



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 599**

51 Int. Cl.:
C07K 5/062 (2006.01)
C07K 5/072 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02723240 .4**
96 Fecha de presentación : **22.02.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1370276**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2003**

54 Título: **Compuestos que facilitan la comunicación intercelular y su uso médico.**

30 Prioridad: **22.02.2001 DK 2001 00127**
22.02.2001 US 792286
23.08.2001 US 314470 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.06.2011

73 Titular/es: **ZEALAND PHARMA A/S**
Smedeland 26B
2600 Glostrup, DK

72 Inventor/es: **Larsen, Bjarne, Due;**
Petersen, Jorgen, Soberg;
Meier, Eddie;
Kjolbye, Anne, Louise;
Jorgensen, Niklas, Rye;
Nielsen, Morten, Schak;
Holstein-Rathlou, Niels-Henrik;
Martins, James, B. y
Jensen Peter, Holme

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 360 599 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos que facilitan la comunicación intercelular y su uso médico

5 CAMPO DE LA INVENCION

- 10 [0001] La presente invención se refiere a péptidos nuevos que incluyen péptidos antiarrítmicos nuevos de estabilidad lineal mejorada in vitro y/o in vivo, a composiciones que comprenden dichos péptidos, y a usos de dichos péptidos para la preparación de medicamentos. La presente invención también se refiere a la utilización de compuestos que facilitan la comunicación intercelular para la preparación de medicamentos para el tratamiento de una serie de enfermedades caracterizadas por una comunicación intercelular por enlaces gap ("gap junction") dañada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 [0002] Los enlaces gap son regiones especializadas de la membrana celular con grupos de cientos a miles de canales de enlaces gap densamente empaquetados que conectan directamente el compartimento citoplasmático de dos células vecinas. Los canales de enlaces gap están compuestos de dos hemicanales (conexonas) proporcionadas por cada una de las dos células vecinas. Cada conexona consiste en seis proteínas denominadas conexinas (Cx). Las conexinas son una familia amplia de proteínas que comparten toda la estructura básica de
- 20 cuatro dominios transmembrana, dos bucles extracelulares y un bucle citoplasmático. Existe un grado elevado de conservación de los bucles extracelulares y dominios transmembrana ente especies e isoformas de conexina. La longitud del extremo C-terminal, sin embargo, varía considerablemente dando lugar a la clasificación de la conexinas en base al peso molecular. El canal de enlace gap puede conectarse entre un estado abierto y uno cerrado mediante un movimiento de giro. En el estado abierto los iones y las moléculas pequeñas pueden pasar a través del poro. La
- 25 conducción del impulso eléctrico y la difusión intercelular de moléculas de señalización tienen lugar a través de enlaces gap y por tanto los enlaces gap que funcionan normalmente son un prerrequisito para la comunicación intercelular normal. La comunicación intercelular normal es esencial para la homeostasis, proliferación y diferenciación celular.
- 30 [0003] La relación entre anomalías en conexinas y enfermedades se ha establecido en humanos tal como aparecerá en la siguiente sección. Un ejemplo es la enfermedad de Chagas causada por el parásito protozoario Trypanosoma cruzi. Esta enfermedad es la causa principal de la disfunción cardíaca en Latinoamérica. Se ha observado la distribución dañada de Cx43 en células infectadas por Trypanosoma cruzi y esta alteración puede estar implicada en la génesis de las alteraciones de la conducción que caracterizan la enfermedad [7].
- 35 [0004] En un organismo multicelular, la coordinación entre células es de importancia primordial. Entre los diversos medios de intercomunicación celular, los enlaces gap proporcionan la vía más directa. Los enlaces gap son un tipo de complejo de unión formado entre células adyacentes y consisten en canales agregados que se unen directamente con al interior (citoplasma) de células vecinas. En el mamífero adulto, los enlaces gap se hallan en la mayoría de tipos de células con una excepción conocida que son los elementos sanguíneos circulantes.
- 40 [0005] Se sabe relativamente poco sobre la estructura génica de las conexinas. Los resultados descritos para Cx43 de ratón revelaron que Cx43 contiene dos exones y un intrón localizado en la región 5' no traducida. Se han identificado varios supuestos sitios de unión a factor de transcripción en el promotor proximal 5'. Los estudios in vitro han mostrado que se podían producir canales permeables mediante hemicanales compuestos de diferentes parejas de conexinas. Por ejemplo, Cx43 puede producir canales funcionales con Cx32, Cx37, Cx40 y Cx45 y Cx endógenas de oocitos (Cx38), pero no con oocitos con Cx26. sin embargo, se sabe muy poco sobre sus propiedades, así como sobre la regulación de permeabilidad de estos heterocanales. Las Cx se expresan en la amplia mayoría de tejidos y las células individuales son capaces de expresar varias Cx diferentes. Los enlaces gap permeables se pueden
- 50 formar entre células que expresan diferentes tipos de Cx. De este modo, la comunicación intercelular por enlaces gap (GJIC) en tejidos parece ser muy importante para el mantenimiento de la integridad del tejido. Parece ser que varios genes producen los productos equivalentes para evitar la pérdida de GJIC debido a una mutación en uno de los genes.
- 55 [0006] Se ha descrito que el diámetro de poro del canal de enlaces gap formado se encuentra en el intervalo de 0,8-1,4 nm. Los enlaces gap son relativamente no selectivos y permiten el paso de moléculas de hasta aproximadamente 1000 Dalton. Dichas sustancias son, entre otras, iones, agua, azúcares, nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos, péptidos pequeños, fármacos y carcinógenos. El paso de los canales no requiere ATP y parece ser resultado de la difusión pasiva. Este flujo de materiales entre células a través de canales de enlaces gap es conocido como comunicación intercelular por enlaces gap (GJIC), que juega un papel importante en la regulación de metabolismo, proliferación y señalización célula a célula. Una de las implicaciones fisiológicas más importantes para
- 60

GJIC es que las células acopladas por enlaces gap en un tejido no sean individuales, entidades discretas, sino que estén muy integradas con sus vecinas. Esta propiedad facilita la homeostasis y también permite la transferencia rápida y directa de segundos mensajeros entre células para coordinar las respuestas celulares en el tejido.

