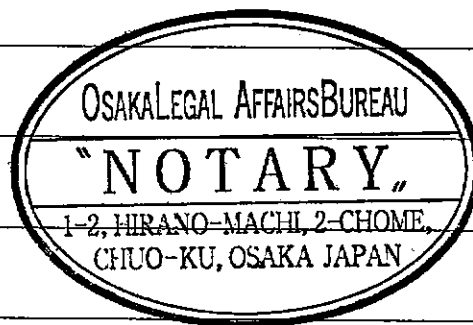
平成 23 年 2 月 7 日当公証人役場において

大阪府中央区平野町 2 丁目 1 番 2 号(沢の鶴ビル内)

大阪法務局所属

公証人

三枝英二



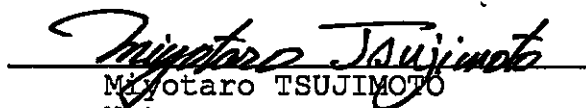
大阪法務局所属 公証人役場

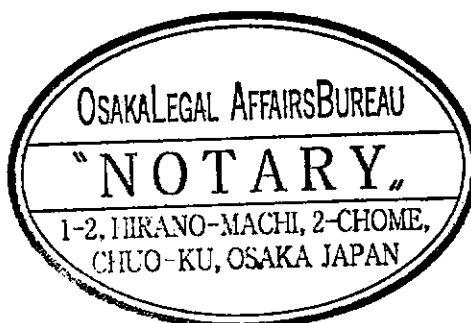
Registration No. 60 - 2011

CERTIFICATE

I, the undersigned, hereby certify that Eiji SAEGUSA, a proxy for Kounori KOTOSAI, Kazuyoshi KIRIMA, Keiko KARASUTANI, Yasukazu OHMOTO, and Yoichi YABUUCHI, i.e. the inventors and assignors, has stated in my very presence that said Kounori KOTOSAI, Kazuyoshi KIRIMA, Keiko KARASUTANI, Yasukazu OHMOTO, and Yoichi YABUUCHI acknowledged themselves to have signed to Assignment.

Dated on this 7th day of February, 2011


Miyotaro TSUJIMOTO
Notary
Osaka Legal Affairs Bureau
1-2, Hirano-Machi, 2-Chome
Chuo-ku, Osaka Japan



第 596 号

証 明

この認証の付与は、在職中の公証人が
その権限に基づいてしたものであり、
かつ、その押印は、真実のものであること
を証明する。

平成23年2月8日
平成 年 月 日

大阪法務局長 石 井 寛



Registration No.

CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial Certificate has
been executed by Notary, duly authorized and practising in Osaka,
Japan, and that the Official seal appearing on the same is genuine.

Date FEB. - 8, 2011

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau

TRADUCCIÓN OFICIAL 068/2011 DE UN DOCUMENTO EN INGLÉS Y ESPAÑOL POR EL CUAL LOS ABAJO FIRMANTES, 1) KOUNORI KOTOSAI, 2) KAZUYOSHI KIRIMA, 3) KEIKO KARASUTANI, 4) YASUKAZU OHMOTO Y 5) YOICHI YABUUCHI, DOMICILIADOS RESPECTIVAMENTE 1) A 4) C/O OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD, 1-7-1, DOSHOMACHI, CHUO-KU, OSAKA-SHI, OSAKA 5410045, JAPÓN Y 5) 900-25, OHMATSU, KAWAUCHI-CHO, TOKUSHIMASHI, TOKUSHIMA 7710131, JAPÓN DECLARAN BAJO JURAMENTO SER LOS INVENTORES ÚNICOS Y VERDADEROS DEL INVENTO AGENTE PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES PULMONARES Y QUE CEDEN Y TRANSFIEREN SIN LIMITACIÓN A FAVOR DE LA SOCIEDAD OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD, UNA SOCIEDAD CONSTITUIDA Y EXISTENTE DE CONFORMIDAD CON LAS LEYES DE JAPÓN, DOMICILIADA EN 9, KANDA-TSUKASAMACI 2-CHOME, CHIYODA-KU, TOKIO 1018535, JAPÓN, TODOS LOS DERECHOS INHERENTES A DICHA INVENCION Y QUE LA CITADA COMPAÑÍA QUEDA FACULTADA PARA SOLICITAR EN SU NOMBRE LA PATENTE DE INVENCION CORRESPONDIENTE EN LA REPUBLICA DE COLOMBIA.

DADO Y FIRMADO HOY 31 DE ENERO DE 2011 EN OSAKA, JAPÓN, POR 1) KOUNORI KOTOSAI, 2) KAZUYOSHI KIRIMA, 3) KEIKO KARASUTANI, 4) YASUKAZU OHMOTO Y 5) YOICHI YABUUCHI,
REGISTRO NO. 60 -2011

CERTIFICACIÓN

Yo, el abajo firmante por la presente certifico que EIJI SAEGUSA, un apoderado de 1) KOUNORI KOTOSAI, 2) KAZUYOSHI KIRIMA, 3) KEIKO KARASUTANI, 4) YASUKAZU OHMOTO Y 5) YOICHI YABUUCHI, inventores y cedentes, ha afirmado en mi presencia

Eduardo Calado N.

Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

Que dichos 1) KOUNORI KOTOSAI, 2) KAZUYOSHI KIRIMA, 3) KEIKO KARASUTANI, 4) YASUKAZU OHMOTO Y 5) YOICHI YABUUCHI, reconocieron haber firmado la cesión precedente.

Fechado hoy 7 de febrero de 2011.

Firmado: MIYOTARO TSUJIMOTO

Notario . OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE OSAKA

1-2, Hirano-Machi, 2-Chome Chuo-ku, Osaka, Japón

SELLO: OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE OSAKA, NOTARIO

1-2, HIRANO-MACHI, 2-CHOME, CHUO-KU, OSAKA, JAPÓN

CERTIFICACIÓN

Por la presente certifico que la certificación notarial adjunta ha sido firmada por un notario debidamente autorizado y practicante en Osaka, Japón y que el sello oficial que aparece en la misma es genuino.

Fecha: 8 de febrero de 2011

Director de la Oficina de Asuntos Jurídicos de Osaka.

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: JAPÓN

Este documento público

2. ha sido firmado por MIYOTARO TSUJIMOTO

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO DE LA OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE OSAKA

4. lleva el sello/estampilla de MIYOTARO TSUJIMOTO, NOTARIO PÚBLICO

CERTIFICADO

5. En OSAKA 6. el 8 de febrero de 2011

7. Por el Ministerio de Relaciones Exteriores

Eduardo Calisto N.
Eduardo Calisto Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Ene. 541 Febrero de 2011

19

10. Firma: NAOMI ASANO A NOMBRE DEL MINISTRO DE RELACIONES
EXTERIORES. 425 PALABRAS. 1 HORA

Bogotá, 23 de febrero de 2011.

Edmundo Galdo Neguerra
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Ene. 541 Febrero de 1976

100

20

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 March 2010 (04.03.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/024460 A1

PCT

(51) International Patent Classification:
A61K 38/17 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/JP2009/065380

(22) International Filing Date:

27 August 2009 (27.08.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

2008-217721 27 August 2008 (27.08.2008)

JP

(71) Applicant (for all designated States except US): OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. [JP/JP]; 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, 1018535 (JP).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KOTOSAI, Koumorl [JP/JP]; c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, 5410045 (JP). KIRIMA, Kazuyoshi [JP/JP]; c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, 5410045 (JP). SADAKANE, Keiko [JP/JP]; c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, 5410045 (JP). OHMOTO, Yasukazu [JP/JP]; c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, 5410045 (JP). YABUUCHI, Yotchi [JP/JP]; 900-25, Ohmatsu, Kawauchi-cho, Tokushima-shi, Tokushima, 7710131 (JP).

(74) Agent: Saegusa & Partners; Kitahama TNK Building, 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, 5410045 (JP).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: ADIPONECTIN FOR TREATING PULMONARY DISEASE

(57) Abstract: The present invention provides an agent for inhibiting alveolar airspace enlargement containing adiponectin or an agent for inhibiting alveolar wall destruction containing adiponectin. The pulmonary disease therapeutic agents of the present invention are highly safe drugs that possess an excellent effect of decreasing the deterioration of the pulmonary function, such as airflow limitation, and exhibit an extremely high effect of treating pulmonary disease accompanied by irreversible deterioration in pulmonary function, with fewer adverse side effects such as nausea, vomiting and gastric acid secretion.



WO 2010/024460 A1

24

DESCRIPTION

ADIPONECTIN FOR TREATING PULMONARY DISEASE

Technical Field

5 The present invention relates to an agent for treating pulmonary disease that inhibits abnormal alveolar airspace enlargement associated with destructive changes of alveolar walls caused by chronic injury thereto and/or that inhibits destructive changes of alveolar walls.

10

Background Art

 Various known pulmonary diseases (PD) include acute bronchitis due to acute inflammation caused by viruses or bacteria; bronchial asthma mainly caused by the inflammatory response of the respiratory tract due to eosinophils; 15 interstitial pneumonia caused by alveolar epithelial inflammation; lung cancer caused by cancer cells; and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), which is known as a disease characterized by pulmonary chronic inflammation caused by various factors, especially smoking, leading to 20 alveolar wall destruction and bronchial mucous gland hypertrophy resulting in shortness of breath, increased cough and sputum, etc. Particularly, a disease formerly called emphysema often complicates a disease formerly called chronic 25 bronchitis to varying degrees. Today, the obstructive pulmonary disease relating to these two diseases is referred to as COPD.

 It is said that COPD is characterized by the progressive development of airflow limitation (airway 30 obstruction) (Non-patent Document 1).

 Unlike chronic bronchitis in which respiratory tract hypersecretion and infection do not involve airflow limitation, irreversible airflow limitation is considered to result from peripheral airway lesions. Such pulmonary diseases include, 35 in addition to the aforementioned chronic obstructive pulmonary disease including emphysema and chronic bronchitis,

cystic fibrosis, bronchiectasis, tuberculosis, pneumoconiosis, and the like.

To date, with regard to drug therapy for pulmonary disease, including COPD accompanied by irreversible airflow limitation, drugs such as β 2-stimulants, anticholinergic agents and the like having bronchodilatory activity are used for temporally preventing or suppressing the symptoms. However, these drugs having bronchodilatory activity cannot decrease, for a long period of time, the deterioration of the pulmonary function, which is the most important clinical indicator.

Many large-scale clinical studies have examined the effects of therapy using, as inhalants, steroids having a potent inhibitory effect on the production of cytokines; however, several documents have reported that steroids could not decrease the deterioration of the pulmonary function over a long period of time (see Non-patent Documents 2 to 4).

Regarding the effects of PD therapy using drugs having inhibitory effects on the production of active oxygen, no reliable clinical studies have been conducted.

According to a clinical study, N-acetylcystein, an antioxidant that is considered to have a mechanism of action similar to that of agents for inhibiting the production of active oxygen, can reduce the frequency of acute exacerbation of COPD (Non-patent Document 5). However, no documents have reported that N-acetylcystein exhibits an effect of decreasing the deterioration of the pulmonary function over a long period of time.

Further, for the treatment of PD, the use of drugs inhibiting phosphodiesterase IV activity has been discussed. However, it is reported that these drugs have adverse side effects such as nausea, vomiting and gastric acid secretion (Non-patent document 6).

As described above, no drugs that achieve satisfactory performance as a drug for treating chronic pulmonary disease, and that decrease the irreversible deterioration of the pulmonary function, i.e., that inhibit

23

abnormal alveolar airspace enlargement associated with destructive changes of alveolar walls due to chronic injury thereto and/or that inhibit destructive changes of alveolar walls, have been developed.

5

Citation List

Patent Literature

PTL 1: WO1996/39429

PTL 2: WO1999/21577

10 PTL 3: Japanese Patent No. 3018186

PTL 4: Japanese Patent No. 4147220

PTL 5: Japanese Unexamined Patent No. 2004-16074

Non Patent Literature

15 NPL 1: Pauwell, R.A. et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med.,
2001(163), 1256-1276NPL 2: Pauwels RA, Loda HC, Laitinen LA, Schouten JP, Postma DS,
Pride NB, et al. N. Engl. J. Med., 1999(340), 1948-1953NPL 3: Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P,
Viskum K, Lancet, 1999(353) 1819-182320 NPL 4: Burge PS, Calverley PM, Jones PW, Spencer S, Anderson JA,
Maslen TK, BMJ, 2000(320), 1297-1303NPL 5: C. Stey, J. Steurer, S. Bachmann, T. C. Medici, M. R. Tramer,
Eur. Respir. J., 2000(16), 253-262

NPL 6: Peter J. Barnes, N. Engl. J. Med., 2000(343) No. 4, 269-280

25 NPL 7: Maeda, K. et al., Biocjem. Biophys. Res. Commun.,
1996(221), 286-289

Summary of Invention

Technical Problem

30 The object of the present invention is to provide a highly safe drug that is useful for treating a patient with pulmonary disease whose pulmonary function is irreversibly deteriorated.

35 Solution to Problem

The present inventors prepared an animal model that

displays pathogenic features clinically very similar to COPD accompanied by irreversible deterioration in pulmonary function, and conducted extensive research using this animal model. As a result, they found that adiponectin, which is
5 known as a collagen-like secretory protein specifically secreted from adipose cells, inhibits pulmonary emphysema and pulmonary function disorders caused by elastase treatment, and arrived at a highly safe novel therapeutic agent that exhibits an extremely high effect of treating pulmonary disease
10 accompanied by irreversible deterioration in pulmonary function, with fewer adverse side effects such as nausea, vomiting, and gastric acid secretion. The present invention was accomplished based on such findings.

15 The present invention provides an adiponectin-containing agent for inhibiting alveolar airspace enlargement, and an adiponectin-containing agent for inhibiting alveolar wall destruction.

20 Item 1. An agent for inhibiting alveolar airspace enlargement, comprising adiponectin.

Item 2. The agent according to Item 1, wherein the adiponectin is contained in an amount effective for inhibiting alveolar
25 airspace enlargement associated with a destructive change of an alveolar wall.

Item 3. The agent according to Item 1 or 2, wherein the adiponectin is contained in an amount of 0.01 to 70 wt.%.
30

Item 4. The agent according to any one of Items 1 to 3, for use in the treatment of emphysema, chronic bronchitis, cystic fibrosis, bronchiectasis, tuberculosis, pneumoconiosis, or chronic obstructive pulmonary disease.
35

Item 5. An agent for inhibiting alveolar wall destruction,

comprising adiponectin.

Item 6. The agent according to Item 5, wherein the adiponectin is contained in an amount effective for inhibiting a
5 destructive change of an alveolar wall.

Item 7. The agent according to any one of Items 5 or 6, wherein the adiponectin is contained in an amount of 0.01 to 70 wt.%.

10 Item 8. The agent according to any one of Items 5 to 7, for use in the treatment of emphysema, chronic bronchitis, cystic fibrosis, bronchiectasis, tuberculosis, pneumoconiosis, or chronic obstructive pulmonary disease.

The agent for inhibiting alveolar airspace
15 enlargement of the present invention contains adiponectin in an amount effective for inhibiting alveolar airspace enlargement associated with destructive changes of alveolar walls, and the agent for inhibiting alveolar wall destruction of the present invention contains adiponectin in an amount
20 effective for inhibiting the alveolar wall destruction.

Adiponectin, which is an active ingredient of the agent for inhibiting alveolar airspace enlargement or the agent for inhibiting alveolar wall destruction of the present invention, is a collagen-like protein secreted from adipose
25 cells.

Adiponectin, which is an active ingredient of the agent for inhibiting alveolar airspace enlargement or the agent for inhibiting alveolar wall destruction (hereinafter abbreviated as "pulmonary disease therapeutic agents") of the
30 present invention, is an easily available and well-known substance. Commercially available adiponectin or adiponectin prepared by the known method shown in the reference example described later can be generally used in the invention.

Adiponectin genes of human and mouse are disclosed
35 in Patent Document 1 as human Acrp30 and mouse Acrp30, and human adiponectin is disclosed as apM1 in Non-Patent Document 7 and

26

Patent Document 2. The estimated amino acid sequence of the adiponectin polypeptide used in the pulmonary disease therapeutic agents of the present invention as an active ingredient is described in Patent Document 2; however, Patent Document 2 merely refers to the inhibitory effect of the polypeptide on smooth muscle cell growth, and its availability as an agent for preventing or improving arteriosclerosis, an agent for preventing or treating restenosis after angioplasty, and an anti-inflammatory agent.

Further, Patent Document 3 shows the usefulness of adiponectin, which suppresses, without macrophages or lymphocytes, clonal growth of relatively matured marrow monocytoïd progenitor cells in the differentiation stage, as an anti-inflammatory agent and a propagation suppressor for monocytoïd cell. Moreover, Patent Document 4 teaches that the C-terminal side spherical domain of adiponectin (corresponding to the amino acid sequences SEQ ID NOs: 114 to 239 of human adiponectin, and the amino acid sequences SEQ ID NOs: 111 to 242 of mouse adiponectin) has the effect of decreasing scavenger receptor A expression, and can be used as a preventive and therapeutic agent for arteriosclerosis. Similarly, Patent Document 5 refers to the availability of the C-terminal side spherical domain of adiponectin as an AMP-activated protein kinase activator.

The following adiponectin are commercially available from Bio Vendor (Czechoslovakia; <http://www.biovendor.com/products/proteins>): globular recombinant adiponectin (Adiponectin Globular Human (*E. coli*)), recombinant adiponectin produced from *E. coli* (Adiponectin Human *E. coli* His), recombinant adiponectin produced from human embryonic kidney cells (Adiponectin Human HEK293 Flag), trimeric recombinant adiponectin produced from human embryonic kidney cells (Adiponectin Human Trimeric form (HEK)), low- and high-molecular-weight adiponectin produced from human embryonic kidney cells (Adiponectin LMW and MMW oligomer-rich Human (HEK)), middle- and high-molecular-weight

25

adiponectin produced from human embryonic kidney cells (Adiponectin MMW and HMW oligomer-rich Human (HEK)), etc.

A specific example of the polypeptide used in the pulmonary disease therapeutic agents of the present invention as an active ingredient is a polypeptide known as "adiponectin", encoded by the PCR product and shown in examples described later. The full-length DNA sequence of human adiponectin is 4,517 bp in length, and the DNA sequence encoding an open reading frame (ORF) is 732 bp in length, as shown in SEQ ID NO: 2. The amino acid sequence encoded by the ORF is composed of 244 amino acid sequences, as shown in SEQ ID NO: 1, and the gene sequence has been registered as the GenBank accession number NM_004797. Further, the full-length DNA sequence of mouse adiponectin is 1,276 bp in length, as shown in SEQ ID NO: 5, and the DNA sequence encoding ORF is 741 bp in length, as shown in SEQ ID NO: 4. The amino acid sequence encoded by the ORF is composed of 247 amino acid sequences, as shown in SEQ ID NO: 3, and the gene sequence has been registered as the GenBank accession number AF304466. Moreover, gene expression of human and mouse adiponectin specific to fat tissue has been recognized.

The amino acid sequence homology between human adiponectin and mouse adiponectin is 83.61%, and the DNA sequence homology of the ORF is 79.78%. Such a remarkably high level of homology implies that both have the same activity.

The present inventors found that adiponectin inhibits abnormal alveolar airspace enlargement associated with destructive changes of alveolar walls due to chronic injury, or exhibits pulmonary function improvement attained by inhibiting destructive changes of alveolar walls, and they concluded that adiponectin can be preferably used as a drug.

As described above, since adiponectin can inhibit abnormal alveolar airspace enlargement associated with destructive changes of alveolar walls due to chronic injury, it can be used for treating pulmonary diseases such as emphysema, chronic bronchitis, cystic fibrosis, bronchiectasis, tuberculosis, pneumoconiosis, and COPD.

28

Patent Document 1: WO1996/39429

Patent Document 2: WO1999/21577

Non-patent Document 7: Maeda, K. et al., B.B.R.C., (1996) Vol.

5 221 No.2, pp286-289

The production of adiponectin for use as the active ingredient of the pulmonary disease therapeutic agents of the invention, preparation of the pulmonary disease therapeutic agents using adiponectin as an active ingredient, etc. are now described.

The designation of amino acids, peptides, nucleotide sequences, nucleic acids, etc. by abbreviations in this specification is in conformity with the rules of nomenclature recommended by IUPAC-IUB (IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138, 9(1984)), "The Guidelines for Drafting of Specifications Etc. Containing Nucleotide Sequence or Amino Acid Sequence Information" (Edited by the Japanese Patent Office, (July, 1998) and the conventions in the relevant field of art.