5 **[0007]** El proceso de GJIC está regulado por un conjunto de mecanismos que se pueden dividir de manera amplia en categorías principales. En un tipo de regulación, la cantidad celular de enlaces gap está controlada por la influencia en la expresión, degradación, tráfico celular de conexinas a la membrana plasmática, o ensamblaje de conexinas en enlaces gap funcionales. La GJIC dañada causada por el desfavorecimiento de la expresión de conexinas, por ejemplo, en células tumorales, es un ejemplo de este modo de regulación. Otro tipo de regulación no
10 implica en general ninguna alteración importante de los niveles celulares de enlaces gap o conexinas, pero induce la apertura o cierre (“gating”) de los enlaces gap existentes. Los factores solubles extracelulares, tales como mitógenos (por ejemplo, DDT), hormonas (por ejemplo, catecolaminas), anestésicos (por ejemplo, halotano), biomoléculas intracelulares (por ejemplo, AMPc), y estrés celular (por ejemplo, estrés mecánico o metabólico) pueden dar lugar a este tipo de regulación. Adicionalmente, la GJIC está regulada durante el ciclo celular y durante la migración celular.

15 **[0008]** El modo de regulación o “gating” de enlaces de GJIC se ha estudiado ampliamente para los enlaces gap, especialmente enlaces gap compuestos de Cx43. Algunos factores ejercen sus efectos inhibidores sobre GJIC de manera indirecta, por ejemplo, mediante la alteración del medio lipídico y la fluidez de la membrana celular, mientras que otros inhibidores de GJIC incluyen oncogenes, factores de crecimiento y promotores de tumores, que inducen
20 varias modificaciones de la Cx43. La alteración de la permeabilidad de enlace puede ser necesaria para mediar en las funciones biológicas específicas del último grupo. Estos agentes inician complejos mecanismos de señalización que consisten en la activación de quinasas, fosfatasa y proteínas de interacción. El entendimiento de los mecanismos de acción de estos moduladores de GJIC no sólo definirá sus respectivos mecanismos de señalización responsables de la regulación del enlace, sino que también proporcionará herramientas para caracterizar las
25 funciones biológicas de GJIC y conexinas.

[0009] Los cambios en la fosforilación de sitios específicos del dominio carboxi terminal citoplasmático de Cx43 parecen ser fundamentales para la apertura y el cierre del canal de enlaces gap. La fosforilación del dominio carboxi terminal también puede ser importante para el proceso de llevar el hemicomplejo de enlaces gap Cx43 a la
30 membrana celular, su internalización y degradación. Las conexinas presentan una vida media (horas) que son mucho más cortas que la mayoría de proteínas de la membrana plasmática (días), por ejemplo, la vida media de Cx43 en el corazón de rata es inferior a 1 hora. De este modo, la regulación de la tasa de renovación sería un factor importante en la regulación de GJIC.

35 **[0010]** El dominio carboxi terminal contiene posibles sitios de fosforilación para múltiples proteínas quinasas (PKA, PKC, PKG, MAPK, CaMkII y tirosina quinasa). La fosforilación de estos sitios del dominio carboxi terminal da lugar al cierre de los canales de enlaces gap y varios inhibidores de canales de enlaces gap de Cx43 utilizan diferentes mecanismos de señalización para inducir la fosforilación del dominio carboxi terminal. El tipo de célula y el inhibidor particular determinan qué mecanismos de señalización utilizar y el tipo de la proteína quinasa implicada apunta al
40 sistema mensajero intracelular utilizado. De este modo, la activación de PKA requiere la implicación del sistema de segundo mensajero de AMPc mientras que PKC requiere la implicación del sistema de señalización intracelular de fosfoinositol.

[0011] Entre otros mecanismos de regulación del “gating” de canales se incluyen niveles intracelulares de iones
45 hidrógeno y calcio, voltaje entre enlaces (“transjuncional”) y radicales libres. Un pH o pCa disminuido inducen un cierre del canal de una manera específica de célula y conexina.

[0012] Se han propuesto muchas funciones fisiológicas además del control del crecimiento para GJIC. Homeostasis: GJIC permite el rápido equilibrio de nutrientes, iones y fluidos entre células. Esta podría ser la función más antigua,
50 extendida e importante para estos canales. Acoplamiento eléctrico: Los enlaces gap sirven como sinapsis eléctricas en células eléctricamente excitables, tales como miocitos cardíacos, células de músculo liso, y neuronas. En estos tejidos, el acoplamiento eléctrico permite una transmisión célula a célula más rápida de potenciales de acción que la sinapsis química. En los cardiomiocitos y las células del músculo liso, esto permite su contracción sincrónica. Respuesta del tejido a las hormonas: la GJIC puede aumentar la respuesta de los tejidos a estímulos externos. Los
55 segundos mensajeros, tales como nucleótidos cíclicos, calcio e inositol fosfatos son suficientemente pequeños para pasar desde las células hormonalmente activadas hasta células inactivas a través de canales de enlace y activar las últimas. Dicho efecto puede incrementar la respuesta del tejido a un agonista. La regulación del desarrollo embrionario: los enlaces gap pueden servir como mecanismos intercelulares para señales de desarrollo químico y/o eléctrico en embriones y para definir los límites de los compartimentos de desarrollo. La GJIC tiene lugar en patrones
60 específicos en células embrionarias y el deterioro de GJIC se ha relacionado con anomalías en el desarrollo y efectos teratogénicos de muchos productos químicos.