Adiponectin can be provided in the form of a recombinant protein by the established genetic engineering techniques [e.g. Science, 224, 1431(1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692(1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 5990 (1983)]. In this case, as the adiponectin (apM1) gene, the gene which was previously established by the present inventors can be used [Biochem. Biophys. Res. Commun., 221, 286-289 (1996)].

As an alternative, adiponectin can be produced by the conventional method for chemical synthesis in accordance with the information on the amino acid sequence encoded by said gene.

The production of adiponectin by a genetic engineering technique can be performed according to a method described in Reference Example 1 below. More specifically, the production comprises constructing a recombinant DNA with which the gene coding for the objective protein may be expressed

29

in a host cell, introducing the DNA into the host cell to obtain a transformant and culturing the transformant.

In the specification, a polynucleotide (DNA molecule) encompasses not only double strand DNA but also single strand
5 DNA including sense chains and antisense chains which compose them, and is not limited to a length thereof. Therefore, the polynucleotide encoding adiponectin includes the double strand DNA including genomic DNA and the single strand DNA (sense chain) including cDNA and the single strand DNA
10 (antisense chain) having the sequence complementary to the sense chain and synthetic DNA fragments thereof unless otherwise mentioned.

The polynucleotide (DNA molecule) herein is not defined by a functional region, and can include at least one
15 of an expression suppression region, a coding region, a leader sequence, an exon and an intron.

The polynucleotide also includes RNA and DNA. The polypeptide comprising the certain amino acid sequence and the polynucleotide comprising the certain DNA sequence include
20 fragments, homologs, derivatives and mutants thereof.

The mutants of the polynucleotide (mutant DNA) include naturally occurring allelic mutants, not naturally occurring mutants, and mutants having deletion, substitution, addition and insertion. But, these mutants encode the
25 polypeptide having substantially the same function as the function of the polypeptide encoded by the polynucleotide before the mutation.

The mutation of the polypeptide (modification of amino acid sequence) is not necessary to occur by the naturally
30 occurring one, e.g., mutation or post-translational modification, and may be those artificially made by utilizing the naturally occurring protein (e.g., human adiponectin). The above mutants of the polypeptide include allelic variants, homologs and natural mutants having at least 80%, preferably
35 95% and more preferably 99% homology to the polypeptide before the mutation.

30

The homology of the polypeptide or the polynucleotide can be analyzed by measurement using FASTA program (Clustal, V., Methods Mol. Biol., 25, 307-318(1994)). As the most preferable and simple method for homology analysis, it is possible to exemplify the method in which the sequence is stored on a medium (e.g., flexible disc, CD-ROM, hard disc drive, external disc drive, DVD, etc.) capable of being read by computer and then known sequence database is searched in accordance with well-known searching procedure using the stored sequence. Specific examples of the known sequence database include the followings:

- DNA Database of Japan (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) ;
- Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/web/Genebank/Index.html>); and
- the European Molecular Biology Laboratory Nucleic Acid Sequence Database (EMBL) (<http://www.ebi.ac.uk/ebidocs/embl/db.html>).

Lots of searching algorithms for the homology analysis are available for those skilled in the art. One example thereof includes a program referred to as BLAST program. There are 5 BLAST procedures in this program. Three (BLASTN, BLASTX and TBLASTX) among them have been designed for checking the nucleotide sequence. Remaining two have been designed for checking the protein sequence (Coulson, Trends in Biotechnology, 12:76-80(1994); Birren, et al., Genome Analysis, 1:543-559(1997)).

In addition, additional programs, e.g., a sequence alignment program and a program for identifying the sequences more distantly separated are available in the art for analyzing the identified sequence.

The mutant DNA is silent (no change in an amino acid residue encoded by a mutated nucleic acid sequence) or conservative for the amino acid encoded by this. Examples of conservative amino acid substitution are shown below.

31

	Original amino acid residue	Conservative substituted amino acid residue
	Ala	Ser
5	Arg	Lys
	Asn	Gln or His
	Asp	Glu
	Cys	Ser
	Gln	Asn
10	Glu	Asp
	Gly	Pro
	His	Asn or Gln
	Ile	Leu or Val
	Leu	Ile or Val
15	Lys	Arg, Asn or Glu
	Met	Leu or Ile
	Phe	Met, Leu or Tyr
	Ser	Thr
	Thr	Ser
20	Trp	Tyr
	Tyr	Trp or Phe
	Val	Ile or Leu

25 Generally, one or more codons encoding a Cys residue affects a disulfide bond of the particular polypeptide.

The substitution of the amino acid residue generally thought to affect characteristics of the protein includes the following:

- 30 a) the substitution of a hydrophobic residue with a hydrophilic residue, e.g., the substitution of Leu, Ile, Phe, Val or Ala with Ser or Thr;
- b) the substitution of the amino acid residue other than Cys and Pro with Cys or Pro;
- 35 c) the substitution of the residue having an electrically positive side chain, e.g., Lys, Arg or His with an electrically negative residue, e.g., Glu or Asp; and

32

d) the substitution of the amino acid residue having an extremely large side chain, e.g., Phe with the amino acid residue having no side chain, e.g., Gly.

Adiponectin comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or 3 or the amino acid sequence having one or more amino acid deletions, insertions, substitutions or additions in the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or 3, and has the alveolar airspace enlargement inhibitory activity and/or the pulmonary function improvement effect.

Adiponectin may be the polypeptide expressed in a protein expression system using *Escherichia coli* or a protein expression system using baculovirus (AcNPV) shown in Examples described later by gene recombination technology or the polypeptide obtained by chemically synthesizing.

As one specific example of the amino acid sequence of adiponectin, it is possible to exemplify one of SEQ ID NO:1 or 3. The amino acid sequence of adiponectin is not limited to one of SEQ ID NO: 1 or 3, and can be those (homologous ones) having a certain homology thereto. The homologous ones can include the polypeptides comprising the amino acid sequence having one or more amino acid deletions, insertions, substitutions or additions in the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or 3 and having the alveolar airspace enlargement inhibitory activity and/or the alveolar wall destruction inhibitory activity, and the pulmonary function improvement effect (the activity of inhibiting abnormal alveolar airspace enlargement associated with destructive changes of alveolar walls due to chronic injury, and/or the activity of inhibiting destructive changes of alveolar walls).

Specifically, the pulmonary function improvement effects of adiponectin include an effect of improving or reducing a decrease in breathing capacity of lungs, or an increase in breathing resistance in a respiratory tract (especially the bronchoalveolar tract) of mammals such as human.

As a host cell, cells derived from eucaryotes and

733

prokaryotes can be employed. The eucaryotic cell includes cells of vertebrates and cells of eucaryotic microorganisms. As the cell of a vertebrate, the monkey cell line COS (Cell, 23, 175 (1981)), the Chinese hamster ovarian cell line and the
5 corresponding dihydrofolate reductase-deficient cell line (Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 77, 4216 (1980)) and the like are often used but these are not exclusive choices.

As the expression vector of a vertebrate origin, a vector having a promoter sequence located upstream of the gene
10 to be expressed, RNA (precursor) splice site, a polyadenylation site and a transcription terminating sequence can be generally used. If necessary, the vector may further have a replication origin. As an example of such expression vector, pSV2dhfr harboring an early promoter of SV40 can be
15 mentioned (Mol. Cell. Biol., 1, 854 (1981)).

As the eucaryotic microorganisms, yeasts are generally used. Of these, yeasts of the genus *Saccharomyces* can be used with advantage. As the expression vector derived from a eucaryotic microorganism such as a yeast, pAM82 having
20 a promoter for the acidphosphatase gene (Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 1 (1983)) can be utilized.

As the prokaryotic host, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* are generally used. When they are used as hosts, using a plasmid vector capable of replicating in the
25 host microorganism, it is possible to suitably use an expression plasmid obtained by incorporating a promoter and SD (Shain and Daiglarano) sequence and an initiation codon (e.g., ATG) required for the initiation of protein synthesis at upstream of the gene so that the gene can be expressed in this
30 vector. As said *Escherichia coli* as the host, *E. coli* K12 is generally used, and as the vector, pBR322 or its modification product is generally used. However, these are not exclusive choices but the various known bacterial strains and vectors can likewise be employed. Examples of the promoter that can
35 be used are tryptophan (*trp*) promoter, *lpp* promoter, *lac* promoter, and PL/PR promoter.

34

As the vector for the insect cell, it is possible to exemplify a baculovirus vector (Takara) in which cDNA of adiponectin has been incorporated. Specifically, the expressed product of the present invention can be obtained by introducing the baculovirus expression vector in which cDNA of adiponectin has been incorporated into cultured cells BmN4 or larvae of silkworm (*Bombyx mori*) using nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) of silkworm to express, and isolating from a culture medium or a silkworm body fluid by chromatography.

The expressed product of the present invention can also be obtained by incorporating the cDNA of adiponectin into the nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) of *Autographa californica*, expressing it in Sf9 cells of *Spodoptera frugiperda* or Tn5 cells of *Trichoplusia ni*, and likewise purifying from a culture supernatant by chromatography.

Introduction of the resulting recombinant DNA into the host cell for transformation can be carried out according to the known method.

The resulting transformant can be cultured in accordance with the standard methods, whereby the objective recombinant protein is expressed and produced (accumulated or secreted) intracellularly, extracellularly or on the cell membrane. As a medium used for the culture, various media commonly used can be suitably selected and used according to the host cell employed. The culture can also be carried out under conditions suitable for the growth of the host cell.

If necessary, the adiponectin obtained in the above manner can be isolated and purified by various separation procedures utilizing the physical, chemical and other characteristics thereof (Biochemical Data Book II, 1175-1259, First Edition, 1st impression, Jun. 23, 1980, published by Tokyo Kagaku Dojin, K.K.; Biochemistry, 25 (25), 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163, 313 (1987), etc.). More specifically, said isolation and purification can be achieved by the conventional reconstitution treatment, treatment with a protein-precipitating (salting-out) agent, centrifugation,

35

osmotic pressure shock method, sonication, ultrafiltration, various types of liquid chromatography such as molecular sieve chromatography (gel filtration), adsorption chromatography, ion-exchange chromatography, affinity chromatography, 5 high-performance liquid chromatography (HPLC), etc., and dialysis as used either singly or in combination.

Alternatively, the adiponectin mentioned above can also be produced by the general method for chemical synthesis based on the amino acid sequence information. The method 10 includes the conventional liquid-phase and solid-phase methods for peptide synthesis. In more detail, each of these methods includes the so-called stepwise elongation technique which comprises condensing component amino acids one after another for chain extension according to the amino acid 15 sequence information, and the fragment condensation technique which comprises synthesizing fragment peptides each consisting of several amino acid residues in advance and coupling them together one after another according to said information.

20 A condensation method employed for the peptide synthesis can also be performed in accordance with the standard methods. Examples of the standard methods include an azide method, a mixed acid anhydrate method, a DCC method, an active ester method, an oxidation and reduction method, a DPPA (diphenylphosphorylazide) method, a DDC + additive 25 (1-hydroxybenzotriazole, N-hydroxysuccinamide, N-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboxyimide) method and Woodward method.

The solvent that can be used in those methods can be 30 suitably selected from the solvents that are well known to be of use in peptide-forming condensation reactions. Examples thereof include N,N-dimethylformamide (DMF), dimethyl sulfoxide (DMSO), hexaphosphoramide, dioxane, tetrahydrofuran (THF), ethyl acetate, etc., and mixture 35 thereof.

Upon the above peptide synthesis reaction, the amino

36

acid not involved in the reaction or the carboxyl group in the peptide can be protected as lower alkyl ester such as methyl ester, ethyl ester and tert-butyl ester, and aralkyl ester such as benzyl ester, p-methoxybenzyl ester and p-nitrobenzyl ester
5 generally by esterification.

The hydroxyl group in the amino acid such as tyrosine residue having a functional group in the side chain may be protected with acetyl, benzyl, benzyloxycarbonyl, tert-butyl or the like, although such protection is not necessarily
10 indispensable.

Moreover, the guanidino group of an arginine residue can be protected with an appropriate protective group such as nitro, tosyl, p-methoxybenzenesulfonyl, methylene-2-sulfonyl, benzyloxycarbonyl, isobornyloxycarbonyl or
15 adamantyloxycarbonyl.

The reactions for elimination of such protective groups from the protected amino acids or peptides, or from the final protein, can be carried out in accordance with the methods commonly used, such as a catalytic reduction method or method
20 using liquid ammonia/sodium metal, hydrogen fluoride, hydrogen bromide, hydrogen chloride, trifluoroacetic acid, acetic acid, formic acid, or methanesulfonic acid, and the like.

The adiponectin thus obtained can be purified by the various methods such as methods using an ion-exchange resin, partition chromatography and gel chromatography, and a
25 countercurrent distribution method commonly used in the field of peptide chemistry.

The pulmonary disease therapeutic agents of the present invention comprise adiponectin or a pharmacologically acceptable salt thereof as an active ingredient. The salt includes those with alkali metals, alkaline earth metals and ammonium, such as the sodium, potassium, lithium, calcium, magnesium, barium and ammonium salts. These salts can be
30 produced by the methods well known in the art. The above-mentioned salt further includes acid addition salts
35

37

which can be prepared by reacting adiponectin with a suitable organic or inorganic acid in the per se known manner. Examples of the acid addition salts are hydrochloride, hydrobromide, sulfate, bisulfate, acetate, oxalate, valerate, oleate, laurate, borate, benzoate, lactate, phosphate, p-toluenesulfonate (tosylate), citrate, maleate, fumarate, succinate, tartrate, sulfonate, glycolate, ascorbate, benzenesulfonate, napsylate and like salts.

The pulmonary disease therapeutic agents of the invention are generally provided and put to use in the form of a pharmaceutical preparation containing a pharmacologically effective amount of the active ingredient together with an appropriate pharmaceutical carrier.

The carrier that can be utilized in such pharmaceutical preparations includes various diluents and/or excipients, such as fillers, extenders, binders, humectants, disintegrants, surfactants, lubricants, and the like. These carriers are optionally used according to a unit dosage form of the resulting formulation.

The unit dosage forms of the pharmaceutical preparations can be selected from various forms according to the purpose of therapy. Typical examples include solid forms such as tablets, pills, powders, fine powders, granules and capsules, and liquid forms such as solutions, suspensions, emulsions, syrups and elixirs. These preparations are classified, by route of administration, into oral preparations, parenteral preparations, transnasal preparations, vaginal preparations, rectal suppositories, sublingual tablets, ointments, and the like, and each can be formulated and molded or otherwise processed by the established pharmaceutical procedure. Furthermore, such pharmaceutical preparations may contain various additives which can be formulated in ordinary pharmaceutical preparations, such as stabilizers, antibacterial agents, buffers, isotonizing agents, chelating agents, pH control agents and surfactants.

The stabilizer includes human serum albumin and those

38

L-amino acids, saccharides and cellulose derivatives. These can be used each alone or in combination with a surfactant or the like. Particularly, such a combination may contribute to an enhanced stability of the active ingredient.

5 The L-amino acids are not particularly limited and include glycine, cysteine, glutamic acid, etc.

 The saccharides are not particularly limited but include monosaccharides such as glucose, mannose, galactose and fructose; sugar alcohols such as mannitol, inositol and
10 xylitol; disaccharides such as sucrose, maltose and lactose; and polysaccharides such as dextran, hydroxypropyl-starch, chondroitin sulfate and hyalluronic acid; and derivatives thereof.

 The surfactants are not particularly limited and
15 ionic and nonionic surfactants can be employed. Examples of the surfactants are polyoxyethylene glycol sorbitan alkyl esters, polyoxyethylene alkyl ethers, sorbitan monoacyl esters, and fatty acid glycerides.

 The cellulose derivatives are not particularly
20 limited but include methylcellulose, ethylcellulose, hydroxyethylcellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, carboxymethylcellulose sodium etc.

 The saccharides can be used at least about 0.0001 mg,
25 and preferably within the range of about 0.01 to about 10 mg per 1 μ g of the active ingredient. The surfactants can be used at least about 0.00001 mg, and preferably within the range of about 0.0001 to about 0.01 mg per 1 μ g of the active ingredient. The human serum albumin can be used at least about 0.0001 mg,
30 and preferably within the range of about 0.001 to about 0.1 mg per 1 μ g of the active ingredient. The amino acids can be used within the range of about 0.001 to about 10 mg per 1 μ g of the active ingredient. The cellulose derivatives can be used at least about 0.00001 mg, and preferably within the range of
35 about 0.001 to about 0.1 mg per 1 μ g of the active ingredient.

 The amount of the active ingredient contained in the

pharmaceutical preparations of the present invention can be suitably selected from a broad range. It is suitable that the amount of the active ingredient is typically about 0.00001 to about 70 wt.%, and preferably about 0.0001 to about 5 wt.%.

5 The buffer which may be optionally incorporated in the pharmaceutical preparations includes boric acid, phosphoric acid, acetic acid, citric acid, ϵ -aminocaproic acid, glutamic acid and the corresponding salts (e.g. salts with
10 alkali metals or alkaline earth metals such as the sodium, potassium, calcium and magnesium salts). The isotonizing agent includes sodium chloride, potassium chloride, sugars and glycerine. The chelating agent includes sodium edetate and citric acid.

 The pharmaceutical preparations of the invention can
15 be prepared as a liquid preparation, and additionally can be made into lyophilized dosage form obtained by lyophilizing the pharmaceutical formulation, which is prepared at an appropriate concentration in use by dissolving in the buffer containing saline.

20 In molding the pharmaceutical composition of the invention into the tablet form, there can be used, as the carrier, various excipients such as lactose, sucrose, sodium chloride, glucose, urea, starch, calcium carbonate, kaolin, crystalline cellulose, silicic acid and potassium phosphate;
25 binders such as water, ethanol, propanol, simple syrup, glucose solution, starch solution, gelatin solution, carboxymethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, methyl cellulose and polyvinyl pyrrolidone; disintegrators such as sodium carboxymethyl cellulose, calcium carboxymethyl
30 cellulose, low-substituted hydroxypropyl cellulose, dry starch, sodium alginate, agar powder, laminaran powder, sodium hydrogen carbonate and calcium carbonate; surfactants such as polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester, sodium lauryl sulfate and stearyl monoglyceride; disintegration inhibitors
35 such as sucrose, stearin, cacao butter and hydrogenated oil; absorption promoters such as quaternary ammonium base and

40

sodium lauryl sulfate; humectants such as glycerin and starch; adsorbents such as starch, lactose, kaolin, bentonite and colloidal silicic acid; and lubricants such as purified talc, stearic acid salt, boric acid powder and polyethylene glycol.

5 Furthermore, if necessary, the tablets obtained can be coated with the conventional coating materials to provide sugar-coated tablets, gelatin-coated tablets, enteric tablets, film-coated tablets or double- or multi-layer tablets.

10 The pills can be prepared using, as the carrier, excipients such as glucose, lactose, starch, cacao butter, hydrogenated vegetable oil, kaolin and talc; binders such as gum arabic powder, gum tragacanth powder, gelatin and ethanol, and disintegrators such as laminaran and agar.

15 In general, capsules can be prepared by mixing the active ingredient with the above-mentioned carriers according to a usual method to enclose the former in a hard gelatin capsule, soft gelatin capsule or the like.

20 The liquid preparation for oral administration includes solutions, emulsions, suspensions, syrup and elixirs. Each can be prepared using a conventional inert diluent; for example a pharmacologically acceptable vehicle inclusive of water. The liquid preparation may further be supplemented with various auxiliary agents such as a wetting agent, an emulsifier and/or a suspending agent and can be prepared by the established
25 procedure.

The liquid preparation for parenteral administration, for example a sterile aqueous or nonaqueous solution, emulsion or suspension, can be prepared by using a diluent such as water, ethyl alcohol, propylene glycol, polyethylene glycol, 30 ethoxylated isostearyl alcohol, polyoxylated isostearyl alcohol, polyethoxylated sorbitan fatty acid esters and vegetable oils such as olive oil. The liquid preparation may be supplemented with an organic ester which can be injected or infused, such as ethyl oleate. Such preparations may be
35 further supplemented with the solubilizer, buffer, wetting agent, emulsifier, suspending agent, preservative, dispersant

41

and other additives.

Such pharmaceutical preparations can be sterilized by filtration through a bacterial filter, incorporation of a bactericide, irradiation treatment, heat treatment, or the like. Moreover, such pharmaceutical preparations may each be provided in the form of a sterile solid composition, which can be dissolved in sterilized water or a suitable sterilizable medium for extemporaneous sterilization.

Rectal suppositories and vaginal preparations can be prepared by using carriers such as polyethylene glycol, cacao butter, a higher alcohol, a higher alcohol ester, gelatin and a semi-synthetic glyceride.

Ointments such as pastes, creams and gels can be prepared by using such a diluent or diluents as white petrolatum, paraffin, glycerin, cellulose derivatives, propylene glycol, polyethylene glycol, silicones, bentonite, and vegetable oils such as olive oil.

Pharmaceutical preparations for transnasal or sublingual administration can be prepared using the well-known standard excipient or excipients in the conventional manner.

Furthermore, if necessary, the pharmaceutical preparations of the invention can be supplemented with coloring agents, preservatives, perfumes, flavors, sweeteners or other pharmaceutical compositions.

The method for administering the pharmaceutical preparation is not limited, but is selected according to the dosage form, the patient's age, sex and other conditions, and the status of the disease. For example, the tablets, pills, solutions, suspensions, emulsions, granules and capsules are orally administered. The injections are intravenously administered either alone or in mixture with an ordinary infusion such as glucose and amino acid, and if necessary, administered alone intramuscularly, intradermally, subcutaneously or intraperitoneally. The suppositories are administered intrarectally. The vaginal preparations are administered in vagina, the nasal preparations are

425

administered in nose, the sublingual preparations are administered in oral cavity, and the ointments are percutaneously administered topically.

To make the active ingredient of the present invention
5 into a powder form, the ingredient may be pulverized according to usual methods. For example, the active ingredient may be pulverized using lactose, starch or the like, and then stirred to obtain a homogeneous mixture.

Of the administration methods, pulmonary
10 administration (inhalation) is more advantageous than oral administration because lung alveoli are the target organs of the treatment, and direct exposure to the damaged alveolar tissue site is possible, which prevents generalized side effects.

The amount of adiponectin contained in the
15 therapeutic agent of the present invention is not limited, and can be suitably selected from a wide range. Adiponectin is generally contained in an amount of about 0.01 to about 70 wt.%, preferably about 0.1 to about 50 wt.%, and more preferably about
20 0.3 to about 30 wt.% in the pharmaceutical composition.

The amount of the active ingredient to be contained
in the pharmaceutical preparation and the dosage are not particularly limited but can be selected from a broad range according to the desired therapeutic effect, method of
25 administration, treatment period, and patient's age, sex and other conditions. The dosage is usually selected so that the blood concentration of the active ingredient will be preferably about 0.1 to about 500 µg/ml, and more preferably about 1 to about 50 µg/ml. This preparation can be administered
30 once or in a few divided doses a day.

The dosage of the therapeutic agent of the invention
is suitably selected according to the method of use, the patient's age, sex and other conditions, and the severity of the disease. The amount of adiponectin may be usually about
35 0.1 µg to about 20 mg.

43

Advantageous Effects of Invention

The adiponectin-containing agent for inhibiting alveolar airspace enlargement or the adiponectin-containing agent for inhibiting alveolar wall destruction of the present invention possesses an excellent effect of decreasing the deterioration of pulmonary function, such as airflow obstruction, and is highly effective for the treatment of pulmonary disease accompanied by irreversible deterioration in pulmonary function.

The adiponectin-containing agent for inhibiting alveolar airspace enlargement or the adiponectin-containing agent for inhibiting alveolar wall destruction of the present invention is a highly safe drug with fewer adverse side effects such as nausea, vomiting, gastric acid secretion, etc.

Brief Description of Drawings

Fig. 1 is a graph showing that adiponectin has a dose-dependent inhibitory activity on alveolar airspace enlargement caused by progressing destructive changes of alveolar walls.

Fig. 2 shows tissue sections indicating progressing destructive changes of alveolar walls, and the inhibitory activity of adiponectin on progressive alveolar wall destruction.

Description of Embodiments

Preparation Example 1

The pharmaceutical composition of the present invention in the injectable formulation was prepared by adding and mixing 100 µg/mL of human adiponectin (having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1), 0.01 mg/mL of Tween 80 (Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monooleate; Polysorbate 80), 15 mg/mL of dextran 40, 0.1 mg/mL of cysteine, and 1.0 mg/mL of HSA (human serum albumin) in 0.01 M citric acid-sodium citrate buffer (pH 6.0), filtrating the mixture (using a membrane filter of 0.22 µm), then sterilely dispensing the

44

filtrate by 1 mL in a vial, and lyophilizing it. The formulation can be used by dissolving in 1 mL of saline in use.

Preparation Example 2

5 The pharmaceutical composition of the present invention in the injectable formulation was prepared by adding 10 µg/0.1 mL of human adiponectin (having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1), 5 mg of cysteic acid, and 1 mg of human serum albumin (HSA) per vial in distilled water for the
10 injection, filling the resulting solution in one vial by 1 mL and lyophilizing it.

Preparation Example 3

15 The pharmaceutical composition of the present invention in the injectable formulation was prepared by adding 0.5 mg of adiponectin, 80 mg of sodium chloride, 20 mg of mannitol, 34.5 mg of sodium phosphate, and 45 mg of PEG in 10 ml of distilled water for the injection, followed by aseptic filtration, dispensing the filtrate by 1 mL in an aseptic vial,
20 and lyophilizing it.

Reference Example 1

Production of a Recombinant Human Adiponectin

(1) Expression of human adiponectin in *Escherichia coli*

25 1) human adiponectin PCR

 The human adiponectin gene and the amino acid sequence encoded thereby have been deposited with the GenBank under the accession number of NM_004797 and D45371, respectively. The coding region (CDS) is shown as the sequence from 27th to 761st
30 of the nucleotide sequence. Its deduced amino acid sequence is shown in SEQ ID NO:1. In this sequence, the 1st to 14th residues constitute a signal peptide and the 15th to 244th residues represent the mature human adiponectin.

 The human adiponectin gene was amplified by PCR using
35 the plasmid donated by Dr. Funahashi, the Second Department of Internal medicine, Osaka University School of Medicine as

45

a template.

Designing so that the 693bp sequence from 69th to 761st of the nucleotide sequence of the human adiponectin would be amplified with an NdeI site at the 5'-end and a BamHI site at the 3'-end, PCR primers were produced using an automatic DNA synthesizer. The PCR primer sequences are shown in SEQ ID NO:6 (forward) and NO:7 (reverse).

2) Subcloning of the Human Adiponectin (apM1) Gene

The PCR product obtained in the above step 1) was subcloned into pT7 Blue T-Vector (Novagen) and it was confirmed that there was no mutation in its nucleotide sequence (pT7-apM1).

3) Construction of an Expression Vector

The expression vector pET3c (Novagen) was digested with NdeI and BamHI to recover a fragment of approximately 4600 bp. On the other hand, the pT7-apM1 obtained in the above step 1) was digested with NdeI and BamHI to recover a fragment of approximately 700 bp. These fragments were ligated and the expression vector thus obtained was named pET3c-apM1.

4) Expression in *Escherichia coli*

The host *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS was transformed with the pET3c-apM1 constructed in the above step 3) and cultured in 2xT.Y.Amp. (tryptone 16 g, yeast extract 10 g, and NaCl 5 g). When the organism had entered into the logarithmic growth phase, IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside) was added for inducing the production of a recombinant human adiponectin (apM1). The *E. coli* cells before and after this IPTG induction and the inclusion body (the insoluble fraction of *E. coli*) after said IPTG induction were sampled and subjected to SDS-PAGE and Western blotting to confirm the expression of human adiponectin.

76

5) Results and Discussion

The expression product in *E. coli*, obtained in the above manner, was a 230-residue protein corresponding to the ¹⁵Gly to ²⁴⁴Asn, exclusive of the signal sequence, of the amino acid sequence of human adiponectin, with the addition of Met derived from the initiation codon at the N-terminus.

The *E. coli* obtained by the above procedure was analyzed by SDS-PAGE. As a result, an approximately 30 kD band could be confirmed in the *E. coli* cell and inclusion body after IPTG induction.

Then, Western blotting was performed using two kinds of antibodies (polyclonal antibodies (synthetic peptides)). Both antibodies reacted with said approximately 30 kD band, whereas no reaction was detected at all with the host *E. coli*.

The above approximately 30 kD band was excised to investigate the sequence of its 10 amino acid residues at N-terminal. The sequence was the same as the expected sequence, with the deletion of the N-terminal Met having been found in a minor population.

It became clear from the above results that the recombinant human adiponectin had been expressed as an approximately 30 kD protein. Most of the recombinant human adiponectin expressed had been intracellularly accumulated as an inclusion body.

(2) Purification of the Recombinant human adiponectin (apM1) from *E. coli*

Purification of the recombinant human adiponectin from *E. coli* was carried out by the following 5-step procedure.

1) Culture of *E. coli*

The *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen) transformed with the expression vector pET3c-apM1 was precultured in 2xT.Y.Amp.Cm. (tryptone 16 g, yeast extract 10 g, chloramphenicol 25 µg/ml, and NaCl 5 g) (37°C, shake culture). On the following day, the culture was diluted with 100 volumes of 2xT.Y.Amp. and further incubated. After 2 to 3 hours of

47

incubation when the OD550 of the culture fluid had become 0.3 to 0.5, IPTG was added at a final concentration of 0.4 mM for inducing the production of recombinant human adiponectin (apM1). About 3 to 5 hours after addition of IPTG, the culture
5 fluid was centrifuged (5000 rpm, 20 min., 4°C) and the *E. coli* pellet thus obtained was freeze-preserved.

2) Preparation of an Inclusion Body from *E. coli*

The *E. coli* pellet was suspended in 50 mM Tris-HCl
10 (pH 8.0) and treated with lysozyme at 37°C for 1 hour. Then, Triton X-100 (Katayama Kagaku) was added at a final concentration of 0.2%. This solution was sonicated (Branson Sonifier, output control 5, 30 sec.) and centrifuged (12000 rpm, 30 min, 4°C) and the pellet was recovered. This pellet
15 was suspended in 25 ml of 0.2% Triton X-100-supplemented 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and the suspension was sonicated (under the same conditions as above).

The resulting solution was centrifuged and the pellet was washed by the same procedure as above. The pellet thus
20 obtained was taken as the inclusion body.

3) Refolding of the Inclusion Body

The inclusion body was solubilized with a small quantity of 7 M guanidine HCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) and
25 1% 2ME. This solution was added dropwise into 200-fold volume of 2 M urea, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), diluted, and allowed to stand at 4°C for 3 nights.

4) Concentration of the Refolded Solution

The solution after the above refolding was
30 centrifuged (9000 rpm, 30 min, 4°C) and the supernatant was concentrated to about 1/100 by ultrafiltration using an Amicon YM-10 membrane. This concentrate was dialyzed against 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) and the dialysate was filtered through a 0.45
35 µm filter.

48

5) DEAE-5PW Anion-exchange HPLC

The sample obtained in the above step 4) was isolated and purified by anion-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) with DEAE-5PW (Tosoh Corporation). As the starting buffer, 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) was used, and elution was carried out with a NaCl gradient (0→1M NaCl/60 ml) under absorbance monitoring at 280 nm. The eluate was collected in 1 ml fractions and each fraction was analyzed by SDS-PAGE.

6) Results and Discussion

Because the recombinant human adiponectin (apM1) had been expressed as an inclusion body in *E. coli*, its purification was carried out by solubilization and refolding of the inclusion body. As a result, the recombinant human adiponectin was solubilized and separated on the anion-exchange column. The peak fractions (fraction Nos. 30-37) were analyzed by SDS-PAGE. As a result, an approximately 30 kD band was observed. In this analysis, a faint smear band was detected on the background, but as most of the protein was considered to be the recombinant human adiponectin (apM1), this approximately 30 kD band (recombinant human adiponectin) was used as the antigen in the subsequent immunization of rabbits and mice, and the active ingredient of the pulmonary disease therapeutic agents of the invention.

(3) Preparation of Anti-Human Adiponectin Polyclonal and Monoclonal Antibodies

1) Preparation of the Polyclonal Antibody

The recombinant human adiponectin, 100 µg/body, was mixed with complete adjuvant in a 1:1 ratio and 5 rabbits were immunized with the mixture 8 times at 2-week intervals to obtain an anti-human adiponectin polyclonal antibody (Identification codes: OCT9101-OCT9105).

2) Preparation of the Monoclonal Antibody

49

The recombinant human adiponectin, 20 µg/body, was mixed with complete adjuvant in a 1:1 ratio and mice were immunized with the mixture 3 times at 2-week intervals. Then, the final immunization was carried out without the adjuvant 3 days before cell fusion. Cell fusion between the mouse spleen cell and myeloma cell was carried out by the PEG method and the hybridoma was selected in HAT medium.

Screening for a human adiponectin antibody-producing cell line was carried out by ELISA using the antigen (recombinant human adiponectin)-coated immunoplate, and the hybridoma was cloned by the limiting dilution method.

In the above manner, 11 anti-human adiponectin antibody producing hybridoma lines named KOCO9101-KOCO9111 were obtained. One hybridoma, among them, was deposited with the National Institute of Bioscience and Human Technology, the Ministry of International Trade and Industry, Japan (NIBH, Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan) as of Jun. 8, 1998 (original deposit date) (the identification code assigned by the depositor: KOCO9108) and the demand for conversion to the deposit under Budapest Treaty was filed as of Oct. 7, 1998. The accession number of the final deposit is FERM BP-6542.

The hybridomas as single clones were respectively administered intraperitoneally to mice treated with pristane in advance and the ascites fluid was harvested (Identification codes: ANOC9101-9111).

3) Purification of Antibodies

The rabbit antiserum (polyclonal antibody) and mouse ascites fluid (monoclonal antibody) were respectively purified using a protein A column.

4) Expression of human adiponectin in Animal Cells

The cDNA of the adiponectin was excised with EcoRI and inserted into the EcoRI site of the expression vector pCIneo (Promega Corp.). The COS-1 cell (ATCC CRL1650) was transfected with the above pCIneo-human adiponectin using LlipofectAMINE

(GIBCO BRL), and the culture supernatant and the cells were harvested after 72 hours.

5) Western Blotting of Human Adiponectin

5 First, the adipose tissue extract, COS-1 cells, COS-1 cell culture supernatant, healthy human plasma, and recombinant human adiponectin were subjected to 2 ME(+) SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane.

10 This membrane was reacted with the anti-human adiponectin monoclonal antibody (ANOC9104) and, then, with the HRP-labeled antibody, and detection was carried out with ECL (Western blot detecting reagent, Amersham).

15 As a result, an approximately 35 kD band was detected for the adipose tissue extract, pCIneo-human adiponectin/COS-1 cell, and healthy human plasma, but was not observed for pCIneo/COS-1 cell or pCIneo/COS-1 cell culture supernatant.

20 With the culture supernatant of pCIneo-human adiponectin/COS-1 cells, a 35 kD band could be confirmed although it was too weak in intensity to be readily discernible.

Reference Example 2

25 CHO cells that express N terminal His-Tag fusion mouse adiponectin (clone No. 5) were cultured on a large scale, and the resulting supernatant was collected. Using a Ni-NTA Resin, His-tagged adiponectin was purified.

Reference Example 3

30 The full-length DNA, as shown in SEQ NO: 5, of mouse adiponectin was integrated into an expression vector and expressed in *E. coli*, providing a large amount of expressed mouse adiponectin. The supernatant of disrupted *E. coli* was applied to a DEAE-Sepharose open column, and elution was performed using a gradient from 0M to 1M NaCl. The eluted
35 fractions were then collected and subjected to fractionation with 30% saturated ammonium sulfate. The supernatant was

51

applied to a Butyl-Toyoppearl open column, and elution was performed with a gradient from 30% to 0% saturated ammonium sulfate. Finally, gel filtration was carried out to purify the mouse adiponectin.

5

Example 1

Using model mice (C57BL/6J) that had developed a lung disorder as a result of elastase treatment, adiponectin was examined for therapeutic effects on chronic obstructive pulmonary disease characterized by irreversible airflow limitation.

Once alveolar walls of the model mouse were destroyed by a one-time intratracheal administration of elastase, the alveolar wall destruction chronically continued thereafter, expanding emphysema lesions (control in Fig. 2). Such changes are indicated by mean linear intercept, which is a generally used evaluation index (Dunnill. M.S. Thorax (1962) 17, p320-328). The degree of alveolar wall destruction is evaluated by measuring the size of individual alveoli.

Thus, in the model mouse, the elastase treatment causes alveolar wall destruction, thereby resulting in expansion of the alveolar diameter, which is equivalent to emphysema lesions and pulmonary function impairment.

One-time intratracheal administration of elastase to mice resulted in the destruction of alveolar walls and a consequential breakdown of blood vessels, causing transient bleeding and neutrophil infiltration in the alveoli; however, this inflammation disappeared in three days. Therefore, in the experiment, it can be verified that the effect of adiponectin is not derived from elastase inhibitory action.

Female 6 or 7-week-old mice (C57BL/6L, Japan Charles River Co., Ltd.) were assigned to 4 groups (A to D, 6 mice per group) based on body weight using stratified randomization (SAS Institute Japan, R8.1), as shown in Table 1. Each mouse was subjected to pentobarbital anesthesia.

525

Table 1

Group	Elastase treatment	Administration substance (Concentration)	Dose of adiponectin (mg/mouse) (50 μ l)	Number of mice
A	Not performed	-	-	6
B	Performed	Normal saline solution	-	6
C	Performed	Adiponectin (0.02 mg/ml)	0.001	6
D	Performed	Adiponectin (0.2 mg/ml)	0.01	6

5 Subsequently, using a sprayer (a product of Penn Century Inc.), normal saline solution (Otsuka normal saline, produced by Otsuka Pharmaceutical Factory Inc.) and human neutrophil elastase (produced by Elastin Products Co., Inc.) were intratracheally administered via the larynx to the mice
10 in Group A and the mice in Groups B to D, respectively, in a volume of 50 μ l/mouse. The dosage of elastase was 20U/mouse. From three days after the intratracheal elastase administration, adiponectin was intratracheally administered once a day for 18 days to the mice in Group C at a dose of 0.001
15 mg/mouse and to the mice in Group D at a dose of 0.01 mg/mouse. The adiponectin used in the administration was obtained by dissolving in a solvent (50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 0.5M NaCl) CHO cell-derived mouse adiponectin obtained in Reference Example 2 above. The adiponectin was diluted with a suitable
20 amount of normal saline solution to a concentration of 0.2 mg/ml or 0.02 mg/ml in use. The solutions at each concentration were divided into daily dosage units, and freeze-preserved at -20°C until the date of administration. At the time of use, the frozen solution was thawed. In the elastase control group

53

(Group B), normal saline solution was administered in place of adiponectin for the same period. Adiponectin or normal saline solution was intratracheally administered via the larynx to a mouse under isoflurane inhalation anesthesia at a volume of 50 μ l/mouse using a sprayer. After 18 days of continuous intratracheal administration, each mouse was euthanized by bleeding from the abdominal aorta under isoflurane inhalation anesthesia. The lung was extirpated and subjected to perfusion fixation with a 10% neutral buffered formalin solution. The fixed-lung tissue was then subjected to paraffin embedding, thin sectioning, Masson Trichrome staining, and HE staining at a Bio Pathology Institute Co., Ltd. Pathology tissue was evaluated by measuring the mean linear intercept, which is an objective indicator of alveolar damage.

The mean linear intercept (Lm) was calculated using the formula: $Lm = N \times L / m$, wherein N is the number of transversal lines, L is the length of a transversal line, and m is the total number of alveolar walls intersecting with the transversal lines.

Statistical Analysis

To examine the activities of the drugs, Dunnett's test was performed by comparing the elastase control group (Group B) with Groups C and D. Each test was conducted in accordance with the two-tailed test, and the significance level was set at 5%. The test was performed using SAS software (SAS Institute Japan, R8.1). The results are shown in Fig. 1.

The measured linear intercept was $152.5 \pm 14.7 \mu$ m in Group B, while $115.2 \pm 17.3 \mu$ m in Group C and $81.7 \pm 20.4 \mu$ m in Group D. Significant inhibitory activities were demonstrated in accordance with the dosage of adiponectin (Mean $\pm$ S.D., $P < 0.05$). In Group A, the linear intercept was $73.0 \pm 6.6 \mu$ m.

The results reveal that the continuous pulmonary administration of adiponectin has the dose-dependent activity

54

of reducing the increase in mean linear intercept caused by elastase treatment.

Specifically, it was confirmed that the continuous administration of adiponectin suppressed alveolar airspace enlargement caused by progressing destructive changes of alveolar walls.