[0013] La comunicación intercelular asegura que las actividades de las células individuales tengan lugar de una forma coordinada e integran estas actividades en la dinámica de un tejido de trabajo que actúa en el organismo en que está establecido. Por tanto, no es muy sorprendente que una amplia variedad de condiciones patológicas se
5 hayan asociado con una disminución de la GJIC. Se ha establecido la relación entre las anomalías en las conexinas y un conjunto de estados patológicos tanto in vitro como in vivo. Un ejemplo es la regulación de la comunicación de enlaces gap por una citoquina proinflamatoria en el epitelio de las fosas nasales, donde Chanson M, Berclaz PY, Scerri I, Dudez T, Wernke-Dollries K, Pizurki L, Pavirani A, Fiedler MA, Suter S. (Am J Pathol 2001 May; 158(5):1775-84) hallaron que una disminución en la comunicación intercelular inducida por TNF-alfa conducía
10 progresivamente a la inflamación.

[0014] En resumen, existe suficiente evidencia que relacionan la disfunción, tal como el “gating” o el cierre o incluso la ausencia de enlaces gap con un aumento de riesgo de enfermedad. No existen actualmente fármacos disponibles para el tratamiento de dichas enfermedades que actúen como agente facilitador de la comunicación intercelular
15 facilitando o incrementando la función de enlaces gap. Sin embargo, en el pasado se ha descrito un grupo de péptidos (los péptidos antiarrítmicos) capaces de incrementar la conductancia de enlaces gap. Se presenta un resumen en el documento WO01/62775.

[0015] Los péptidos antiarrítmicos son un grupo de péptidos que ejercen su efecto de manera selectiva sobre
20 enlaces gap y, de este modo, disminuyen el desacoplamiento celular y también reducen la dispersión de duración del potencial de acción. Sin embargo, los AAP nativos, así como los AAP10 sintéticos, poseen varias características indeseadas, tales como, estabilidad baja, concentración efectiva baja, etc. que hasta ahora han evitado su utilización como fármacos. Grover y Dhein [21] han caracterizado dos conformaciones semicíclicas de AAP10 utilizando espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Por lo tanto, una estrategia para obtener un péptido antiarrítmico
25 estable podría ser la disposición de derivados cíclicos de péptidos antiarrítmicos. El documento DE19707854 describe aparentemente CF₃C(OH)-Gly-Ala-Gly-4Hyp-Pro-Tyr-CONH cíclico y CO-Gly-Ala-Gly-4Hyp-Pro-Tyr-CONH cíclico que tienen las mismas propiedades antiarrítmicas que AAP y AAP10, pero afirmaba que presentaba una mayor estabilidad en solución acuosa y después de ciclos repetidos de congelación y descongelación. Sin embargo, las condiciones experimentales descritas en el documento DE19707854 son insuficientes para la preparación de
30 dichos compuestos cíclicos y los datos de identificación química proporcionados en el mismo que utilizan HPLC no son suficientes para la identificación de dichos compuestos cíclicos. El documento US 4.775.743 describe HPS, un derivado peptídico que tiene la secuencia N-3-(4-hidroxifenil)propionil-Pro-4Hyp-Gly-Ala-Gly-OH y que es activo contra la aglutinación de plaquetas. Dhein y Tudyka [22] han revisado la bibliografía sobre péptidos que incluyen derivados peptídicos que pertenecen al grupo de péptidos antiarrítmicos para la actividad y la concentración, véase
35 la tabla 1 en el mismo, y hallaron que sólo 7 compuestos eran activos y, además, 4 compuestos eran débilmente activos. Sin embargo, se ha observado que ninguno de estos péptidos o derivados peptídicos son suficientemente estable para ser eficaces en una pauta terapéutica.

[0016] Los péptidos de la presente invención incrementan la comunicación intercelular por enlaces gap (GJIC) en
40 tejidos de vertebrados y específicamente en tejidos de mamíferos, y son útiles en el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades y dolencias en vertebrados, tales como mamíferos, en relación o causadas por una función disminuida de la comunicación intercelular por enlaces gap tal como se describe a continuación.

[0017] De este modo, la presente invención se refiere a prevenir o tratar enfermedades y condiciones médicas que
45 se caracterizan por una comunicación intercelular reducida o dañada, tal como la causada por una comunicación intercelular por enlaces gap dañada o un acoplamiento deteriorado mediante enlaces gap. Ejemplos de enfermedades y condiciones médicas son la inflamación de epitelio de las vías respiratorias, trastornos de tejido alveolar, incontinencia de la vejiga, discapacidad auditiva debido a enfermedades de la cóclea, lesiones endoteliales, retinopatía diabética y neuropatía diabética, isquemia del sistema nervioso central y médula espinal, trastornos del
50 tejido dental, incluyendo enfermedad periodontal, enfermedades de los riñones y deficiencias del trasplante de médula ósea tal como se ha mencionado anteriormente.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0018] En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que es acetil-Asn-Tyr-NH₂ hidroxiacetil-Asn-Tyr-OH/NH₂ o hidroxiacetil-Gly-Tyr-OH; y sales de los mismos. Estos compuestos son útiles como moduladores de
55 enlaces gap. Un compuesto particularmente preferido es hidroxiacetil-Asn-Tyr-NH₂, o una sal del mismo.

[0019] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un
60 compuesto de la presente invención, o una sal del mismo, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0020] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención para su uso en terapia.

5 [0021] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una comunicación intercelular por enlaces gap (GJIC) dañada. Se proporcionan ejemplos de dichas enfermedades en la descripción detallada y se indican en las reivindicaciones.

10 [0022] Los compuestos que son útiles en la presente invención comparten todos la característica de facilitar o mediar la GJIC en células y tejidos. Los mecanismos a través de los cuales se realiza esta mediación de GJIC puede variar ya que existen muchos mecanismos celulares que afectan al funcionamiento de conexinas y/o median en la función de enlaces gap. Estos mecanismos incluyen, por ejemplo

- control de la cantidad celular de enlaces gap mediante el favorecimiento normalización de la expresión de conexinas,

15 • inhibición de la degradación de enlaces gap y conexinas que incluyen la regulación de la tasa de renovación de conexinas mediante el incremento de la vida media,

- incrementar el tráfico celular de conexinas a la membrana plasmática,

- mediar en el ensamblaje de conexinas en los enlaces gap funcionales,

20 • inducir la apertura de enlaces gap existentes, por ejemplo cuando se han cerrado o "gated" por inhibidores. Este mecanismo se puede describir como la inversión del cierre del enlace gap realizado por inhibidores de GJIC que actúan a través de un mecanismo directo o indirecto, tal como, por ejemplo, la hiperfosforilación del dominio carboxi terminal citoplasmático de las conexinas, por ejemplo Cx43.