Fig. 2 shows tissue sections that indicate progressing destructive changes of alveolar walls. This reveals that the progressing alveolar wall destruction in groups receiving continuous administration of adiponectin (Groups C and D) is obviously more inhibited than that in the control group (Group B), and this inhibitory activity is greater in Group D.

Specifically, it was confirmed that the continuous administration of adiponectin suppressed the development of destructive changes of alveolar walls.

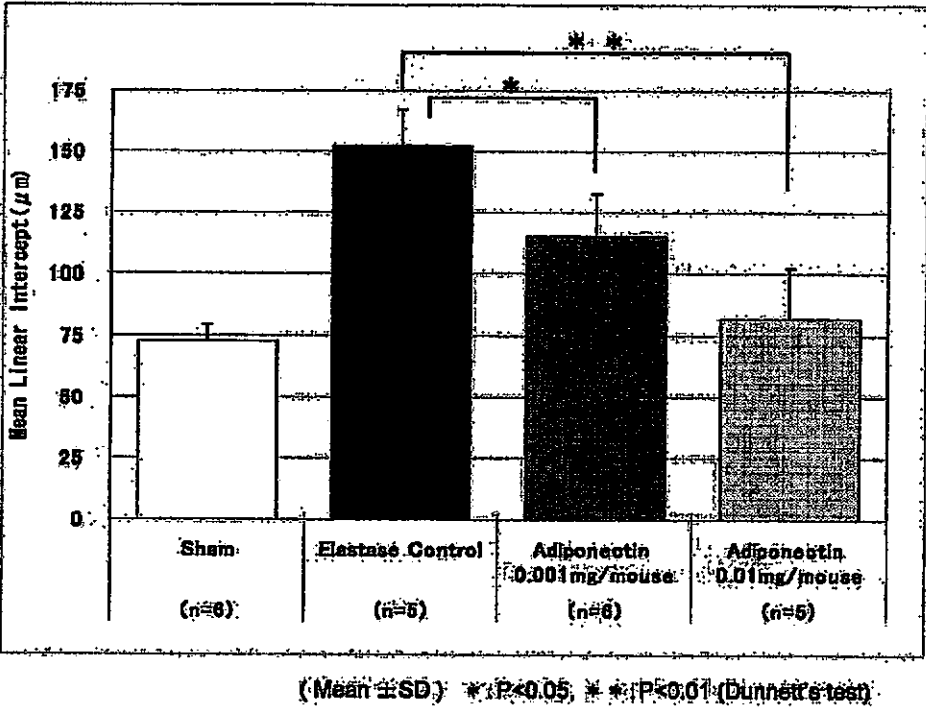
SS

CLAIMS

- [Claim 1] An agent for inhibiting alveolar airspace enlargement, comprising adiponectin.
- 5 [Claim 2] The agent according to Claim 1, wherein the adiponectin is contained in an amount of 0.01 to 70 wt.%.
- [Claim 3] An agent for inhibiting alveolar wall destruction, comprising adiponectin.
- 10 [Claim 4] The agent according to Claim 3, wherein the adiponectin is contained in an amount of 0.01 to 70 wt.%.

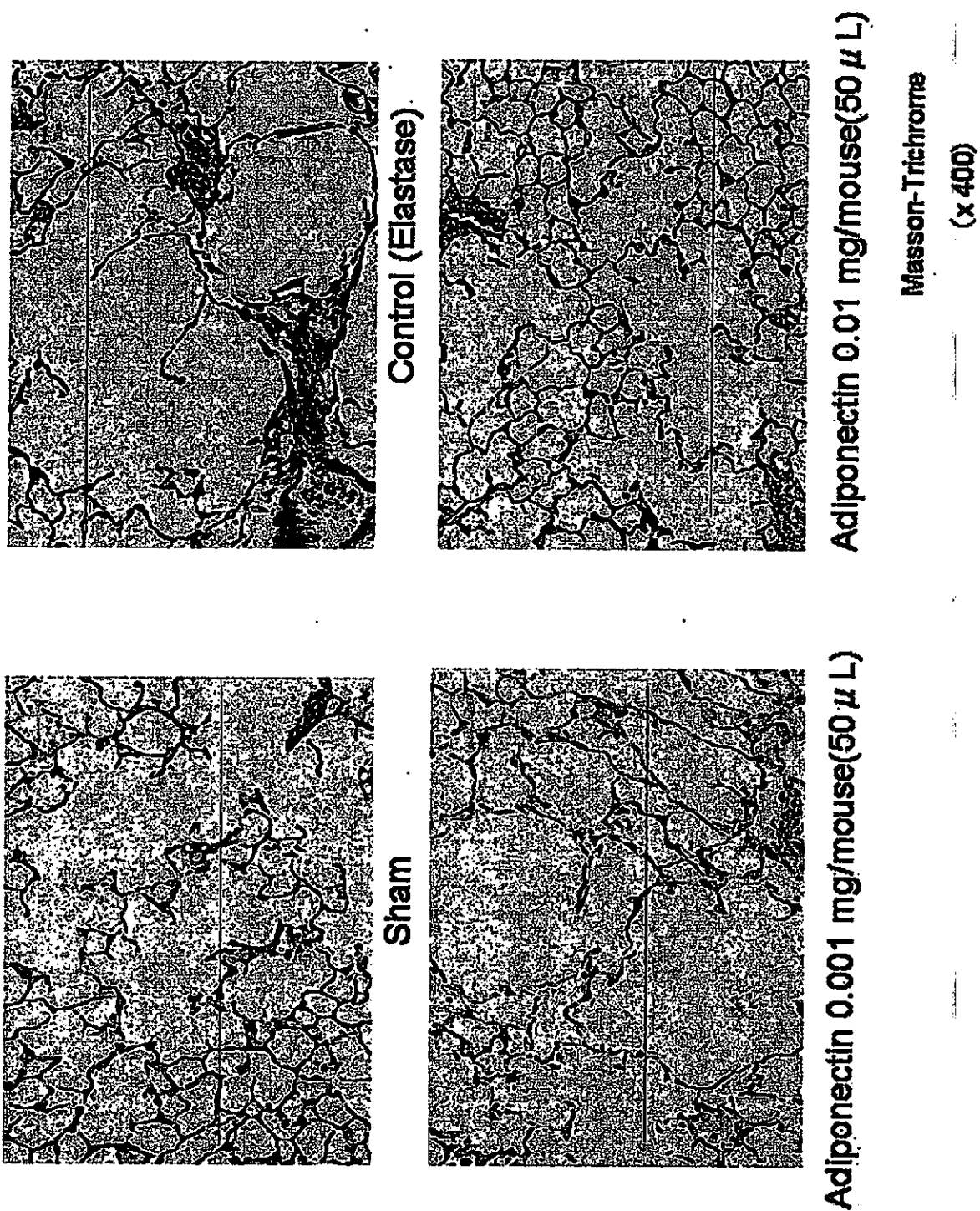
56

[Fig. 1]



57

[Fig.2]



SEQUENCE LISTING

<110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
<120> AGENT FOR TREATING PULMONARY DISEASE
<130> P09-96
<150> JP 2008-217721
<151> 2008-8-27
<160> 7
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 244
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 1
Met Leu Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gly His
1 5 10 15
Asp Gln Glu Thr Thr Thr Gln Gly Pro Gly Val Leu Leu Pro Leu Pro
20 25 30
Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly
35 40 45
His Asn Gly Ala Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu
50 55 60
Lys Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Leu Ile Gly Pro Lys Gly Asp Ile
65 70 75 80
Gly Glu Thr Gly Val Pro Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly
85 90 95
Ile Gln Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Gly Ala Tyr Val Tyr Arg
100 105 110
Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Tyr Val Thr Ile Pro Asn Met
115 120 125
Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp
130 135 140
Gly Ser Thr Gly Lys Phe His Cys Asn Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe
145 150 155 160
Ala Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe
165 170 175
Lys Lys Asp Lys Ala Met Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Asn
180 185 190
Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu Glu Val Gly
195 200 205
Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Glu Gly Glu Arg Asn Gly Leu
210 215 220
Tyr Ala Asp Asn Asp Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr
225 230 235 240
His Asp Thr Asn

<210> 2
<211> 735
<212> DNA
<213> homo sapiens
<220>
<221> CDS
<308> Genbank No. D45371
<400> 2
atgctgttgc tgggagctgt tctactgcta ttagctctgc ccgggcatga ccaggaaacc 60
acgactcaag ggcccggagt cctgcttccc ctgcccaagg gggcctgcac aggttggatg 120
gcccgcaccc caggccatcc gggccataat ggggcccag gcogtgatgg cagagatggc 180
acccctggtg agaagggtga gaaaggagat ccaggcttta ttggtcctaa gggagacatc 240
ggtgaaaccg gactaaccgg ggtgaagggt ccccgagggt ttcggggaat ccaaggcagg 300
aaaggagaac ctggagaagg tgcttatgta taccgctcag cattcagtgt gggattggag 360
aattacgita ctatcccaa catgccatt cgcttacca agatcttcta caatcagcaa 420
aaccactatg atggtccac tggtaaattc cactgcaaca ttctgggtgt gtactacttt 480

59

2/3

gcctaccaca tcacagtcta tatgaaggat gtgaaggatca gcctcttcaa gaaggacaag 540
gctatgctct tcacotatga tcagtaccag gaaaataatg tggaccaggc ctccggctct 600
gtgctctgco atotggaggt gggcgaccaa gtctggotco aggtgtatgg ggaaggagag 660
cgtaatggac totatgtga taatgacaat gactccacct tcacaggctt tcttctctac 720
catgacacca actga 735

<210> 3
<211> 247
<212> PRT
<213> Mouse
<400> 3

Met Leu Leu Leu Gln Ala Leu Leu Phe Leu Leu Ile Leu Pro Ser His
1 5 10 15
Ala Glu Asp Asp Val Thr Thr Thr Glu Glu Leu Ala Pro Ala Leu Val
20 25 30
Pro Pro Pro Lys Gly Thr Cys Ala Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly
35 40 45
Ile Pro Gly Ile His Val Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly
50 55 60
Thr Pro Gly Glu Lys Gly Glu Lys Gly Asp Ala Gly Leu Leu Gly Pro
65 70 75 80
Lys Gly Glu Thr Gly Asp Val Gly Met Thr Gly Ala Glu Gly Pro Arg
85 90 95
Gly Phe Pro Gly Thr Pro Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Ala Ala
100 105 110
Tyr Val Tyr Arg Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Arg Val Thr
115 120 125
Val Pro Asn Val Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln
130 135 140
Asn His Tyr Asp Gly Ser Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Asn Ile Pro Gly
145 150 155 160
Leu Tyr Tyr Phe Ser Tyr His Ile Thr Trp Met Lys Asp Val Lys Val
165 170 175
Ser Leu Phe Lys Lys Asp Lys Ala Val Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr
180 185 190
Gln Glu Lys Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu
195 200 205
Glu Val Gly Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Asp Gly Asp His
210 215 220
Asn Gly Leu Tyr Ala Asp Asn Val Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe
225 230 235 240
Leu Leu Tyr His Asp Thr Asn
245

<210> 4
<211> 744
<212> DNA
<213> Mouse
<220>
<221> CDS
<400> 4

atgctactgt tgaagctct cctgttcttc ttaatcctgc coagtoatgc ogaagatgac 60
gttactacaa otgaagagct agctcctgct ttggtccctc caaccaaggg aacttgtgca 120
ggttggatgg caggcatccc aggacatcct ggccacaatg gcacaccagg ccgtgatggc 180
agagatggca ctcttgagga gaaggagag aaaggagatg caggtottct tggctctaag 240
ggtgagacag gagatgttg aatgacagga gctgaagggc cacggggctt cccgggaacc 300
cctggcagga aaggagagcc tggagaagcc gcttatgtgt atcgtcagc gticagtgtg 360
gggtgggaga cccgogtoac tgttcccaat gtaccattc gotttaotaa gatottctac 420
aaccaacaga atcattatga cggcagcaat ggcaagttct actgcaacat tccgggactc 480
tactacttct ctaccacat caoggtgtac atgaaagatg tgaaggtag cotottcaag 540
aaggacaagg ccgttctctt cactacagac cagtatcagg aaaagaatgt ggaccaggcc 600
totggctctg tgcctctcca totggagggt ggagaccaag tctggctcca ggtgtatggg 660
gatggggacc acaatggact ctatgcagat aacgtcaacg actctacatt tactggctt 720

cttctctacc atgataccaa ctga

<210> 5
<211> 1276
<212> DNA
<213> Mouse
<220>
<221> CDS
<222> (39) ... (782)
<400> 5

otctaagat tgcagtggg tctgacgaca ccaaaagggc tcaggatgct actgttgcaa 60
gctctctgt tctctttaa cctgccagat catgccgaag atgacgttac tacaactgaa 120
gagctagctc ctgctttggt ootccaccc aagggaaacti gtgcagggtg gatggcaggc 180
atccoaggac atoctggcca caatggcaca ccaggccgtg atggoagaga tggcactcot 240
ggagagaagg gagagaaagg agatgcaggc cttcttggtc ctaagggtga gacaggagat 300
gttgaatga caggagctga agggccaagg ggttccccc gaaccctgg caggaaagga 360
gagcctggag aagcogctta tatgtatgc tcagcgtica gtgtggggct ggagaccgc 420
gtactgttc ccaatgtacc cattcgcttt actaagatct tctacaacca acagaatcat 480
tatgaogga gcactggcaa gttctactgc aacattcogg gactctacta cttctottac 540
cacatcacgg tgtacatgaa agatgtgaag gtgagcctct tcaagaagga caaggccgt 600
ctcttoacot acgaccagta tcaggaaaag aatgtggacc aggcctcttg ctctgtgctc 660
ctccatctgg aggtgggaga ccaagtctgg ctccagggtg atggggatgg ggaccacaat 720
ggactotatg cagataacgt caacgactct acatttactg gcttictct ctaccatgat 780
accaactgac tgcaactacc catagcccat acaccaggag aatcatggaa cagtgcacac 840
acttcagct tagtttgaga gattgatit attgcttagt ttgagagtc tgagtattat 900
ccacacgtgt actcactgt tcatataacg acittataaa aaataatttg tgttctagt 960
ccagaaaaaa aggcactccc tggctccac gactcttaca tggtagcaat aacagaatga 1020
aatcacatt tggtagggg gottcacaat attgcatga ctgtctggaa gtagaccatg 1080
ctattttct gctcactgta cacaatatt gtacacataa accotataat gtaaatatga 1140
aatcacgta ttaacttct cacaggctga gtgtatgaat gtctaaagac ccataagtat 1200
taaagtgtg gggataaatt ggaaaaaaa aaaaaaaaa agaaaaacti tagagcacac 1260
tggogccgt tactag 1276

<210> 6
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<223> Oligonucleotide as primer (forward) sequence for adiponectin
<400> 6
aacatatggg gcatgaccag gaaaccacg 29

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<223> Oligonucleotide as primer (reverse) sequence for adiponectin
<400> 7
aaggatcctc agttggtgct atggtagag 29

DESCRIPCIÓN

ADIPONECTINA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD PULMONAR

Campo técnico

5

La presente invención se relaciona con un agente para tratar enfermedades pulmonares que inhiben el aumento anormal del espacio aéreo alveolar asociado con cambios destructivos de las paredes alveolares originados por lesión crónica de las mismas y/o que inhibe cambios destructivos de las paredes alveolares.

10

Técnica anterior

Varias enfermedades pulmonares conocidas (PD) incluyen bronquitis aguda debido a inflamación aguda originada por virus o bacterias; asma bronquial principalmente
15 originada por la respuesta inflamatoria del tracto respiratorio debido a eosinófilos; neumonía intersticial originada por inflamación epitelial alveolar; carcinoma broncopulmonar originado por células de cáncer; y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), que se conoce como una enfermedad caracterizada por inflamación crónica pulmonar originada por varios factores, especialmente fumar, que conduce a la
20 destrucción de la pared alveolar e hipertrofia de la glándula mucosa bronquial que resulta en disnea, tos y esputo incrementado, etc. Particularmente, una enfermedad anteriormente llamada enfisema frecuentemente complica una enfermedad anteriormente llamada bronquitis crónica en varios grados. Hoy, la enfermedad pulmonar obstructiva que se relaciona con estas dos enfermedades que se conocen como COPD.

25

Se dice que el COPD se caracteriza por el desarrollo progresivo de la limitación del flujo de aire (obstrucción de las vías respiratorias) (Documento diferente de patente 1).

30

A diferencia la bronquitis crónica no similar en la que la hipersecreción y la infección del tracto respiratorio no involucran limitación del flujo de aire, se considera la limitación del flujo de aire irreversible que resulta de las lesiones de las vías respiratorias periféricas. Tales enfermedades pulmonares incluyen, en adición a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica mencionada anteriormente que incluye enfisema y bronquitis
35 crónica, fibrosis quística, bronquiectasis, tuberculosis, neumoconiosis, y similares.

40

A la fecha, con respecto a la terapia de fármaco para la enfermedad pulmonar, que incluye el COPD acompañado por la limitación del flujo de aire irreversible, se utilizan los fármacos tales como estimulantes β_2 , agentes anticolinérgicos y similares que tienen actividad broncodilatadora para evitar o suprimir temporalmente los síntomas. Sin

embargo, estos fármacos que tienen actividad broncodilatadora no pueden reducir, durante un largo periodo, el deterioro de la función pulmonar, que es el indicador clínico más importante.

5 Muchos estudios clínicos a gran escala han examinado los efectos de la terapia utilizando, como inhalantes, esteroides que tiene un efecto inhibidor potente en la producción de citoquinas; sin embargo, varios documentos han reportado que los esteroides no pueden reducir el deterioro de la función pulmonar durante un largo periodo (ver Documentos de no patente 2 a 4).

10

Con respecto a los efectos de la terapia PD utilizando los fármacos que tienen efectos inhibidores en la producción de oxígeno activo, no se han conducido estudios clínicos fiables.

15

De acuerdo con un estudio clínico, la N-acetilcisteína, un antioxidante que se considera tiene un mecanismo de acción similar al de los agentes para inhibir la producción de oxígeno activo, puede reducir la frecuencia de exacerbación aguda del COPD (Documento diferente de patente 5). Sin embargo, ninguno de los documentos han reportado que la N-acetilcisteína exhibe un efecto en la reducción del deterioro de la

20

función pulmonar durante un largo periodo.

Adicionalmente, para el tratamiento del PD, se ha discutido el uso de los fármacos que inhiben la actividad fosfodiesterasa IV. Sin embargo, se reporta que estos fármacos tienen efectos colaterales adversos tal como náusea, vómito y secreción de ácido gástrico

25

(Documento diferente de patente 6).

Como se describió anteriormente, no se han desarrollado fármacos que alcancen desarrollo satisfactorio como un fármaco para tratar enfermedad pulmonar crónica, y que reduzcan el deterioro irreversible de la función pulmonar, es decir, que inhiban el aumento

30

anormal del espacio aéreo alveolar asociado con cambios destructivos de las paredes alveolares debido a lesión crónica de las mismas y/o que inhiben cambios destructivos de las paredes alveolares.

Lista de Citación

35

Bibliografía de Patentes

PTL 1: WO1996/39429

PTL 2: WO1999/21577

PTL 3: Patente Japonesa No. 3018186

PTL 4: Patente Japonesa No. 4147220

40

PTL 5: Patente Japonesa no Examinada No. 2004-16074

Bibliografía diferente a Patentes

NPL 1: Pauwell, R.A.et.al, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2001 (163), 1256-1276

NPL 2: Pauwels RA, Lodahl CG, Laitinen LA, Schouten JP, Postma DS, Pride NB, et al. N. Engl. J. Med., 1999 (340), 1948-1953

5 NPL 3: Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P, Viskum K, Lancet, 1999 (353) 1819-1823

NPL 4: Burge PS, Calverley PM, Jones PW, Spencer S, Anderson JA, Maslen TK, BMJ, 2000 (320), 1297-1303

10 NPL 5: C. Stey, J. Steurer, S. Bachmann, T. C. Medici, M. R. Tramer, Eur. Respir. J., 2000 (16), 253-262

NPL 6: Peter J. Barnes, N. Engl. J. Med., 2000 (343) No.4, 269-280

NPL 7: Maeda, K. et al., Biochem.Biophys. Res. Commun., 1996 (221), 286-289

Resumen de la invención

Problema Técnico

15

El objeto de la presente invención es proporcionar un fármaco altamente seguro que es útil para tratar un paciente con enfermedad pulmonar cuya función pulmonar se deteriora irreversiblemente.

20

Solución al Problema

Los actuales inventores preparan un modelo animal que exhibe características clínicamente patogénicas muy similares a COPD acompañadas por el deterioro irreversible en la función pulmonar, y que conducen a investigación extensiva utilizando este modelo animal. Como un resultado, ellos encuentran que la adiponectina, que se conoce como una proteína secretora similar a colágeno específicamente secretada de células adiposas, inhibe el enfisema pulmonar y los trastornos de la función pulmonar originados por tratamiento con elastasa, y que llega a ser un agente terapéutico novedoso altamente seguro que exhibe un efecto extremadamente alto para tratar la enfermedad pulmonar acompañada por el deterioro irreversible en la función pulmonar, con pocos efectos colaterales adversos tal como náusea, vómito, y secreción de ácido gástrico. La presente invención se realiza con base en tales hallazgos.

La presente invención proporciona un agente que contiene adiponectina para inhibir el aumento del espacio aéreo alveolar, y un agente que contiene adiponectina para inhibir la destrucción de la pared alveolar.

Ítem 1. Un agente para inhibir el aumento del espacio aéreo alveolar, que comprende adiponectina.

40

Bibliografía diferente a Patentes

NPL 1: Pauwell, R.A.et.al, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2001 (163), 1256-1276

NPL 2: Pauwels RA, Lodahl CG, Laitinen LA, Schouten JP, Postma DS, Pride NB, et al. N. Engl. J. Med., 1999 (340), 1948-1953

5 NPL 3: Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P, Viskum K, Lancet, 1999 (353) 1819-1823

NPL 4: Burge PS, Calverley PM, Jones PW, Spencer S, Anderson JA, Maslen TK, BMJ, 2000 (320), 1297-1303

10 NPL 5: C. Stey, J. Steurer, S. Bachmann, T. C. Medici, M. R. Tramer, Eur. Respir. J., 2000 (16), 253-262

NPL 6: Peter J. Barnes, N. Engl. J. Med., 2000 (343) No.4, 269-280

NPL 7: Maeda, K. et al., Biochem.Biophys. Res. Commun., 1996 (221), 286-289

Resumen de la invención

Problema Técnico

15

El objeto de la presente invención es proporcionar un fármaco altamente seguro que es útil para tratar un paciente con enfermedad pulmonar cuya función pulmonar se deteriora irreversiblemente.

20

Solución al Problema

Los actuales inventores preparan un modelo animal que exhibe características clínicamente patogénicas muy similares a COPD acompañadas por el deterioro irreversible en la función pulmonar, y que conducen a investigación extensiva utilizando este modelo animal. Como un resultado, ellos encuentran que la adiponectina, que se conoce como una proteína secretora similar a colágeno específicamente secretada de células adiposas, inhibe el enfisema pulmonar y los trastornos de la función pulmonar originados por tratamiento con elastasa, y que llega a ser un agente terapéutico novedoso altamente seguro que exhibe un efecto extremadamente alto para tratar la enfermedad pulmonar acompañada por el deterioro irreversible en la función pulmonar, con pocos efectos colaterales adversos tal como náusea, vómito, y secreción de ácido gástrico. La presente invención se realiza con base en tales hallazgos.

La presente invención proporciona un agente que contiene adiponectina para inhibir el aumento del espacio aéreo alveolar, y un agente que contiene adiponectina para inhibir la destrucción de la pared alveolar.

Ítem 1. Un agente para inhibir el aumento del espacio aéreo alveolar, que comprende adiponectina.

40

64

Ítem 2. El agente de acuerdo con el Ítem 1, en donde la adiponectina está contenida en una cantidad efectiva para inhibir el aumento del espacio aéreo alveolar asociado con un cambio destructivo de una pared alveolar.

5 Ítem 3. El agente de acuerdo con el Ítem 1 o 2, en donde la adiponectina está contenida en una cantidad de 0.01 a 70 % en peso.

Ítem 4. El agente de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems 1 a 3, para uso en el tratamiento de enfisema, bronquitis crónica, fibrosis quística, bronquiectasis, tuberculosis,
10 neumoconiosis, o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Ítem 5. Un agente para inhibir la destrucción de la pared alveolar, que comprende adiponectina.

15 Ítem 6. El agente de acuerdo con el Ítem 5, en donde la adiponectina está contenida en una cantidad efectiva para inhibir un cambio destructivo de una pared alveolar.

Ítem 7. El agente de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems 5 o 6, en donde la
20 adiponectina está contenida en una cantidad de 0.01 a 70 % en peso.

Ítem 8. El agente de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems 5 a 7, para uso en el tratamiento de enfisema, bronquitis crónica, fibrosis quística, bronquiectasis, tuberculosis, neumoconiosis, o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

25

El agente para inhibir el aumento del espacio aéreo alveolar de la presente invención contiene adiponectina en una cantidad efectiva para inhibir el aumento del espacio aéreo alveolar asociado con cambios destructivos de las paredes alveolares, y el agente para inhibir la destrucción de la pared alveolar de la presente invención contiene
30 adiponectina en una cantidad efectiva para inhibir la destrucción de la pared alveolar.

La adiponectina, que es un ingrediente activo del agente para inhibir el aumento del espacio aéreo alveolar o el agente para inhibir la destrucción de la pared alveolar de la presente invención, es una proteína similar a colágeno secretada de células adiposas.

35

La adiponectina, que es un ingrediente activo del agente para inhibir el aumento del espacio aéreo alveolar o el agente para inhibir la destrucción de la pared alveolar (abreviado aquí adelante como "agentes terapéuticos para enfermedad pulmonar") de la presente invención, es una sustancia bien conocida y fácilmente disponible. La
40 adiponectina comercialmente disponible o la adiponectina preparada por el método

65

conocido mostrada en el ejemplo de referencia descrito más adelante se puede utilizar generalmente en la invención.

Se describen los genes de adiponectina de humano y ratón en el Documento de patente 1 como Acrp30 humano y Acrp30 de ratón, y se describe la adiponectina humana como apM1 en el Documento diferente de patente 7 y Documento de patente 2. La secuencia de aminoácido estimada del polipéptido adiponectina utilizado en los agentes terapéuticos para enfermedad pulmonar de la presente invención como un ingrediente activo se describe en el Documento de patente 2; sin embargo, el Documento de patente 2 solamente se refiere al efecto inhibidor del polipéptido en el aumento celular de músculo liso, y su disponibilidad como un agente para evitar o mejorar la arteriosclerosis, un agente para evitar o tratar reestenosis después de angioplastia, y un agente antiinflamatorio.

Adicionalmente, el Documento de patente 3 muestra la utilidad de la adiponectina, que suprime, sin macrófagos o linfocitos, el aumento clónico de células progenitoras monocitoides de médula relativamente maduras en la etapa de diferenciación, como un agente antiinflamatorio y un supresor de propagación para la célula monocitoide. Más aún, el Documento de patente 4 enseña que el dominio esférico lateral de terminal C de adiponectina (que corresponde a las secuencias de aminoácido SEQ ID NOs: 114 a 239 de adiponectina humana, y las secuencias de aminoácido SEQ ID NOs: 111 a 242 de adiponectina de ratón) tiene el efecto de disminuir la expresión A del receptor secuestrante, y se puede utilizar como un agente preventivo y terapéutico para la arteriosclerosis. De forma similar, el Documento de patente 5 se refiere a la disponibilidad del dominio esférico lateral de terminal C de adiponectina como un activador quinasa de proteína activada con AMP.

Las siguientes adiponectinas están disponibles comercialmente de Bio Vendor (Checoslovaquia; <http://www.biovendor.com/products/proteins>): adiponectina recombinante globular (Adiponectina Globular Humana (E. coli)), adiponectina recombinante producida de E. coli (Adiponectina Humana E. coli His), adiponectina recombinante producida de células de riñón embrionarias humanas (Adiponectina Humana Etiqueta HEK293), adiponectina recombinante trimérica producida de células de riñón embrionarias humanas (Forma de Adiponectina Trimérica Humana (HEK)), adiponectina de alto y bajo peso molecular producida de células de riñón embrionarias humanas (Adiponectina LMW y MMW humana rica en oligómero (HEK)), adiponectina de alto y medio peso molecular producida de células de riñón embrionarias humanas (Adiponectina MMW y HMW humano rico en oligómero (HEK)), etc.

Un ejemplo específico del polipéptido utilizado en los agentes terapéuticos para

enfermedad pulmonar de la presente invención como un ingrediente activo es un polipéptido conocido como "adiponectina", codificado por el producto PCR y mostrado en los ejemplos descritos más adelante. La secuencia de ADN de longitud completa de adiponectina humana es 4,517 bp en longitud, y la secuencia de ADN que codifica un
5 cuadro de lectura abierto (ORF) es 732 bp en longitud, como se muestra en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácido codificada por el ORF se compone de 244 secuencias de aminoácido, como se muestra en la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de gen se ha registrado como el número de acceso GenBank NM_004797. Adicionalmente, la secuencia de ADN de longitud completa de adiponectina de ratón es 1,276 bp en longitud,
10 como se muestra en SEQ ID NO: 5, y la secuencia de ADN que codifica ORF es 741 bp en longitud, como se muestra en SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácido codificada por el ORF se compone de 247 secuencias de aminoácido, como se muestra en la SEQ ID NO: 3, y la secuencia de gen se ha registrado como el número de acceso GenBank AF304466. Más aún, se ha reconocido la expresión de gen de adiponectina humana y de
15 ratón específica para el tejido adiposo.

La homología de la secuencia de aminoácido entre la adiponectina humana y la adiponectina de ratón es 83.61%, y la homología de la secuencia de ADN del ORF es 79.78%. Tal un alto nivel notable de homología implica que ambas tienen la misma
20 actividad.

Los actuales inventores encuentran que la adiponectina inhibe el aumento anormal del espacio aéreo alveolar asociado con cambios destructivos de las paredes alveolares debido a lesión crónica, o exhibe el mejoramiento de la función pulmonar alcanzada al
25 inhibir cambios destructivos de las paredes alveolares, y ellos concluyen que la adiponectina se puede utilizar preferidamente como un fármaco.

Como se describió anteriormente, ya que la adiponectina puede inhibir el aumento anormal del espacio aéreo alveolar asociado con cambios destructivos de las paredes
30 alveolares debido a lesión crónica, se puede utilizar para tratar enfermedades pulmonares tales como enfisema, bronquitis crónica, fibrosis quística, bronquiectasis, tuberculosis, neumoconiosis, y COPD.

Documento de patente 1: WO1996/39429

35 Documento de patente 2: WO1999/21577

Documento diferente de patente 7: Maeda, K. et al., B.B.R.C., (1996) Vol. 221 No.2, pp286-289

Se describen ahora la producción de adiponectina para uso como el ingrediente
40 activo de los agentes terapéuticos para enfermedad pulmonar de la invención, y la

preparación de los agentes terapéuticos para enfermedad pulmonar utilizando adiponectina como un ingrediente activo, etc.

La designación de los aminoácidos, péptidos, secuencias de nucleótido, ácidos nucleicos, etc. mediante las abreviaturas en esta especificación está en conformidad con las reglas de la nomenclatura recomendadas por IUPAC-IUB (IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138, 9(1984)), "The Guidelines for Drafting of Specifications Etc. Containig Nucleotide Sequence or Amino Acid Sequence Information" (Editado por la Oficina de Patentes japonesa, (Julio, 1998) y las convenciones en el campo relevante de la técnica.

Se puede proporcionar adiponectina en la forma de una proteína recombinante mediante las técnicas de ingeniería genética establecidas [por ejemplo Science, 224, 1431(1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692(1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 5990 (1983)]. En este caso, como se puede utilizar como el gen adiponectina (apM1), el gen que se establece previamente por los actuales inventores [Biochem. Biophys. Res. Commun., 221, 286-289 (1996)].

Como una alternativa, se puede producir adiponectina por el método convencional para la síntesis química de acuerdo con la información en la secuencia de aminoácido codificada por dicho gen.

La producción de adiponectina mediante una técnica de ingeniería genética se puede desarrollar de acuerdo con un método descrito en el Ejemplo de Referencia 1 adelante. Más específicamente, la producción comprende construir un ADN recombinante con el que el gen codifica la proteína objetiva se puede expresar en una célula anfitriona, introducir el ADN en la célula anfitriona para obtener un transformante y cultivar el transformante.

En la especificación, un polinucleótido (Molécula de ADN) abarca no solo ADN bicatenario pero también el ADN monocatenario que incluye cadenas codificantes y cadenas anticodificantes que las componen, y no se limita a una longitud de las mismas. Por lo tanto, el polinucleótido que codifica la adiponectina incluye el ADN bicatenario que incluye ADN genómico y el ADN monocatenario (cadena codificante) que incluye cADN y el ADN monocatenario (cadena anticodificante) que tiene la secuencia complementaria para la cadena codificante y los fragmentos de ADN sintéticos de las mismas a menos que se mencione otra cosa.

El polinucleótido (molécula de ADN) aquí no se define por una región funcional, y puede incluir por lo menos una de una región de supresión de expresión, una región

codificante, una secuencia líder, un exón y un intrón.

El polinucleótido también incluye ARN y ADN. El polipéptido que comprende la cierta secuencia de aminoácido y el polinucleótido que comprende la cierta secuencia de
5 ADN incluye fragmentos, homólogos, derivados y mutantes de las mismas.

Los mutantes del polinucleótido (ADN mutante) incluyen mutantes alélicos de ocurrencia natural, mutantes de ocurrencia no natural, y mutantes que tienen eliminación, sustitución, adición e inserción. Pero, estos mutantes codifican el polipéptido que tiene
10 sustancialmente la misma función como la función del polipéptido codificado por el polinucleótido antes de la mutación.

La mutación del polipéptido (modificación de la secuencia de aminoácido) no ocurre necesariamente por una de ocurrencia natural, por ejemplo, mutación o
15 modificación post-traduccional, y puede ser aquella hecha artificialmente al utilizar la proteína de ocurrencia natural (por ejemplo, la adiponectina humana). Los mutantes anteriores del polipéptido incluyen variantes alélicas, homólogos y mutantes naturales que tienen por lo menos 80%, preferiblemente 95% y más preferiblemente 99% de homología para el polipéptido antes de la mutación.

20

Se puede analizar la homología del polipéptido o el polinucleótido por medición utilizando el programa FASTA (Clustal, V., Methods Mol. Biol., 25, 307-318(1994)). Como el método más preferible y simple para análisis de homología, es posible ejemplificar el método en el que la secuencia se almacena en un medio (por ejemplo, disco flexible, CD-
25 ROM, unidad de disco duro, unidad de disco externo, DVD, etc.) capaz de ser leído por computador y luego se busca la base de datos de la secuencia conocida de acuerdo con el procedimiento de búsqueda bien conocido utilizando la secuencia almacenada. Ejemplos específicos de la base de datos de la secuencia conocida incluyen los siguientes:

30

-Base de datos de ADN de Japón (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) ; -
Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/web/Genebank/Index.htm>); y

-la Base de Datos de Ácido Nucleico de Laboratorio de Biología Molecular Europea (EMBL) (http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/embl_db.html).

35

Los lotes de búsqueda de algoritmos para el análisis de homología están disponibles para aquellos expertos en la técnica. Un ejemplo del mismo incluye un programa que se refiere como el programa BLAST. Existen 5 procedimientos BLAST en este programa. Tres (BLASTN, BLASTX y TBLASTX) de ellos se han diseñado al revisar
40 la secuencia de nucleótido. Los dos restantes se han diseñado al revisar la secuencia de

69

proteína (Coulson, Trends in Biotechnology, 12:76-80(1994); Birren, et al., Genome Analysis, 1:543-559(1997)).

Adicionalmente, los programas adicionales, por ejemplo, un programa de
5 alineación de secuencia y un programa para identificar las secuencias separadas más
distintamente están disponibles en la técnica para analizar la secuencia identificada.

El ADN mutante es inactivado (sin cambio en un residuo de aminoácido codificado
por una secuencia de ácido nucleico mutada) o conservador para el aminoácido
10 codificado por este. Se muestran adelante ejemplos de la sustitución de aminoácido
conservativa.

	Residuo de aminoácido original	Residuo de aminoácido sustituido conservador
	Ala	Ser
15	Arg	Lys
	Asn	Gln o His
	Asp	Glu
	Cys	Ser
	Gln	Asn
20	Glu	Asp
	Gly	Pro
	His	Asn o Gln
	Ile	Leu o Val
	Leu	Ile o Val
25	Lys	Arg, Asn o Glu
	Met	Leu o Ile
	Phe	Met, Leu o Tyr
	Ser	Thr
	Thr	Ser
30	Trp	Tyr
	Tyr	Trp o Phe
	Val	Ile o Leu

Generalmente, uno o más codones que codifican un residuo Cys afectan un
35 enlace disulfuro del polipéptido particular.

Se considera que la sustitución del residuo de aminoácido que generalmente
afecta las características de la proteína incluye lo siguiente:

40 a) la sustitución de un residuo hidrófobo con un residuo hidrófilo, por ejemplo, la

30

sustitución de Leu, Ile, Phe, Val o Ala con Ser o Thr;

b) la sustitución del residuo de aminoácido diferente de Cys y Pro con Cys o Pro;

5 c) la sustitución del residuo que tiene una cadena lateral eléctricamente positiva, por ejemplo, Lys, Arg o His con un residuo eléctricamente negativo, por ejemplo, Glu o Asp; y

10 d) la sustitución del residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral extremadamente larga, por ejemplo, Phe con el residuo de aminoácido que no tiene la cadena lateral, por ejemplo, Gly.

La adiponectina comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 1 o 3 o la secuencia de aminoácido que tiene una o más eliminaciones, inserciones, sustituciones
15 o adiciones de aminoácido en la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 1 o 3, y que tiene la actividad inhibidora del aumento del espacio aéreo alveolar y/o el efecto de mejoramiento de la función pulmonar.

La adiponectina puede ser el polipéptido expresado en un sistema de expresión de
20 proteína utilizando Escherichia coli o un sistema de expresión de proteína utilizando baculovirus (AcNPV) mostrado en los Ejemplos descritos adelante por la tecnología de recombinación de gen o el polipéptido obtenido al sintetizar químicamente.

Como un ejemplo específico de la secuencia de aminoácido de adiponectina, es
25 posible ejemplificar una de la SEQ ID NO: 1 o 3. La secuencia de aminoácido de adiponectina no se limita a una de la SEQ ID NO: 1 o 3, y pueden ser aquellas (las homólogas) que tienen una cierta homología a las mismas. Las homólogas pueden incluir los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácido que tiene una o más eliminaciones, inserciones, sustituciones o adiciones de aminoácido en la secuencia de
30 aminoácido de la SEQ ID NO: 1 o 3 y que tiene la actividad inhibidora del aumento del espacio aéreo alveolar y/o la actividad inhibidora de la destrucción de la pared alveolar, y el efecto de mejoramiento de la función pulmonar (la actividad para inhibir el aumento anormal del espacio aéreo alveolar asociado con cambios destructivos de las paredes alveolares debido a lesión crónica, y/o la actividad para inhibir cambios destructivos de las
35 paredes alveolares).

Específicamente, los efectos mejoradores de la función pulmonar de adiponectina incluyen un efecto para mejorar o reducir una reducción en la capacidad de respiración de los pulmones, o un incremento en la resistencia de la respiración en el tracto respiratorio
40 (especialmente el tracto broncoalveolar) de mamíferos tales como humanos.

71

Como una célula anfitriona, se pueden emplear células derivadas de eucariotes y procariotes. La célula eucariótica incluye células de vertebrados y células de microorganismos eucarióticos. Como la célula de un vertebrado, el COS de estirpe celular de mono (Cell, 23, 175 (1981)), la estirpe celular de ovario de hámster Chino y la estirpe celular deficiente de dihidrofolato reductasa correspondiente (Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 77, 4216 (1980)) y similares se utilizan frecuentemente pero estas no son elecciones exclusivas.

Como el vector de expresión de un origen de vertebrado, un vector que tiene una secuencia promotora localizada en la dirección 5' del gen a ser expresado, el sitio de empalme del ARN (precursor), un sitio de poliadenilación y se puede utilizar generalmente una secuencia terminal de transcripción. Si es necesario, el vector puede tener adicionalmente un origen de replicación. Como un ejemplo de tal vector de expresión, se puede mencionar el pSV2dhfr que alberga un promotor temprano de SV40 (Mol. Cell. Biol., 1, 854 (1981)).