25 [0023] El dominio carboxi terminal contiene posibles sitios de fosforilación para múltiples proteínas quinasas (PKA, PKC, PKG, MAPK, CaMKII y tirosina quinasa). La fosforilación de estos sitios del dominio carboxi terminal da lugar al cierre de los canales de enlaces gap y varios inhibidores de canales de enlaces gap de Cx43 utilizan diferentes mecanismos de señalización para inducir la fosforilación del dominio carboxi terminal. El tipo de célula y el inhibidor particular determinan qué mecanismos de señalización se utilizan y el tipo de la proteína quinasa implicada apunta al sistema mensajero intracelular utilizado. De este modo, se ha descrito que la activación de PKA requiere la

30 implicación del sistema de segundo mensajero de AMPc mientras que PKC requiere la implicación del sistema de señalización intracelular de fosfoinositol.

[0024] Otros mecanismos de regulación del "gating" de canales incluyen niveles intracelulares de iones hidrógeno y calcio, voltaje entre enlaces ("transyuncional") y radicales libres. Un pH o pCa disminuido inducen un cierre del canal

35 de una manera específica de célula y conexina.

[0025] Dichos péptidos antiarrítmicos incluyen un grupo de péptidos que ejercen su efecto selectivamente en enlaces gap y, de este modo, disminuyen el desacoplamiento celular y reducen la dispersión de la duración del potencial de acción similar al efecto descrito anteriormente para el péptido antiarrítmico AAP10. La diana o receptor

40 molecular para los péptidos antiarrítmicos son actualmente desconocidos. Sin embargo, se ha realizado una hipótesis sobre la estructura del sitio de unión para AAP10 en un supuesto receptor por R. Grover y S. Dhein (Peptides 2001, 22 1011-1021). Se asume que un péptido que es útil en la presente invención es un agonista de un receptor para un péptido antiarrítmico, tal como AAP10, y que el efecto fisiológico de la interacción ente péptido y receptor es un acoplamiento celular incrementado a través de enlaces gap o un potenciamiento o mediación de la

45 GJIC. Sin embargo, existen muchos más mecanismos de señalización teóricos que pueden regular el funcionamiento de enlaces gap y los presentes inventores no desean ligarse a ninguna teoría específica tras la acción biológica de la modulación de GJIC.

[0026] En general, la presente invención proporciona compuestos para el tratamiento de enfermedades y

50 alteraciones en tejidos causados por un exceso de especies reactivas de oxígeno y/o radicales libres y/u óxido nítrico. Un ejemplo es la neuropatía diabética y heridas en las que los radicales libres provocan un agotamiento de glutatión y consecuentemente una reducción de enlaces gap, o un desacoplamiento de la comunicación de enlaces gap. El suministro bajo de oxígeno y/o una concentración elevada de radicales libres son significativos en heridas con tejido necrótico, en diabetes, en arteriosclerosis, en heridas quirúrgicas, edema, infección, heridas por

55 quemadura y en insuficiencia venosa disminuirá la comunicación por enlaces gap. Los radicales libres son importantes para la destrucción de terminales nerviosos, disminución de la conductancia, desmielinación y aumento de la respuesta inflamatoria. La pérdida de oído inducida por el ruido, presbiacusia, es conocida por estar asociada con la producción de radicales libres y está relacionada con la inhibición del acoplamiento de enlaces gap. El exceso de radicales libres también puede reducir la reparación endotelial y la aparición de capilares durante la angiogénesis.

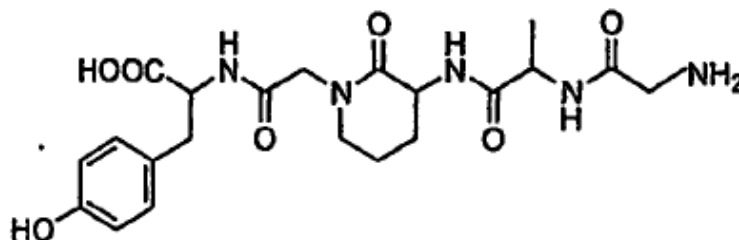
[0027] Específicamente, la presente invención se refiere a la utilización de un compuesto que facilita la comunicación celular, tal como la comunicación intercelular por enlaces gap, para la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de enfermedades y preferiblemente enfermedades no proliferativas, que incluyen, por ejemplo, inflamación del epitelio de las vías respiratorias, trastornos de tejido alveolar, heridas, disfunción eréctil, incontinencia de vejiga urinaria, discapacidad auditiva debido a enfermedades de la cóclea, lesiones endoteliales, retinopatía diabética y neuropatía diabética, dolor neuropático, isquemia del sistema nervioso central, lesiones de la médula espinal, trastornos del tejido dental, incluyendo enfermedad periodontal, enfermedades de los riñones, inflamación subcrónica y crónica, cáncer y deficiencias del trasplante de médula ósea trasplante con células madre.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0028] Los péptidos útiles en la presente invención incluyen algunos de los compuestos descritos en la tabla 1: Tabla 1. Compuestos de la invención tal como se definen en la reivindicación 1 y compuestos de referencia