Como los microorganismos eucarióticos, se utilizan generalmente levaduras. De estas, se pueden utilizar las levaduras de los genes *Saccharomyces* con ventaja. Como el vector de expresión derivado de un microorganismo eucariótico tal como una levadura, se puede utilizar el pAM82 que tiene un promotor para el gen de fosfatasa ácida (Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 1 (1983)).

Como el anfitrión procariótico, se utilizan generalmente *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Cuando ellos se utilizan como anfitriones, utilizando un vector plásmido capaz de replicación en el microorganismo anfitrión, es posible utilizar adecuadamente un plásmido de expresión obtenido al incorporar un promotor y secuencia SD (Shain y Dalgarno) y un codón de iniciación (por ejemplo, ATG) requerido para la iniciación de la síntesis de proteína en la dirección 5' del gen ya que el gen se puede expresar en este vector. Como dicha *Escherichia coli* como el anfitrión, se utiliza generalmente *E. coli* K12, y como el vector, se utiliza generalmente pBR322 o su producto de modificación. Sin embargo, no existen elecciones exclusivas pero se pueden emplear de forma similar las varias cepas bacterianas conocidas y vectores. Ejemplos del promotor que se puede utilizar son el promotor triptofano (*trp*), promotor *lpp*, promotor *lac*, y promotor PL/PR.

35

Como el vector para la célula de insecto, es posible ejemplificar un vector baculovirus (Takara) en el que se ha incorporado cADN de adiponectina. Específicamente, se puede obtener el producto expresado de la presente invención al introducir el vector de expresión baculovirus en el que el cADN de adiponectina se ha incorporado en las células de cultivo BmN4 o larvas de gusano de seda (*Bombyx mori*)

40

72

utilizando el virus de polihedrosis nuclear (BmNPV) del gusano de seda para expresar, y aislar de un medio de cultivo o un fluido corporal del gusano de seda mediante cromatografía.

5 El producto expresado de la presente invención también se puede obtener al incorporar el cADN de adiponectina en el virus de polihedrosis nuclear (AcNPV) de *Autographa californica*, que se expresa en células Sf9 de *Spodoptera frugiperda* o células Tn5 de *Trichoplusia ni*, y de forma similar purificar a partir de un sobrenadante de cultivo mediante cromatografía.

10

La introducción del ADN recombinante resultante en la célula anfitriona para transformación se puede llevar a cabo de acuerdo con el método conocido.

15 El transformante resultante se puede cultivar de acuerdo con los métodos estándar, de esta forma se expresa y se produce la proteína recombinante objetivo (acumulada o secretada) intracelularmente, extracelularmente o en la membrana de la célula. Como un medio utilizado para el cultivo, varios medios utilizados comúnmente se pueden seleccionar adecuadamente y utilizar de acuerdo con la célula anfitriona empleada. El cultivo también se puede llevar a cabo bajo condiciones adecuadas para el
20 aumento de la célula anfitriona.

Si es necesario, se puede aislar y purificar la adiponectina obtenida en la forma anterior mediante varios procedimientos de separación utilizando las características físicas, químicas y otras características de los mismos (Biochemical Data Book II, 1175-
25 1259, Primera Edición, 1st impresión, Jun. 23, 1980, publicada por Tokyo Kagaku Dojin, K.K.; Biochemistry, 25 (25), 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163, 313 (1987), etc.). más específicamente, dicho aislamiento y purificación se puede lograr mediante el tratamiento de reconstitución convencional, el tratamiento con un agente que precipita proteína (precipitación de proteína por sales), centrifugación, método de choque de presión
30 osmótico, sonicación, ultrafiltración, varios tipos de cromatografía líquida tal como cromatografía de tamiz molecular (filtración de gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio de ión, cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), etc., y diálisis como se utiliza únicamente o en combinación.

35 Alternativamente, la adiponectina mencionada anteriormente también se puede producir mediante el método general para la síntesis química con base en la información de secuencia de aminoácido. El método incluye los métodos de fase líquida y fase sólida convencionales para la síntesis del péptido. En más detalle, cada uno de estos métodos incluye la técnica así llamada de alargamiento en forma de etapas que comprende
40 condensar el componente de aminoácidos uno después de otro para la extensión de

73

cadena de acuerdo con la información de la secuencia de aminoácido, y la técnica de condensación del fragmento que comprende sintetizar fragmentos de péptido, cada uno consiste de varios residuos de aminoácido anticipados y acoplándolos uno después del otro de acuerdo con dicha información.

5

Un método de condensación empleado para la síntesis de péptido también se puede desarrollar de acuerdo con métodos estándar. Ejemplos de los métodos estándar incluyen un método azida, un método de anhídrido ácido mezclado, un método DCC, un método de éster activo, un método de oxidación y reducción, un método DPPA
10 (difенилфосфорилазид), un método DDC + (1-hidroxibenzotriazol, N-hidroxisuccinamida, N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxiimida) aditivo y método Woodward.

El disolvente que se puede utilizar en aquellos métodos se puede seleccionar adecuadamente a partir de los disolventes que son bien conocidos por ser de uso en las
15 reacciones de condensación que forman el péptido. Ejemplos de estos incluyen N,N-dimetilformamida (DMF), sulfóxido de dimetilo (DMSO), hexafosforamida, dioxano, tetrahidrofurano (THF), acetato de etilo, etc., y mezclas de estos.

Luego de la reacción de síntesis de péptido anterior, el aminoácido no involucrado
20 en la reacción o el grupo carboxilo en el péptido se puede proteger como el alquiléster inferior tal como éster de metilo, éster de etilo y éster de terc-butilo, y éster de aralkilo tal como éster de bencilo, éster de p-metoxibencilo y éster de p-nitrobencilo generalmente mediante esterificación.

El grupo hidroxilo en el aminoácido tal como el residuo tirosina que tiene un grupo
25 funcional en la cadena lateral se puede proteger con acetilo, bencilo, benciloxycarbonilo, terc-butilo o similares, aunque tal protección no es necesariamente indispensable.

Más aún, el grupo guanidino de un residuo arginina se puede proteger con un
30 grupo protector apropiado tal como nitro, tosilo, p-metoxibencenosulfonilo, metileno-2-sulfonilo, benciloxycarbonilo, isoborniloxycarbonilo o adamantiloxycarbonilo.

Las reacciones para la eliminación de tales grupos protectores de los aminoácidos o péptidos protegidos, o de la proteína final, se puede llevar a cabo de acuerdo con los
35 métodos utilizados comúnmente, tal como un método de reducción catalítica o método utilizando amoníaco líquido/ metal de sodio, fluoruro de hidrógeno bromuro de hidrógeno, cloruro de hidrógeno, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido fórmico, o ácido metanosulfónico, y similares.

40 La adiponectina así obtenida se puede purificar mediante los varios métodos tales

77

como métodos que utilizan una resina de intercambio de ión, cromatografía partición y cromatografía de gel, y un método de distribución contra corriente utilizado comúnmente en el campo de la química de péptido.

5 Los agentes terapéuticos para enfermedad pulmonar de la presente invención comprenden adiponectina o una sal farmacológicamente aceptable de la misma como un ingrediente activo. La sal incluye aquellas con metales alcali, metales alcalinotérreos y amonio, tal como las sales de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, bario y amonio. Estas sales se pueden producir mediante métodos bien conocidos en la técnica. La sal
10 mencionada anteriormente incluye adicionalmente sales de adición ácida que se pueden preparar al hacer reaccionar la adiponectina con un ácido orgánico o inorgánico adecuado en la forma conocida per se. Ejemplos de las sales de adición ácida son sales de clorhidrato, bromhidrato, sulfato, bisulfato, acetato, oxalato, valerato, oleato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, p-toluenosulfonato (tosilato), citrato, maleato, fumarato,
15 succinato, tartrato, sulfonato, glicolato, ascorbato, bencenosulfonato, napsilato y similares.

Los agentes terapéuticos para enfermedad pulmonar de la invención se proporcionan generalmente y se colocan para uso en la forma de una preparación
20 farmacéutica que contiene una cantidad farmacológicamente efectiva del ingrediente activo junto con un portador farmacéutico apropiado.

El portador que se puede utilizar en tales preparaciones farmacéuticas incluyen varios diluyentes y/o excipientes, tales como rellenos, extensores, aglutinantes,
25 humectantes, desintegrantes, tensoactivos, lubricantes, y similares. Estos portadores se utilizan opcionalmente de acuerdo con una forma de dosificación unitaria de la formulación resultante.

Las formas de dosificación unitaria de las preparaciones farmacéuticas se pueden
30 seleccionar de varias formas de acuerdo con el propósito de la terapia. Los ejemplos típicos incluyen formas sólidas tales como comprimidos, píldoras, polvos, polvos finos, gránulos y cápsulas, y formas líquidas tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. Estas preparaciones se clasifican, mediante la ruta de administración, en preparaciones orales, preparaciones parenterales, preparaciones transnasales,
35 preparaciones vaginales, supositorios rectales, comprimidos sublinguales, ungüentos, y similares, y cada uno se puede formular y moldear o de otra forma procesar mediante el procedimiento químico establecido. Adicionalmente, tales preparaciones farmacéuticas pueden contener varios aditivos que se pueden formular en preparaciones farmacéuticas habituales, tales como estabilizantes, agentes antibacterianos, amortiguadores, agentes
40 de isotonicidad, agentes quelantes, agentes de control de pH y tensoactivos.

75

El estabilizador incluye albúmina de suero humana y aquellos L-aminoácidos, sacáridos y derivados de celulosa. Estos se pueden utilizar cada uno solo o en combinación con un tensoactivo o similares. Particularmente, tal una combinación puede
5 contribuir a una estabilidad mejorada del ingrediente activo.

Los L-aminoácidos no se limitan particularmente e incluyen glicina, cisteína, ácido glutámico, etc.

10 Los sacáridos no se limitan particularmente pero incluyen monosacáridos tales como glucosa, manosa, galactosa y fructosa; alcoholes de azúcar tal como manitol, inositol y xilitol; disacáridos tales como sacarosa, maltosa y lactosa; y polisacáridos tales como dextrano, almidón hidroxipropilo, sulfato de condroitina y ácido hialurónico; y derivados de los mismos.

15

Los tensoactivos no se limitan particularmente y se pueden emplear tensoactivos iónicos y no iónicos. Ejemplos de los tensoactivos son alquil ésteres de polioxietilenglicol sorbitan, éteres polioxietilenalquilo, ésteres monoacil sorbitán, y glicéridos de ácidos grasos.

20

Los derivados de celulosa no se limitan particularmente pero incluyen metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio etc.

25

Se pueden utilizar los sacáridos por lo menos aproximadamente 0.0001 mg, y preferiblemente dentro del rango de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 mg por 1 µg del ingrediente activo. Se pueden utilizar los tensoactivos por lo menos aproximadamente 0.00001 mg, y preferiblemente dentro del rango de aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 0.01 mg por 1 µg del ingrediente activo. Se puede utilizar
30 albúmina de suero humano por lo menos aproximadamente 0.0001 mg, y preferiblemente dentro del rango de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 mg por 1 µg del ingrediente activo. Se pueden utilizar los aminoácidos dentro del rango de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 10 mg por 1 µg del ingrediente activo. Se pueden utilizar los derivados de celulosa por lo menos aproximadamente 0.00001 mg, y
35 preferiblemente dentro del rango de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.1 mg por 1 µg del ingrediente activo.

40

Se puede seleccionar la cantidad de ingrediente activo contenida en las preparaciones farmacéuticas de la presente invención de forma adecuada a partir de un amplio rango. Es adecuado que la cantidad del ingrediente activo es típicamente

aproximadamente 0.00001 a aproximadamente 70 % en peso, y preferiblemente aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 5 % en peso.

El amortiguador que se puede incorporar opcionalmente en las preparaciones farmacéuticas incluye ácido bórico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido ϵ -aminocaproico, ácido glutámico y las sales correspondientes (por ejemplo sales con metales alcali o metales alcalinotérreos tales como las sales de sodio, potasio, calcio y magnesio). El agente isotonzante incluye cloruro de sodio, cloruro de potasio, azúcares y glicerina. El agente quelante incluye edetato de sodio y ácido cítrico.

10

Las preparaciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar como una preparación líquida, y adicionalmente se pueden hacer en forma de dosificación liofilizada obtenida al liofilizar la formulación farmacéutica, que se prepara en una concentración apropiada en uso al disolver en el amortiguador que contiene solución salina.

15

En el moldeado de la composición farmacéutica de la invención en la forma de comprimido, se pueden utilizar, como el portador, varios excipientes tales como lactosa, sacarosa, cloruro de sodio, glucosa, urea, almidón, carbonato de calcio, caolín, celulosa cristalina, ácido silícico y fosfato de potasio; aglutinantes tales como agua, etanol, propanol, jarabe simple, solución de glucosa, solución de almidón, solución de gelatina, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa y povidona; desintegrantes tales como carboximetilcelulosa de sodio, carboximetilcelulosa de calcio, hidroxipropilcelulosa sustituida inferior, almidón seco, alginato de sodio, polvo agar, polvo "laminaran", hidrógeno carbonato de calcio y carbonato de sodio; tensoactivos tales como éster de ácido graso de polioxietileno sorbitán, lauril sulfato de sodio y estearil monoglicérido; inhibidores de desintegración tal como sacarosa, estearina, manteca de cacao y aceite hidrogenado; promotores de absorción tal como base de amonio cuaternario y lauril sulfato de sodio; humectantes tales como glicerina y almidón; adsorbentes tales como almidón, lactosa, caolín, bentonita y ácido silícico coloidal; y lubricantes tales como talco purificado, sal de ácido esteárico, polvo de ácido bórico y polietilenglicol.

20

25

30

Adicionalmente, si es necesario, los comprimidos obtenidos se pueden recubrir con los materiales de recubrimiento convencionales para proporcionar comprimidos recubiertos de azúcar, comprimidos recubiertos de gelatina, comprimidos entéricos, comprimidos recubiertos con película o comprimidos de dobles capas o múltiples capas.

35

Las píldoras se pueden preparar utilizando, como el portador, excipientes tales como glucosa, lactosa, almidón, manteca de cacao, aceite vegetal hidrogenado, caolín y talco; aglutinantes tales como polvo de goma arábica, polvo de goma tragacanto, gelatina y etanol, y desintegrantes tales como "laminaran" y agar.

40

77

En general, las cápsulas se pueden preparar al mezclar el ingrediente activo con los portadores mencionados anteriormente de acuerdo con un método usual para incluir el formador en una cápsula de gelatina dura, cápsula de gelatina blanda o similares.

5

La preparación líquida para administración oral incluye soluciones, emulsiones, suspensiones, jarabes y elixires. Cada uno se puede preparar utilizando un diluyente inerte convencional, por ejemplo un vehículo farmacológicamente aceptable inclusive de agua. La preparación líquida se puede complementar adicionalmente con varios agentes auxiliares tales como un agente humectante, un agente emulsificante y/o un de
10 suspensión y se puede preparar mediante el procedimiento establecido.

La preparación líquida para administración parenteral, por ejemplo una solución acuosa o no acuosa estéril, emulsión o suspensión, se puede preparar al utilizar un
15 diluyente tal como agua, alcohol etílico, propilenglicol, polietilenglicol, alcohol isostearilo etoxilado, alcohol isostearilo polioxilado, ésteres de ácido graso sorbitán polietoxilado y aceites vegetales tales como aceite de oliva. La preparación líquida se puede complementar con un éster orgánico que se puede inyectar o infundir, tal como oleato de etilo. Tales preparaciones se pueden complementar adicionalmente con el solubilizador,
20 amortiguador, agente humectante, emulsificante, agente de suspensión, conservante, dispersante y otros aditivos.

Se pueden esterilizar preparaciones farmacéuticas mediante filtración a través de un filtro bacteriano, la incorporación de un bactericida, tratamiento de irradiación,
25 tratamiento de calor, o similares. Más aún, tales preparaciones farmacéuticas cada una se puede proporcionar en la forma de una composición sólida estéril, que se puede disolver en agua esterilizada o un medio esterilizable adecuado para esterilización extemporánea.

30 Se pueden preparar los supositorios rectales y las preparaciones vaginales al utilizar portadores tales como polietilenglicol, manteca de cacao, un alcohol mayor, un éster de alcohol mayor, gelatina y un glicérido semisintético.

Se pueden preparar los ungüentos tales como pastas, cremas y geles al utilizar tal
35 un diluyente o diluyentes como petrolato blanco, parafina, glicerina, derivados de celulosa, propilenglicol, polietilenglicol, siliconas, bentonita, y aceites vegetales tales como aceite de oliva.

Se pueden preparar las preparaciones farmacéuticas para la administración
40 transnasal o sublingual utilizando el excipiente o excipientes estándares bien conocidos

78

en la forma convencional.

Adicionalmente, si es necesario, las preparaciones farmacéuticas de la invención se pueden complementar con agentes colorantes, conservantes, perfumes, sabores, endulzantes u otras composiciones farmacéuticas.

El método para administrar la preparación farmacéutica no se limita, pero se selecciona de acuerdo con la forma de dosificación, la edad del paciente, sexo y otras condiciones, y el estado de la enfermedad. Por ejemplo, se administran oralmente los comprimidos, píldoras, soluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos y cápsulas. Las inyecciones se administran intravenosamente ya sea solas o en mezcla con una infusión ordinaria tal como glucosa y aminoácido, y si es necesario, se administran solas intramuscularmente, intradérmicamente, subcutáneamente o intraperitonealmente. Los supositorios se administran intrarectalmente. Las preparaciones vaginales se administran en la vagina, las preparaciones nasales se administran en la nariz, las preparaciones sublinguales se administran en la cavidad oral, y los ungüentos se administran percutáneamente tópicamente.

Para elaborar el ingrediente activo de la presente invención en una forma de polvo, el ingrediente se puede pulverizar de acuerdo con métodos usuales. Por ejemplo, el ingrediente activo se puede pulverizar utilizando lactosa, almidón o similares, y luego se agita para obtener una mezcla homogénea.

De los métodos de administración, la administración pulmonar (inhalación) es más ventajosa que la administración oral ya que los alvéolos pulmonares son los órganos objetivos del tratamiento, y es posible dirigir la exposición al sitio de tejido alveolar dañado, lo que evita los efectos colaterales generalizados.

La cantidad de adiponectina contenida en el agente terapéutico de la presente invención no se limita, y se puede seleccionar adecuadamente de un amplio rango. La adiponectina está contenida generalmente en una cantidad de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 70 % en peso, preferiblemente aproximadamente 0.1 a aproximadamente 50 % en peso, y más preferiblemente aproximadamente 0.3 a aproximadamente 30 % en peso en la composición farmacéutica.

La cantidad del ingrediente activo a estar contenida en la preparación farmacéutica y la dosificación no se limitan particularmente pero se pueden seleccionar de un amplio rango de acuerdo con el efecto terapéutico deseado, el método de administración, periodo de tratamiento, y edad del paciente, sexo y otras condiciones. La dosificación se selecciona usualmente de tal manera que la concentración de sangre del ingrediente

39

ingrediente activo será preferiblemente aproximadamente 0.1 a aproximadamente 500 $\mu\text{g/ml}$, y más preferiblemente aproximadamente 1 a aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$. Esta preparación se puede administrar una vez o en unas pocas dosis divididas al día.

5 La dosificación del agente terapéutico de la invención se selecciona adecuadamente de acuerdo con el método de uso, la edad del paciente, sexo y otras condiciones, y la severidad de la enfermedad. La cantidad de adiponectina puede ser usualmente aproximadamente 0.1 μg a aproximadamente 20 mg.

10 Efectos Ventajosos de la invención

El agente que contiene adiponectina que inhibe el aumento del espacio aéreo alveolar o el agente que contiene adiponectina que inhibe la destrucción de la pared alveolar de la presente invención posee un efecto excelente de la reducción del deterioro
15 de función pulmonar, tal como obstrucción del flujo de aire, y es altamente efectivo para el tratamiento de la enfermedad pulmonar acompañada por el deterioro irreversible en la función pulmonar.

El agente que contiene adiponectina para inhibir el aumento del espacio aéreo alveolar o el agente que contiene adiponectina para inhibir la destrucción de la pared alveolar de la presente invención es un fármaco altamente seguro con pocos efectos
20 colaterales adversos tal como náusea, vómito, secreción de ácido gástrico, etc.

Breve descripción de los dibujos

25

La figura 1 es una gráfica que muestra que la adiponectina tiene una actividad inhibidora dependiente de dosis en el aumento del espacio aéreo alveolar originada por el progreso de los cambios destructivos de las paredes alveolares.