Gly-Ala-6anillo-Tyr,
 Gly-Ala-Asn-Tyr,
 D-Tyr-D-Asn-D-Ala-Gly,
 D-Tyr-D-Asn-Gly,
 Gly-γAbu-Tyr,
 Gly-γAbu-D-Tyr,
 Gly-Gly-Tyr,
 Gly-Ala-Tyr,
 D-Tyr-D-Ala-Gly,
 Gly-D-Asn-Tyr,
 Gly-βAla-Tyr,
 βAla-βAla-Tyr,
 Gly-γAbu-Tyr,
 βAla-γAbu-Tyr,
 βAla-γAbu-D-Tyr,
 Gly-βAla-Phe,
 Gly-Pamh-Tyr,
 Gly-Pamh-D-Tyr,
 D-Tyr-Pamh-Gly,
 βAla-Pamh-Tyr,
 βAla-Pamh-D-Tyr,
 Gly-Asn-Phe,
 Gly-Ala-Gly-Pamh,
 Asn-Tyr,
 Ac-Gly-Tyr,
 Ac-Ala-Tyr,
 HAA-NY,
 HAA-GY,
 (Gly reducida)-Gly-Tyr (H₂N-CH₂-CH₂-NH-CH₂-C(O)-Tyr),

[0029] El compuesto Gly-Ala-6anillo-Tyr presenta la fórmula mostrada a continuación



Sales

[0030] Se prefiere que los compuestos de la invención se utilicen en forma de una sal farmacéuticamente aceptable o una amida. Las amidas de compuestos lineales están entre los compuestos preferidos de la invención. Entre las sales se incluyen sales farmacéuticamente aceptables, tales como sales por adición de ácido y sales básicas. Entre los ejemplos de sales por adición de ácido son sales clorhidrato, sales de sodio, sales de calcio, sales de potasio, etc. Entre los ejemplos de sales básicas se encuentran sales en las que el catión se selecciona entre metales alcalinos, tales como sodio y potasio, metales alcalinotérreos, tales como calcio, e iones $^+N(R^3)_3(R^4)$, donde R^3 y R^4 designan independientemente C_{1-6} -alquilo opcionalmente sustituido, C_{2-6} -alqueno opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido. Otros ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son, por ejemplo, las descritas en "Remington's Pharmaceutical Sciences" 17. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 y ediciones más recientes y en la Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

Definiciones

[0031] A lo largo de la descripción y las reivindicaciones se utiliza el código de tres letras para aminoácidos naturales, así como los códigos de tres letras generalmente aceptados para otros α -aminoácidos, tales como Sarcosina (Sar), ácido α -Amino-iso-butanoico (Aib), Naftilalanina (Nal), incluyendo 1-naftilalanina (1Nal) y 2-naftilalanina (2Nal), Fenilglicina Phg, ácido 2,4-Diaminobutanoico (Dab), ácido 2,3-Diaminopropanoico (Dapa), e Hidroxiprolina (Hyp). Cuando no se especifica nada, Hyp representa 4-hidroxiprolina. Los aminoácidos naturales o esenciales son los aminoácidos constituyentes de proteínas. Los aminoácidos aromáticos son Phe, Tyr, Trp, 1Nal, 2Nal e His. Cuando no se ha especificado la forma L o D debe entenderse que el aminoácido en cuestión tiene la forma natural L, véase Pure & Appl. Chem. Vol. 56(5) pp595-624 (1984). Cuando no se especifica nada, debe entenderse que el aminoácido C-terminal de un compuesto de la presente invención existe como ácido carboxílico libre, éste también puede especificarse como "-OH". El aminoácido C-terminal de un compuesto de la presente invención puede mostrarse que tiene la función terminal "-OH/NH₂", lo que significa que existen dos formas preferidas del compuesto: el ácido carboxílico libre y el derivado amidado.

[0032] Por "análogos funcionales" de péptidos antiarrítmicos se entiende cualquier entidad o compuesto químico que tiene una conformación estructural y/o propiedades de unión que son suficientemente similares a los AAP endógenos para proporcionar una o más de las propiedades antiarrítmicas o antitrombóticas beneficiosas de los AAP endógenos.

[0033] El término "heteroarilo" incluye grupos heterocíclicos monocíclicos aromáticos de 5 ó 6 miembros que contienen 1-4 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre, tales como pirrolilo, furilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, piridilo, y grupos heterocíclicos bicíclicos aromáticos que contienen 1-6 heteroátomos seleccionados ente nitrógeno, oxígeno y azufre, tal como quinolinilo.

[0034] El término "retro análogo" pretende significar un péptido cuya secuencia es el inverso del péptido mencionado.

[0035] El término "halógeno" se refiere a F, Cl, Br, e I, donde se prefieren F e I.

[0036] El término "alquilo" se refiere a grupos univalentes derivados de alcanos mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de cualquier átomo de carbono: C_nH_{2n+1} . Los grupos derivados mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono terminal de alcanos no ramificados forman una subclase de grupos alquilo normales (n-alquilo): $H[CH_2]_n$. Los grupos RCH_2 -, R_2CH - (R no es igual a H), y R_3C - (R no es igual a H) son grupos alquilo primarios, secundarios y terciarios, respectivamente. $C_{(1-22)}$ alquilo se refiere a cualquier grupo alquilo que tiene de 1 a 22 átomos de carbono e incluye $C_{(1-6)}$ alquilo, tal como metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, pentilo y hexilo y todos los posibles isómeros de los mismos. Por "alquilo inferior" se entiende $C_{(1-6)}$ alquilo, preferiblemente $C_{(1-4)}$ alquilo, más preferiblemente, metilo y etilo.

[0037] El término "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarburo lineal o ramificado o cíclico que contiene uno o más dobles enlaces carbono carbono. $C_{(2-22)}$ alqueno se refiere a cualquier grupo alqueno que tiene de 1 a 22 átomos de carbono e incluye $C_{(2-6)}$ alqueno, vinilo, alilo, 1-butenilo, etc.

[0038] El término "aralquilo" se refiere a aril $C_{(1-22)}$ alquilo y el término "arilo" a lo largo de esta memoria significa fenilo o naftilo.