30 La figura 2 muestra las secciones de tejido que indican el progreso de los cambios destructivos de las paredes alveolares, y la actividad inhibidora de la adiponectina en el progreso de la destrucción de la pared alveolar.

Descripción de Las Modalidades

Ejemplo de preparación 1

35

La composición farmacéutica de la presente invención en la formulación inyectable se prepara al agregar y mezclar 100 $\mu\text{g/mL}$ de la adiponectina humana (que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 1), 0.01 mg/mL de Tween 80 (Monooleato Sorbitán Polioxiétileno (20); Polisorbato 80), 15 mg/mL de dextrano 40, 0.1 mg/mL de
40 cisteína, y 1.0 mg/mL de HSA (albúmina de suero humano) en 0.01 M amortiguador de

citrato de sodio-ácido cítrico (pH 6.0), filtrar la mezcla (utilizando un filtro de membrana de 0.22 μ m), luego dispensar estérilmente el filtrado mediante 1 mL en un frasco, y liofilizarlo. La formulación se puede utilizar al disolver en 1 mL de solución salina en uso.

5 Ejemplo de preparación 2

La composición farmacéutica de la presente invención en la formulación inyectable se prepara al agregar 10 μ g/0.1 mL de la adiponectina humana (que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 1), 5 mg de ácido cisteico, y 1 mg de albúmina de suero humano (HSA) por frasco en agua destilada para inyección, se carga la solución resultante en un frasco por 1 mL y se liofiliza.

Ejemplo de preparación 3

La composición farmacéutica de la presente invención en la formulación inyectable se prepara al agregar 0.5 mg de adiponectina, 80 mg de cloruro de sodio, 20 mg de manitol, 34.5 mg de fosfato de sodio, y 45 mg de PEG en 10 ml de agua destilada para la inyección, seguido por filtración aséptica, se dispensa el filtrado por 1 mL en un frasco aséptico, y se liofiliza.

20

Ejemplo de referencia 1

Producción de una adiponectina humana recombinante

25 (1) Expresión de adiponectina humana en Escherichia coli

1) adiponectina humana PCR

El gen de adiponectina humana y la secuencia de aminoácido codificada por lo tanto se ha depositado bajo el número de acceso GenBank NM_004797 y D45371, respectivamente. La región codificante (CDS) se muestra como la secuencia de 27 a 761 de la secuencia de nucleótido. La secuencia de aminoácido deducida se muestra en la SEQ ID NO: 1. En esta secuencia, los 1 a 14 residuos constituyen un péptido de señal y los 15 a 244 residuos representan la adiponectina humana madura.

35

El gen de adiponectina humana se amplifica por PCR utilizando el plásmido donado por Dr. Funahashi, el Segundo Departamento de Medicina interna, Osaka University School of Medicine como una plantilla.

40 Al diseñar de esta manera la secuencia 693bp a partir de 69 a 761 de la secuencia

81

de nucleótido de la adiponectina humana se amplificaría con un sitio NdeI en el extremo 5' y un sitio BamHI en el extremo 3'. Se producen cebadores PCR utilizando un sintetizador de ADN automático. Las secuencias de cebador PCR se muestran en la SEQ ID NO:6 (directa) y NO:7 (inversa).

5

2) Subclonación del gen de adiponectina humana (apM1)

El producto PCR obtenido en la etapa anterior 1) se subclona en el Vector T Blue pT7 (Novagen) y se confirma que no existe mutación en su secuencia de nucleótido (pT7-apM1).

10

3) Construcción de un Vector de Expresión

El vector de expresión pET3c (Novagen) se digiere con NdeI y BamHI para recuperar un fragmento de aproximadamente 4600 bp. Por otra parte, el pT7-apM1 obtenido en la etapa anterior 1) se digiere con NdeI y BamHI para recuperar un fragmento de aproximadamente 700 bp. Estos fragmentos se ligan y el vector de expresión así obtenido se nombra pET3c-apM1.

15

4) Expresión en Escherichia coli

20

La cepa E. coli anfitriona BL21(DE3)pLysS se transforma con el pET3c-apM1 construido en la etapa anterior 3) y se cultiva 2xT.Y.Amp. (triptona 16 g, extracto de levadura 10 g, y NaCl 5 g). Cuando el organismo ha ingresado en la fase de aumento logarítmica, IPTG (β -D-tiogalactopiranosida isopropilo) se agrega para inducir la producción de una adiponectina humana recombinante (apM1). Las células E. coli antes y después de esta inducción IPTG y el cuerpo de inclusión (la fracción insoluble de E. coli) después de dicha inducción IPTG se muestrean y se someten a SDS-PAGE y inmunotransferencia Western para confirmar la expresión de la adiponectina humana.

25

30

5) Resultados y Discusión

El producto de expresión en E. coli, obtenido en la forma anterior, es una proteína de 230 residuos que corresponde de 15Gly a 244Asn, exclusivo de la secuencia de señal, de la secuencia de aminoácido de la adiponectina humana, con la adición de Met derivado del codón de iniciación en el terminal N.

35

El E. coli obtenido por el procedimiento anterior se analiza mediante SDS-PAGE. Como un resultado, una banda aproximadamente de 30 kD se puede confirmar en la célula E. coli y el cuerpo de inclusión después de la inducción de IPTG.

40

Luego, la inmunotransferencia Western se desarrolla utilizando dos tipos de anticuerpos (anticuerpos policlonales (péptidos sintéticos)). Ambos anticuerpos se hacen reaccionar con dicha banda de aproximadamente 30 kD, mientras que no se detecta
5 ninguna reacción en lo absoluto con el anfitrión de E. coli.

Se corta la banda anterior de aproximadamente 30 kD para investigar la secuencia de sus 10 residuos de aminoácido en el terminal N. La secuencia es la misma como la secuencia esperada, con la eliminación de Met en el terminal N- que se ha encontrado en
10 una población menor.

Esto llega a ser claro de los resultados anteriores que la adiponectina humana recombinante se ha expresado como una proteína de aproximadamente 30 kD. La mayoría de la adiponectina humana recombinante expresada se ha acumulado
15 intracelularmente como un cuerpo de inclusión.

(2) Purificación de la adiponectina humana recombinante (apM1) de E. coli

La purificación de la adiponectina humana recombinante de E. coli se lleva a cabo
20 mediante el siguiente procedimiento de 5 etapas.

1) Cultivo de E. coli

El E. coli BL21(DE3)pLysS (Novagen) transformado con el vector de expresión
25 pET3c-apM1 se precultiva en 2xT.Y.Amp.Cm. (triptona 16 g, extracto de levadura 10 g, cloramfenicol 25 µg/ml, y NaCl 5 g) (37° C, agitar cultivo). Al siguiente día, el cultivo se diluye con 100 volúmenes de 2xT.Y.Amp. y se incuba adicionalmente. Después de 2 a 3 horas de incubación cuando el OD550 del fluido de cultivo ha llegado a ser 0.3 a 0.5, se agrega IPTG en una concentración final de 0.4 mM al inducir la producción de
30 adiponectina humana recombinante (apM1). Aproximadamente 3 a 5 horas después de la adición del IPTG, el fluido de cultivo se centrifuga (5000 rpm, 20 min., 4° C) y el sedimento de E. coli así obtenido se conserva congelado.

2) Preparación de un Cuerpo de Inclusión de E. coli

35

El sedimento de E. coli se suspende en 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0) y se trata con lisozima a 37° C durante 1 hora. Luego, se agrega Triton X-100 (Katayama Kagaku) a una concentración final de 0.2%. Esta solución se somete a sonificación (Branson Sonifier, control de salida 5, 30 seg.) y se centrifuga (12000 rpm, 30 min, 4° C) y se recupera el
40 sedimento. Este sedimento se suspende en 25 ml de 0.2% de Triton X-100-

complementado con 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0) y la suspensión se somete a sonificación (bajo las mismas condiciones como anteriormente).

La solución resultante se centrifuga y el sedimento se lava mediante el mismo
5 procedimiento como anteriormente. El sedimento así obtenido se toma como el cuerpo de inclusión.

3) Replegamiento del Cuerpo de Inclusión

10 El cuerpo de inclusión se solubiliza con una cantidad pequeña de 7 M HCl guanidina, 100 mM de Tris-HCl (pH 8.0) y 1% de 2ME. Esta solución se agrega en forma de gotas en el volumen de 200 veces de 2 M urea, 20 mM de Tris-HCl (pH 8.0), se diluye, y se le permite permanecer a 4° C durante 3 noches.

15 4) Concentración de la Solución Replegada

La solución después del replegamiento anterior se centrifuga (9000 rpm, 30 min, 4° C) y el sobrenadante se concentra en aproximadamente 1/100 mediante ultrafiltración utilizando una membrana Amicon YM-10. Este concentrado se dializa contra Tris-HCl 20
20 mM (pH 8.0) y el dialisato se filtra a través de un filtro de 0.45 µm.

5) HPLC de intercambio de anión DEAE-5PW

La muestra obtenida en la etapa anterior 4) se aísla y se purifica mediante
25 cromatografía líquida de alto desempeño de intercambio de anión (HPLC) con DEAE-5PW (Tosoh Corporation). Como el amortiguador de partida, se utiliza Tris-HCl 20 mM (pH 7.2), y se lleva a cabo elución con un gradiente NaCl (0→1M NaCl/60 ml) bajo monitoreo de absorbancia a 280 nm. Se recoleta el eluato en fracciones de 1 ml y cada fracción se analiza por SDS-PAGE.

30

6) Resultados y Discusión

Debido a que se ha expresado la adiponectina humana recombinante (apM1) como un cuerpo de inclusión en E. coli, esta purificación se lleva a cabo por solubilización
35 y replegamiento del cuerpo de inclusión. Como un resultado, se solubiliza la adiponectina humana recombinante y se separa en la columna de intercambio de anión. Se analizan las fracciones pico (fracción Nos. 30-37) por SDS-PAGE. Como un resultado, se observa una banda de aproximadamente 30 kD. En este análisis, se detecta una banda de frotis débil en el fondo, pero como se considera la mayoría de la proteína por ser adiponectina
40 humana recombinante (apM1), esta banda de aproximadamente 30 kD (adiponectina

84

humana recombinante) se utiliza como el antígeno en la inmunización posterior de conejos y ratones, y el ingrediente activo de los agentes terapéuticos para enfermedad pulmonar de la invención.

5 (3) Preparación de Anticuerpos adiponectina Policlonales y Monoclonales antihumanos

1) Preparación del Anticuerpo Policlonal

La adiponectina humana recombinante, 100 µg/cuerpo, se mezcla con el
10 adyuvante completo en una relación 1:1 y se inmunizan 5 conejos con la mezcla 8 veces en intervalos de 2 semanas para obtener un anticuerpo adiponectina policlonal antihumano (códigos de identificación: OCT9101-OCT9105).

2) Preparación del Anticuerpo Monoclonal

15

La adiponectina humana recombinante, 20 µg/cuerpo, se mezcla con el adyuvante completo en una relación 1:1 y se inmunizan ratones con la mezcla 3 veces en intervalos de 2 semanas. Luego, se lleva a cabo la inmunización final con el adyuvante 3 días antes de fusión celular. La fusión celular entre la célula de bazo de ratón y la célula mieloma se
20 lleva a cabo mediante el método PEG y se selecciona el hibridoma en medio HAT.

La detección para una estirpe celular que produce un anticuerpo de adiponectina humana se lleva cabo mediante ELISA utilizando el inmunoplate recubierto con antígeno (adiponectina humana recombinante), y se clona el hibridoma mediante el método de
25 dilución limitante.

En la forma anterior, se obtiene el anticuerpo de adiponectina antihumano 11 que produce las estirpes de hibridoma llamadas KOCO9101-KOCO9111. Un hibridoma, entre estos, se deposita con el National Institute of Bioscience and Human Technology, the
30 Ministry of International Trade and Industry, Japón (NIBH, Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón) de Jun. 8, 1998 (fecha de depósito original) (el código de identificación asignado mediante el depositante: KOCO9108) y la demanda para conversión en el Tratado de Budapest bajo depósito se presenta en Oct. 7, 1998. El número de acceso del depósito final es FERM BP-6542.

35

Los hibridomas como clones únicos se administran respectivamente intraperitonealmente a los ratones tratados previamente con pristano y se cosechan los fluidos de ascitas (Códigos de identificación: ANOC9101-9111).

40 3) Purificación de los Anticuerpos

85

El antisuero de conejo (anticuerpo policlonal) y fluido ascitas de ratón (anticuerpo monoclonal) se purifican respectivamente utilizando una columna de proteína A.

5 4) Expresión de la adiponectina humana en Células de Animal

Se corta el cADN de adiponectina con EcoRI y se inserta en el sitio EcoRI del vector de expresión pCIneo (Promega Corp.). La célula COS-1 (ATCC CRL1650) se transfiere con la adiponectina humana pCIneo anterior utilizando LlipofectAMINA (GIBCO
10 BRL), y el sobrenadante de cultivo y las células se cosechan después de 72 horas.

5) Inmunotransferencia Western de adiponectina humana

Primero, se someten el extracto de tejido adiposo, las células COS-1, el
15 sobrenadante de cultivo celular COS-1, el plasma humano saludable, y la adiponectina humana recombinante a 2 ME(+) SDS-PAGE y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa.

Esta membrana se hace reaccionar con el anticuerpo de adiponectina monoclonal
20 antihumano (ANOC9104) y, luego, con el anticuerpo marcado HRP, y se lleva a cabo la detección con ECL (reactivo de detección de inmunotransferencia Western, Amersham).

Como un resultado, se detecta una banda de aproximadamente 35 kD para el extracto de tejido adiposo, célula de adiponectina humana pCIneo /COS-1, y plasma
25 humano saludable, pero no se observa para la célula pCIneo/COS-1 o el sobrenadante de cultivo celular pCIneo/COS-1.

Con el sobrenadante de cultivo celular de células pCIneo- adiponectina humana/COS-1, se puede confirmar una banda de 35 kD aunque es muy débil en
30 intensidad por ser fácilmente discernible.

Ejemplo de referencia 2

Las células CHO que expresan la adiponectina de ratón de fusión His-Tag de
35 Terminal N (clon No. 5) se cultivan a gran escala, y se recolecta el sobrenadante resultante. Utilizando una Resina Ni-NTA, se purifica la adiponectina marcada His.

Ejemplo de referencia 3

40 El ADN de longitud completa, como se muestra en la SEQ NO: 5, de la

76

adiponectina de ratón se integra en un vector de expresión y se expresa en *E. coli*, proporcionando una gran cantidad de la adiponectina de ratón expresada. El sobrenadante de *E. coli* interrumpido se aplica a una columna abierta de DEAE-Sefarosa, y se desarrolla elución utilizando un gradiente de 0M a 1M NaCl. Las fracciones eluadas
5 luego se recolectan y se someten a fraccionamiento con 30% de sulfato de amonio saturado. Se aplica el sobrenadante a una columna abierta Butil-Toyopearl, y se desarrolla elución con un gradiente de 30% a 0% de sulfato de amonio saturado. Finalmente, la filtración de gel se lleva a cabo para purificar la adiponectina de ratón.

10 Ejemplo 1

Utilizando ratones modelo (C57BL/6J) que han desarrollado un trastorno de pulmón como un resultado del tratamiento con elastasa, se examina la adiponectina para efectos terapéuticos en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica caracterizada por la
15 limitación del flujo de aire irreversible.

Una vez las paredes alveolares del ratón modelo se destruyen mediante una única administración intratecal de de elastasa, la destrucción de la pared alveolar continua crónicamente, expandiendo las lesiones de enfisema (control en la Fig. 2). Tales cambios
20 se indican por medio del intercepto lineal, que es un índice de evaluación generalmente utilizado (Dunnill. M.S. Thorax (1962) 17, p320-328). El grado de destrucción de la pared alveolar se evalúa al medir el tamaño de alveolo individual.

Así, en el ratón de modelo, el tratamiento con elastasa origina la destrucción de la
25 pared alveolar, por lo cual resulta en expansión del diámetro alveolar, que es equivalente de lesiones de enfisema y deterioro de la función pulmonar.

La administración intratecal de elastasa única para ratones resulta en la destrucción de las paredes alveolares y un colapso consecuente de los vasos
30 sanguíneos, causando hemorragia transitoria e infiltración de neutrófilo en los alvéolos; sin embargo, esta inflamación desaparece en tres días. Por lo tanto, en el experimento, se puede verificar que el efecto de la adiponectina no se deriva de la acción inhibidora de elastasa.

35 Se asignan ratones hembra de 6 o 7 semanas de edad (C57BL/6L, Japón Charles River Co., Ltd.) a 4 grupos (A a D, 6 ratones por grupo) con base en el peso corporal utilizando aleatorización estratificada (SAS Institute Japón, R8.1), como se muestra en la Tabla 1. Cada ratón se somete a anestesia pentobarbital.

40 Tabla 1

87

Grupo	Tratamiento de elastasa	Sustancia de administración (Concentración)	Dosis de adiponectina (mg/ratón) (50 µl)	Número de ratones
A	No se desarrolla	-	-	6
B	Se desarrolla	Solución salina normal	-	6
C	Se desarrolla	Adiponectina (0.02 mg/ml)	0.001	6
D	Se desarrolla	Adiponectina (0.2 mg/ml)	0.01	6

Posteriormente, utilizando un rociador (un producto de Penn Century Inc.), se administran intratraquealmente solución salina normal (solución salina normal Otsuka, producida por Otsuka Pharmaceutical Factory Inc.) y elastasa de neutrófilo humana (producida por Elastin Products Co., Inc.) a través de la laringe a los ratones en el Grupo A y los ratones en los Grupos B a D, respectivamente, en un volumen de 50 µl/ratón. La dosificación de elastasa es 20U/ratón. A los tres días después de la administración de elastasa intratraqueal, se administra adiponectina intratraquealmente una vez al día durante 18 días a los ratones en el Grupo C en una dosis de 0.001 mg/ratón y a los ratones en el Grupo D en una dosis de 0.01 mg/ratón. Se obtiene la adiponectina utilizada en la administración al disolver en un disolvente (50 mM de Tris-HCl (pH 8.0) 0.5M NaCl) de adiponectina de ratón derivado de célula CHO obtenida en el Ejemplo de referencia 2 anterior. La adiponectina se diluye con una cantidad adecuada de solución salina normal a una concentración de 0.2 mg/ml o 0.02 mg/ml en uso. Las soluciones en cada concentración se dividen en unidades de dosificación diaria, y se preserva congelado a -20° C hasta la fecha de administración. En el tiempo de uso, se descongela la solución congelada. En el grupo de control elastasa (Grupo B), se administra solución salina normal en lugar de adiponectina durante el mismo periodo. La adiponectina o la solución salina normal se administra intratraquealmente a través de la laringe a un ratón bajo inhalación de anestesia isoflurano en un volumen de 50 µl/ratón utilizando un rociador. Después de 18 días de la administración intratraqueal continua, cada ratón se le practica eutanasia mediante sangrado de la aorta abdominal bajo inhalación de anestesia isoflurano. El pulmón se extirpa y se somete a fijación de perfusión con 10% de solución de formalina amortiguada neutra. El tejido de pulmón fijo luego se somete a ceriterapia, seccionamiento delgado, teñido Masson Trichrome, y teñido HE en Bio Pathology Institute Co., Ltd. El tejido de patología se evalúa al medir el intercepto de línea media, que es un indicador objetivo del daño alveolar.

87

El intercepto lineal medio (L_m) se calcula utilizando la fórmula: $L_m = N \times L / m$, en donde N es el número de líneas transversales, L es la longitud de una línea transversal, y m es el número total de las paredes alveolares que se intersectan con las líneas transversales.

5

Análisis Estadístico

Para examinar las actividades de los fármacos, se desarrolla prueba Dunnett al comparar el grupo de control elastasa (Grupo B) con los Grupos C y D. Cada prueba se conduce de acuerdo con la prueba bilateral, y el nivel de significancia se establece a 5%. Se desarrolla la prueba utilizando el software SAS (SAS Institute Japón, R8.1). Los resultados se muestran en la Figura 1.

El intercepto lineal medido es $152.5 \pm 14.7 \mu m$ en el Grupo B, mientras que $115.2 \pm 17.3 \mu m$ en el Grupo C y $81.7 \pm 20.4 \mu m$ en el Grupo D. Se demuestran las actividades inhibitoras significativas de acuerdo con la dosificación de adiponectina (Media $\pm$ D.E., $P < 0.05$). En el Grupo A, el intercepto lineal es $73.0 \pm 6.6 \mu m$.

Los resultados revelan que la administración pulmonar continua de adiponectina tiene la actividad dependiente de dosis al reducir el incremento en el intercepto lineal medio originado por tratamiento de elastasa.

Específicamente, se confirma que la administración continua de adiponectina suprime el aumento del espacio aéreo alveolar originado por el progreso de cambios destructivos de las paredes alveolares.

La Figura 2 muestra las secciones de tejido que indican el progreso de cambios destructivos de las paredes alveolares. Esto revela que el progreso de la destrucción de la pared alveolar en los grupos que reciben la administración continua de adiponectina (Grupos C y D) se inhibe más obviamente que en el grupo de control (Grupo B), y esta actividad inhibitora es mayor en el Grupo de control D.

Específicamente, se confirma que la administración continua de adiponectina suprime el desarrollo de cambios destructivos de las paredes alveolares.

35

REIVINDICACIONES

[REIVINDICACIÓN 1] Un agente para inhibir el aumento del espacio aéreo alveolar, que comprende adiponectina.

5

[REIVINDICACIÓN 2] El agente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la adiponectina está contenida en una cantidad de 0.01 a 70 % en peso.

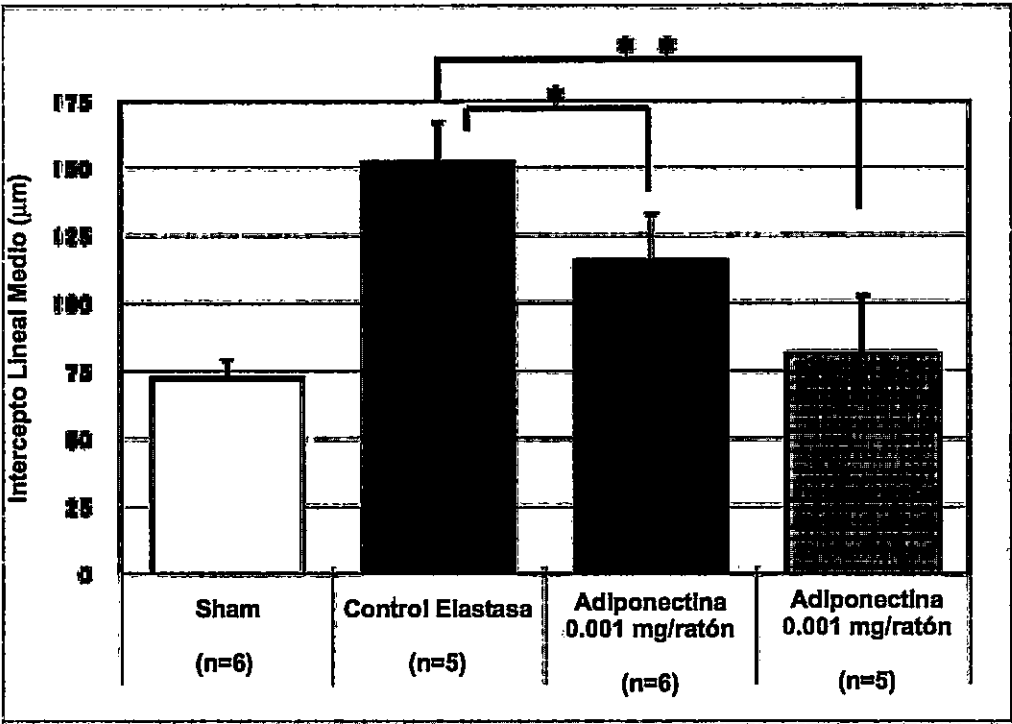
[REIVINDICACIÓN 3] Un agente para inhibir la destrucción de la pared alveolar, que
10 comprende adiponectina.

[REIVINDICACIÓN 4] El agente de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la adiponectina está contenida en una cantidad de 0.01 a 70 % en peso.

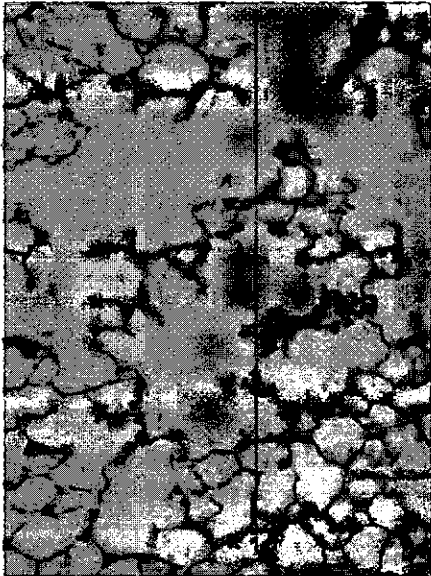
RESUMEN

La presente invención proporciona un agente para inhibir el aumento del espacio aéreo alveolar que contiene adiponectina o un agente para inhibir la destrucción de la pared alveolar que contiene adiponectina. Los agentes terapéuticos para enfermedad pulmonar de la presente invención son fármacos altamente seguros que poseen un efecto excelente para reducir el deterioro de la función pulmonar, tal como limitación del flujo de aire, y exhiben un efecto extremadamente alto para tratar la enfermedad pulmonar acompañada por el deterioro irreversible en la función pulmonar, con pocos efectos colaterales adversos tal como náusea, vómito y secreción de ácido gástrico.

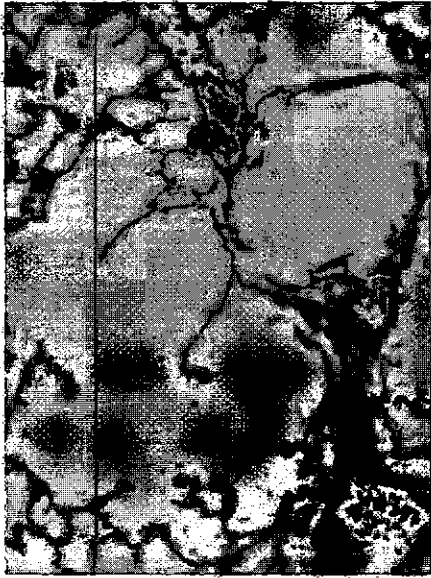
91



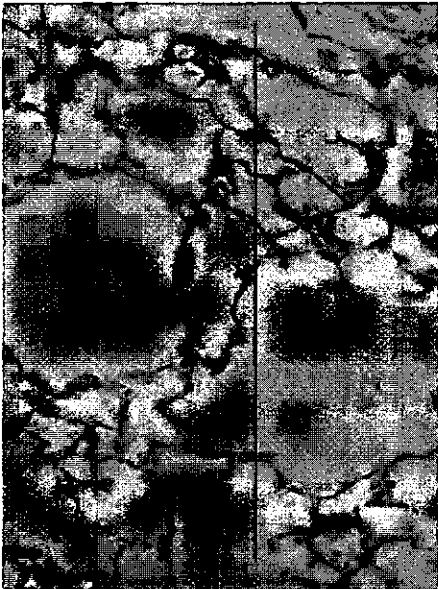
(Media ± DE) *: P<0.05 **: P<0.01 (prueba de Dunnett)



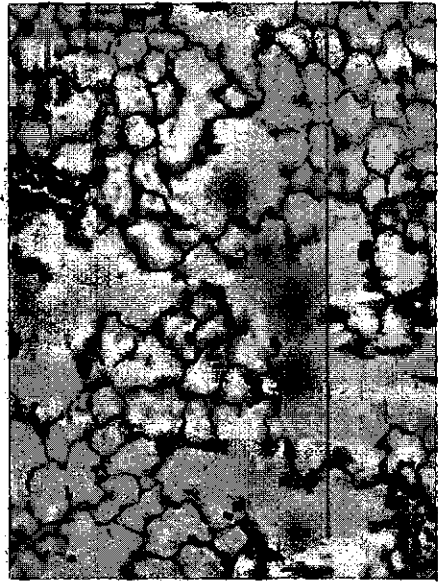
Sham



Control (Elastasa)



Adiponectina 0.001 mg/ratón (50 µ L)



Adiponectina 0.01 mg/ratón (50 µ L)

Masson-Tricromo

(x 400)

93

SEQUENCE LISTING

<110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
<120> AGENT FOR TREATING PULMONARY DISEASE
<130> P09-96
<150> JP 2008-217721
<151> 2008-8-27
<160> 7
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 244
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 1
Met Leu Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gly His
1 5 10 15
Asp Gln Glu Thr Thr Thr Gln Gly Pro Gly Val Leu Leu Pro Leu Pro
20 25 30
Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly
35 40 45
His Asn Gly Ala Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu
50 55 60
Lys Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Leu Ile Gly Pro Lys Gly Asp Ile
65 70 75 80
Gly Glu Thr Gly Val Pro Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly
85 90 95
Ile Gln Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Gly Ala Tyr Val Tyr Arg
100 105 110
Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Tyr Val Thr Ile Pro Asn Met
115 120 125
Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp
130 135 140
Gly Ser Thr Gly Lys Phe His Cys Asn Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe
145 150 155 160
Ala Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe
165 170 175
Lys Lys Asp Lys Ala Met Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Asn
180 185 190
Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu Glu Val Gly
195 200 205
Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Glu Gly Glu Arg Asn Gly Leu
210 215 220
Tyr Ala Asp Asn Asp Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr
225 230 235 240
His Asp Thr Asn

<210> 2
<211> 735
<212> DNA
<213> homo sapiens
<220>
<221> CDS
<308> Genbank No. D45371
<400> 2
atgtctgttc tgggagctgt totactgcta ttagctctgc ccgggcatga ccaggaaacc 60
acgaotcaag ggcccgaggt cctgcttccc ctgcccaagg gggcotgcac aggttgatg 120
gcgggcatcc cagggcaccc gggccataat ggggccocag gccgtgatgg cagagatggc 180
acccctggtg agaaggggtg gaaaggagat ccaggtctta ttggtcctaa gggagacatc 240
ggtgaaacog gactaocagg ggotgaaggt ccccgaggot ttocgggaat ccaaggcagg 300
aaaggagaac ctggagaagg tgcctatgta tacogctcag cattcagtggt gggattggag 360
acttacgtta ctatocccaa catgccatt cgctttacca agatcttcta caatcagcaa 420
aaccactatg atggctccac tggtaaattc cactgaaca ttctggggt gtactacttt 480

94

2/3

gcctaccaca tcacagtcta tatgaaggat gtgaagggtca gcctcttcaa gaaggacaag 540
gotatgotot toacctatga tcagtaaccag gaaaataatg tggaccaggc ctccggotot 600
gtgtcctgc atotggagggt gggcgaccaa gtctggotoc aggtgtatgg ggaaggagag 660
cgtaatggac tctatgctga taatgacaat gactccacct tcacaggott tcttctctac 720
catgacacca actga 735

<210> 3
<211> 247
<212> PRT
<213> Mouse
<400> 3

Met Leu Leu Leu Gln Ala Leu Leu Phe Leu Leu Ile Leu Pro Ser His
1 5 10 15
Ala Glu Asp Asp Val Thr Thr Thr Glu Glu Leu Ala Pro Ala Leu Val
20 25 30
Pro Pro Pro Lys Gly Thr Cys Ala Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly
35 40 45
Ile Pro Gly Ile His Val Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly
50 55 60
Thr Pro Gly Glu Lys Gly Glu Lys Gly Asp Ala Gly Leu Leu Gly Pro
65 70 75 80
Lys Gly Glu Thr Gly Asp Val Gly Met Thr Gly Ala Glu Gly Pro Arg
85 90 95
Gly Phe Pro Gly Thr Pro Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Ala Ala
100 105 110
Tyr Val Tyr Arg Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Arg Val Thr
115 120 125
Val Pro Asn Val Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln
130 135 140
Asn His Tyr Asp Gly Ser Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Asn Ile Pro Gly
145 150 155 160
Leu Tyr Tyr Phe Ser Tyr His Ile Thr Trp Met Lys Asp Val Lys Val
165 170 175
Ser Leu Phe Lys Lys Asp Lys Ala Val Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr
180 185 190
Gln Glu Lys Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu
195 200 205
Glu Val Gly Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Asp Gly Asp His
210 215 220
Asn Gly Leu Tyr Ala Asp Asn Val Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe
225 230 235 240
Leu Leu Tyr His Asp Thr Asn
245

<210> 4
<211> 744
<212> DNA
<213> Mouse
<220>
<221> CDS
<400> 4

atgtactgt tgcaagctct cotgttccto ttaatcctgc ccagtcacgc cgaagatgac 60
gttactacaa ctgaagagct agtcctgtct ttgtcccto caaccaaggg aacttgtgca 120
ggttggatgg caggcatccc aggacatcct ggccacaatg gcacaccagg cctgtatggc 180
agagatggca ctcttgaga gaaggagag aaaggagatg caggtcttct tggctctaag 240
gatgagacag gagatgttgg aatgacagga gctgaagggc cacggggott cccoggaacc 300
cotggcagga aaggagagcc tggagaagcc gcttatgtgt atcgctcagc gttcagtgtg 360
gggtggaga ccgogctcac tgttcccaat gtaccattc gotttactaa gatctctac 420
aaccaacaga atcattatga oggoagcaat ggcaagttct actgcaacat tccgggactc 480
tactacttct cttaccacat caoggtgtac atgaagatg tgaaggtag cctcttcaag 540
aaggacaagg ccgttctct cactacgac cagtatcagg aaaagaatgt ggaccaggcc 600
totggctctg tgctcctcca totggagggt ggagaccaag tctggctcca ggtgtatggg 660
gatggggacc acaatggact ctatgcagat aacgtcaacg actctacatt tactggcttt 720

cttctotacc atgataccaa ctga

<210> 5
<211> 1276
<212> DNA
<213> Mouse
<220>
<221> CDS
<222> (39) ... (782)
<400> 5

ctctaaagat tgcagtga tctgacgaca ccaaaagggc tcaggatgct actgttgcaa 60
gtctctctgt tctctttaat cctgccagat catgccgaag atgacgttac tacaactgaa 120
gagctagctc ctgctttggt cctccaccc aaggggaactt gtgcaggttg gatggcaggc 180
atcccaggac atootggoca caatggocaa ccaggccgtg atggcagaga tggcactcot 240
ggagagaagg gagagaaagg agatgcaggt cttcttggtc ctaagggtga gacaggagat 300
gttggaatga caggagctga agggccacgg ggttccccc gaacccctgg caggaaagga 360
gagcctggag aagccgctta tatgtatogc tcagcgttca gtgtgggct ggagaccgc 420
gtcactgttc ccaatgtacc cattcgcttt actaagatct tctacaacca acagaatcat 480
tatgacggca gcactggcaa gttactgc aacattccgg gactctacta cttctottac 540
cacatcacgg tgtacatgaa agatgtgaag gtgagcctct tcaagaagga caagccgtt 600
ctttcaact acgaccagta toaggaaaag aatgtggacc aggcctctgg ctctgtgctc 660
ctccatctgg aggtgggaga ccaagtctgg ctccaggtgt atggggatgg ggaccacaat 720
ggactctatg cagataactg caacgactct acatttactg gctttcttct ctaccatgat 780
accaactgac tgcactaco catagcccat acaccaggag aatcatgga cagtgcacac 840
actttcagct tagttgaga gattgattt attgcttagt ttgagagtc tgagtattat 900
ccacacgtgt actcactgt tcattaaacg actttataa aaataattg tttctotagt 960
ccagaaaaaa aggcactccc tggctccac gactcttaca tggtagcaat aacagaatga 1020
aaatocatt tggatgggg gcttcacaat attogcatga ctgtctggaa gtagaccatg 1080
ctattttct gctcactgta cacaatatt gttcacataa acoctataat gtaaatatga 1140
aatacagta ttaotottot cacaggctga gtgtatgaat gtctaaagac ccataagtat 1200
taaagtggta gggataaatt ggaaaaaaa aaaaaaaa agaaaaact tagagcacac 1260
tggggccgt tactag 1276

<210> 6
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<223> Oligonucleotide as primer (forward) sequence for adiponectin
<400> 6
aacatatggg goatgaccag gaaaccacg 29

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<223> Oligonucleotide as primer (reverse) sequence for adiponectin
<400> 7
aaggatcctc agttggtgct atggtagag 29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/JP2009/065380

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/087468 A2 (CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER [US]; MORROW ARDYTHE L [US]; MARTIN LISA) 2 August 2007 (2007-08-02) the whole document	1-4
A	MIYAZAKI T; SHIMADA K; MOKUNO H; DAIDA H: "Adipocyte derived plasma protein, adiponectin, is associated with smoking status in patients with coronary artery disease." HEART (LONDON), vol. 89, no. 6, June 2003 (2003-06), pages 663-664, XP002563657 ISSN: 1355-6037 the whole document	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 January 2010

Date of mailing of the international search report

04/02/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Engl, Brigitte

97

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No
PCT/JP2009/065380

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007087468 A2	02-08-2007	CA 2636724 A1	02-08-2007
		CN 101415461 A	22-04-2009
		EP 1981526 A2	22-10-2008
		JP 2009523173 T	18-06-2009
		US 2009197806 A1	06-08-2009

PATENT COOPERATION TREATY

98

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/JP2009/065380

International filing date (day/month/year)
27.08.2009

Priority date (day/month/year)
27.08.2008

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K38/17

Applicant
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 56.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Engl, Brigitte
Telephone No. +49 89 2399-8283



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/JP2009/065380

49

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

100

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/JP2009/065380

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/s.1(a)(I) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-4</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-4</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-4</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Concerning Section V:

The use of adiponectin for inhibiting alveolar airspace enlargement or inhibiting alveolar wall destruction has neither been taught nor suggested in the available prior art. Novelty and inventive step (Article 33 (2) and (3) PCT) can therefore be acknowledged for the claimed subject-matter.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information

For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.

Amending claims under Art. 19 PCT

Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.

Filing a demand for international preliminary examination

In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT).

If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).

Filing informal comments

After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.

End of the international phase

At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPEA (international preliminary examination report).

Relevant PCT Rules and more information

Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

Saegusa & Partners
Kitahama TNK Building, 1-7-1, Doshomachi,
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka
5410045
JAPON

Date of mailing (day/month/year)

28 January 2011 (28.01.2011)

Applicant's or agent's file reference

P09-96

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/JP2009/065380

International filing date (day/month/year)

27 August 2009 (27.08.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant☒ the inventor☐ the agent☐ the common representative

Name and Address

SADAKANE, Keiko
c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku,
Osaka-shi, Osaka
5410045
Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person☒ the name☐ the address☐ the nationality☐ the residence

Name and Address

KARASUTANI, Keiko
c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku,
Osaka-shi, Osaka
5410045
Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office☐ the International Searching Authority☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐

the International Preliminary Examining Authority

☒

the designated Offices concerned

☐

the elected Offices concerned

☐

other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Singh-Gautam Virendra

e-mail pt08.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 08

Facsimile No. +41 22 338 70 10

(21) N° de solicitud:				(51) Int Cl: A61K 038/017	
22) Fecha de solicitud:				(71) Solicitante(s) OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.	
(30) Prioridad	(31) Prioridad	(32) Fecha	(33) País	(72) Inventor(es) KOUNORI KOTOSAI Y OTROS	
	2008-217721	27/08/2008	JP	(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27/03/2011				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 04/03/2010	
Fecha de presentación de la solicitud: 27/08/2009				N° publicación: WO 2010/024460 A1	
No. de solicitud PCT/JP2009/065380					
(54) Título: ADIPONECTINA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD PULMONAR					

Reivindicación(es):

[REIVINDICACIÓN 1] Un agente para inhibir el aumento del espacio aéreo alveolar, que comprende adiponectina.

[REIVINDICACIÓN 2] El agente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la adiponectina está contenida en una cantidad de 0.01 a 70 % en peso.

[REIVINDICACIÓN 3] Un agente para inhibir la destrucción de la pared alveolar, que comprende adiponectina.

[REIVINDICACIÓN 4] El agente de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la adiponectina está contenida en una cantidad de 0.01 a 70 % en peso.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

106



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0023153

Bogotá D.C., Marzo 14 de 2011 - 16:53:20

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157700664	14/03/2011	51.804.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-036581- -00000-0000

Fecha: 2011-03-25 12:06:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 108

Código: 14055-841-012-6

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Corrutador: (571) 6870000 Fax: (571) 6870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6813240

Marzo 14 de 2011 - 16:53:31



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-036581-00000-0000
Fecha: 2011-03-25 12:08:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE/VII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 108

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño Industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO. , LTD.

REFERENCIA	Radicación No.	11 36581
	Solicitud internacional	PCT/JP2009/65380
	Fecha inicio fase nacional	27/03/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	13578
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

17 JUN. 2011



JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

adpall