HPP se refiere a hidroxifenilpropionilo

4HPP se refiere a 3-(4-hidroxifenil)propionilo

- 2HPP se refiere a 3-(2-hidroxifenil)propionilo
HAA se refiere a ácido hidroxiacético
4HPPA se refiere a ácido 4-hidroxifenoxiacético
2HPPA se refiere a ácido 2-hidroxifenoxiacético
- 5 4HMPA se refiere a ácido 4-(hidroximetil)fenoxiacético
4HPA se refiere a ácido 4-hidroxifenilacético
3HPA se refiere a ácido 3-hidroxifenilacético
2HPA se refiere a ácido 2-hidroxifenilacético
4HBG se refiere a N-(4-hidroxibenzoil)glicina
- 10 3HBG se refiere a N-(3-hidroxibenzoil)glicina
2HBG se refiere a N-(2-hidroxibenzoil)glicina
4HPG se refiere a N-(4-hidroxifenil)glicina
Ac se refiere al radical acetilo
Pc o PC se refiere al radical ácido L-pipecólico
- 15 Tfa se refiere al radical trifluoroacetilo
T4c se refiere al radical ácido L-tiazolidin-4-carboxílico
ASAL se refiere al radical 4-azidosaliciloilo
AB se refiere al radical 4-azidobenzoilo
HOBt se refiere a 1-hidroxibenzotriazol
- 20 HOAt se refiere a 1-Hidroxil-7-azabenzotriazol
Acm se refiere al radical Acetamidometilo
Pd(PPh₃)₄ es tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0)
DNP se refiere a dinitrofenilo.
Pamh se refiere a ácido 4-amino-6-metilheptanoico
- 25 Pamb se refiere a 4-aminometil benzoico
DBF se define como ácido 2-aminoetil-6-dibenzofuranpropionico
"6-anillo" se utiliza para 3-amino-1-carboximetilvalerolactama
yAbu se refiere a ácido gamma aminobutírico
- 30 **[0039]** Por la frase "residuo de aminoácido" se entiende una unidad de aminoácido natural, así como una unidad de aminoácido no natural, que aquí se representa por los códigos de tres letras generalmente aceptados para aminoácidos, tales Sarcosina (Sar), ácido alfa-Amino-isobutanoico (Aib), Naftilalanina (Nal) incluyendo 1-naftilalanina (1nal) y 2-naftilalanina (2Nal), Fenilglicina Phg, ácido 2,4-Diaminobutanoico (Dab), ácido 2,3-Diaminopropanoico (Dapa), e Hidroxiprolina (Hyp) y beta-Ala para beta-alanina. Cuando no se especifica nada Hyp o 4Hyp representa 4-
- 35 hidroxiprolina. Los aminoácidos naturales o esenciales son los aminoácidos constituyentes de proteínas y se pueden representar por el código de una letra aceptado generalmente. Los aminoácidos aromáticos son Phe, Tyr, Trp, 1Nal, 2Nal e His. Cuando no se ha especificado la forma L o D debe entenderse que el aminoácido en cuestión tiene la forma natural L, véase Pure & Appl. Chem. Vol. 56(5) pp595-624 (1984). Cuando no se especifica nada, debe entenderse que el aminoácido C-terminal de un compuesto de la presente invención existe como ácido carboxílico
- 40 libre, éste también puede especificarse como "-OH". El aminoácido C-terminal de un compuesto de la presente invención puede mostrarse que tiene la función terminal "-OH/NH₂", lo que significa que existen dos formas preferidas del compuesto: el ácido carboxílico libre y el derivado amidado. Debe entenderse que esta definición de residuo de aminoácido incluye compuestos, tales como DBF, T4c, Pc, DNP, y 3-amino-1-carboximetilvalerolactama que son de tipo aminoácido. DNP funciona como hapteno para el reconocimiento de anticuerpos y se pueden utilizar
- 45 preferiblemente como herramientas de investigación compuestos de la presente invención que contienen un grupo DNP.
- [0040]** El término "péptido mimético" se refiere a compuestos de naturaleza peptídica y no peptídica. El objetivo tras la creación de peptidomiméticos es crear "scaffolds" que pueden sustituir el esqueleto peptídico. Se asume que los
- 50 enlaces de amida secundaria en péptidos son responsables de la inestabilidad y las propiedades de transporte peptídico posiblemente escasas entre membranas celulares. La colocación adecuada de las cadenas laterales de aminoácidos con trayectorias apropiadas se observa como la táctica de diseño clave en peptidomiméticos de péptidos para conseguir la actividad biológica. Las modificaciones en el esqueleto incluyen enlaces amida reducidos y enlaces amida alquilados y la utilización de enlaces isostéricos, tales como enlaces tioamida, CH₂-CH₂, CH=CH,
- 55 etc.
- [0041]** El término "peptide" se refiere a compuestos que se pueden caracterizar por una similitud topológica entre la fórmula estructural del peptide y el péptido parental. De este modo, un peptide puede ser un compuesto que consiste en cadenas de tipo peptídica de aminoácidos con cadenas laterales en el átomo de nitrógeno del esqueleto
- 60 en lugar de en el carbono alfa como en los verdaderos péptidos. Los peptidomiméticos y peptides pueden comprender unidades de aminoácidos que tienen cadenas laterales modificadas, tales como Nal, Dab, y Dapa, o

pueden comprender D-aminoácidos. Las diversas modificaciones de la estructura de los péptidos y peptidomiméticos descritos por El Tayar, N et al. (Amino Acids (1995) 8: 125-139) se incluyen en las definiciones de la presente invención.

- 5 [0042] Los términos “compuesto que facilita la comunicación intercelular”, “facilitador de enlaces gap”, “compuesto que facilita la comunicación por enlaces gap” y “abridor de enlaces gap”, etc, se refieren todos a un compuesto que facilitar o media en la GJIC independientemente del mecanismo concreto tras la resultante GJIC mejorada o normalizada. Más específicamente, el término “abridor de enlaces gap” puede referirse a una sustancia que tras la estimulación de una célula que expresa conexinas produce una mayor conductancia del canal de enlaces gap que, a su vez, da lugar a un aumento en el intercambio de moléculas que son capaces de pasar a través de enlaces gap entre el espacio extracelular e intracelular y/o a una GJIC aumentada.

- 10 [0043] El término “agonista” se refiere a una sustancia endógena o un fármaco que puede interaccionar con un receptor e iniciar una respuesta fisiológica o farmacológica característica de ese receptor (contracción, relajación, secreción, activación de enzimas, etc.). Un “agonista de receptor de péptido antiarrítmico” o “agonista de AAP-R”, tal como se utiliza aquí, puede ser equivalente o no con un “abridor de enlaces gap” dependiendo del mecanismos biológico específico tras el efecto del compuesto.

Antecedentes generales sobre enlaces gap

- 20 [0044] En un organismo multicelular, la coordinación entre células es de suma importancia. Entre los diversos medios de intercomunicación celular, los enlaces gap proporcionan la vía más directa. Los enlaces gap son un tipo de complejo de enlaces formados entre células adyacentes y consiste en canales agregados que unen directamente el interior (citoplasma) de células vecinas. En el mamífero adulto, los enlaces gap se hallan en la mayoría de tipos de células con la excepción conocida de elementos sanguíneos circulantes.

- 25 [0045] La unidad estructural del canal de enlaces gap es el conexón o semicanal. Cada conexón está comprendido de seis polipéptidos conexina (Cx) que oligomerizan para formar un poro acuoso que abarca una única membrana plasmática. Para formar un canal de enlaces gap completo. Se alinean dos conexones de células adyacentes y se acoplan ente sí para formar un canal continuo que une el citoplasma de las dos células.

- 30 [0046] Las conexinas que forman canales de enlaces gap comprenden una familia de múltiples genes con por lo menos catorce conexinas de mamífero hasta la fecha. La expresión de conexinas es específica de tejidos y células, expresando algunas células múltiples isoformas de conexinas. La evidencia experimental sugiere que son posible dos configuraciones híbridas diferentes: canales heterotípicos célula a célula en los que cada conexón o semicanal consiste en una isoforma de conexina específica; o canales heteroméricos en los que cada conexón es una mezcla de las diferentes isoformas de conexinas expresadas en un tipo de célula particular. Las conexinas se expresan de una forma específica de célula, tejido y desarrollo.

- 40 [0047] Se sabe relativamente poco sobre la estructura génica de las conexinas. Los resultados aportados para el ratón Cx43 revelaron que Cx43 contiene dos exones y un intrón localizado en la región no traducida 5'. Un análisis posterior mostró que el punto inicial de la transcripción de Cx43 en ambos embriones y tejidos adultos. Se han identificado varios posibles sitios de unión a factores de transcripción en el promotor 5' proximal. Estudios in vitro han mostrado que se podían producir canales permeables por semicanales compuestos de diferentes parejas de Cx. Por ejemplo, Cx43 puede producir canales funcionales con Cx32, Cx 37 y Cx endógena de ovocitos (Cx38), pero con ovocitos de Cx26. Sin embargo, poco se sabe sobre sus propiedades, así como sobre la regulación de la permeabilidad de estos heterocanales. Las Cx se expresan en la gran mayoría de tejidos y las células individuales son capaces de expresar varias Cx diferentes. Se pueden formar enlaces gap permeables ente células que expresan diferentes tipos de Cx. De este modo, la comunicación intracelular por enlaces gap (GJIC) en tejidos parece ser muy importante para mantener la integridad del tejido. Parece que varios genes producen los productos equivalentes con el fin de evitar la pérdida de GJIC debido a una mutación en uno de los genes.

- 50 [0048] Se ha descrito que el diámetro de poro del canal de enlaces gap formado se encuentra en el intervalo de 0,8 a 1,4 nm. Los enlaces gap son relativamente no selectivos y permiten el paso de moléculas hasta aproximadamente 1000 Daltons. Dichas sustancias son, entre otras, iones, agua, azúcares, nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos, péptidos pequeños, fármacos y carcinógenos. El paso del canal no requiere ATP y parece resultar de la difusión pasiva. Este flujo de materiales entre células a través de canales de enlaces gap se conoce como comunicación intercelular por enlaces gap (GJIC), que juega un papel importante en la regulación del metabolismo celular, la proliferación y señalización célula a célula. Una de las implicaciones fisiológicas más significativas para la GJIC es que las células acopladas por enlaces gap en un tejido no son entidades discretas individuales, sino que están altamente integradas con sus vecinas. Esta propiedad facilita la homeóstasis y también permite la transferencia

rápida y directa de segundos mensajeros entre células para coordinar respuestas celulares en el tejido.

5 **[0049]** El proceso de GJIC está regulado por una serie de mecanismos que se pueden dividir ampliamente en dos categorías principales. El primer tipo de regulación controla la cantidad celular de enlaces gap mediante la influencia en la expresión, degradación, tráfico celular de conexinas a la membrana plasmática o ensamblaje de conexinas en enlaces gap funcionales. La GJIC dañada causada por el desfavorecimiento de la expresión de conexinas en células tumorales es un ejemplo de este modo de regulación. El segundo tipo de regulación no implica en general ninguna alteración importante de los niveles celulares de enlaces gap o conexinas, pero induce la apertura o cierre o “gating” de enlaces gap existentes. Los factores extracelulares solubles, tales como mitógenos (por ejemplo, DDT),
10 hormonas (por ejemplo, catecolaminas), anestésicos (por ejemplo, halotano), biomoléculas intracelulares (por ejemplo, AMPc) y estrés celular (por ejemplo, estrés mecánico o metabólico) pueden dar lugar a este tipo de regulación. Adicionalmente, la GJIC es regulada durante el ciclo celular y durante la migración celular.

15 **[0050]** El modo de regulación de GJIC o “gating2 de enlaces se ha estudiado ampliamente para enlaces gap, especialmente enlaces gap compuestos de conexina 43 (Cx43) y de este modo se utiliza como representante de todas las conexinas. Algunos factores ejercen sus efectos inhibidores sobre GJIC de forma indirecta, por ejemplo, alternado el medio lipídico y la fluidez de la membrana celular, mientras que otros inhibidores de GJIC incluyen oncógenos, factores de crecimiento y promotores de tumores, que inducen varias modificaciones de la Cx43. La alteración de la permeabilidad de enlaces puede ser necesaria para mediar las funciones biológicas específicas del
20 último grupo. Estos agentes inician complejos mecanismos de señalización que consisten en la activación de quinasas, fosfatasa y proteínas de interacción. Entender los mecanismos de acción de estos moduladores de GJIC no sólo se definirá sus respectivos mecanismos de señalización responsables para la regulación de enlaces, sino también proporcionará herramientas experimentales para caracterizar las funciones biológicas de GJIC y conexinas.

25 **[0051]** los cambios en la fosforilación de sitios específicos del dominio carboxi terminal citoplasmático de Cx43 parece ser fundamental en la apertura y el cierre del canal de enlaces gap. La fosforilación del dominio carboxi terminal también puede ser importante para el proceso llevar el semicomplejo de enlaces gap de Cx43 con la membrana de la superficie, su internalización y degradación. Las conexinas presentan vidas medias (horas) que son mucho más cortas que la mayoría de proteínas de la membrana plasmática (días), por ejemplo, la vida media de
30 Cx43 en corazón de rata es inferior a 1 hora. De este modo, la regulación de la velocidad de renovación sería importante en la regulación de GJIC.

[0052] El dominio carboxi terminal contiene posibles sitios de fosforilación para múltiples proteína quinasas (PKA, PKC, PKG, MAPK, CaMkII y tirosina quinasa). La fosforilación de estos sitios del dominio carboxi terminal da lugar al
35 cierre de canales de enlaces gap y varios inhibidores de canales de enlaces gap de Cx43 utilizan diferentes mecanismos de señalización para inducir la fosforilación del dominio carboxi terminal. El tipo de célula y el inhibidor particular determinan qué mecanismos de señalización utilizar y el tipo de proteína quinasa implicada apunta al sistema de mensajero intercelular utilizado. De este modo, se ha descrito que la activación de PKA requiere la implicación del sistema de segundo mensajero de AMPc, mientras que PKC requiere la implicación del sistema de
40 señalización intracelular de fosfoinositol.

[0053] Otros mecanismos que regulan el “gating” de canales incluyen niveles intracelulares de iones hidrógeno e iones calcio, voltaje ente enlaces (“transjuncional”) y radicales libres. Un pH o pCa disminuido inducen el cierre del canal de una manera específica de célula y conexina.
45

[0054] Se han propuesto muchas funciones fisiológicas además del control del crecimiento para la GJIC: Homeostasis. La GJIC permite el rápido equilibrio de nutrientes, iones y fluidos entre células. Ésta podría ser la función más antiguas, extendidas e importante para estos canales.

50 **[0055]** Acoplamiento eléctrico. Los enlaces gap sirven como sinapsis eléctricas en células eléctricamente excitables, tales como miocitos cardiacos, células musculares lisas, y neuronas. En estos tejidos, el acoplamiento eléctrico permite una transmisión célula a célula más rápida de potenciales de acción que sinapsis química. En los cardiomiocitos y células de músculo liso, esto permite su contracción sincrónica.

55 **[0056]** Respuesta de los tejidos a las hormonas. La GJIC puede aumentar la respuesta de los tejidos a los estímulos externos. Los segundos mensajeros, tales como nucleótidos cíclicos, calcio, e inositol fosfatos son suficientemente pequeños para pasar desde células activadas hormonalmente a células inactivas a través de canales de enlaces y activar las últimas. Dicho efecto puede aumentar la respuesta del tejido a un agonista.

[0057] Regulación de desarrollo embrionario. Los enlaces gap pueden servir como mecanismos intercelulares para señales de desarrollo químicas y/o eléctricas en embriones y para definir los límites de los compartimentos de desarrollo. La GJIC aparece en patrones específicos en células embrionarias y el deterioro de la GJIC se ha relacionado con las anomalías en el desarrollo y los efectos teratogénicos de muchos productos químicos.

5

[0058] La comunicación intercelular asegura que las actividades de las células individuales sucedan de forma coordinada e integren estas actividades en la dinámica de un tejido de trabajo que actúa en el organismo en que está establecido. Por tanto, no es muy sorprendente que una amplia variedad de condiciones patológicas se hayan asociado con una menor GJIC.

10

Farmacología

Indicaciones cardiacas

15 [0059] Tal como se indica en la descripción de los antecedentes de la invención, existe una amplia evidencia que apoyan un papel importante de la GJIC en cardiomiocitos bajo condiciones normales y patológicas. Las condiciones cardiacas específicas se describen a continuación y se presentan evidencias in vitro e in vivo para demostrar que los compuestos que incrementan la GJIC en el corazón son útiles para la prevención y/o tratamiento de una serie de condiciones patológicas en el corazón.

20

Arritmias por reentrada

[0060] La arritmia cardiaca está causada por un inicio de impulsos anormal o una conducción de impulsos anormal. Entre las arritmias con una conducción de impulsos anormal, las arritmias causadas por un mecanismo de reentrada son las más serias.

25

Reentrada ventricular:

30 [0061] La reentrada es la principal causa de fibrilación ventricular prolongada y muerte cardiaca súbita. La reentrada tiene lugar cuando la propagación de impulsos no finaliza después de la activación completa del corazón, sino que persiste para reexcitar el corazón después del final del periodo refractario. La inducción de la reentrada se facilita mediante una conducción lenta, una mayor dispersión de repolarización, una anisotropía no uniforme y un bloqueo de la conducción unidireccional. La enfermedad subyacente responsable de la mayoría de casos de reentrada ventricular es la enfermedad de corazón isquémico (por ejemplo, infarto de miocardio agudo, infarto de miocardio

35 crónico, angina de pecho estable y angina de pecho inestable). Durante la isquemia aguda, los canales de enlaces gap se cierran conduciendo a un desacoplamiento de células vecinas. Los cambios heterogéneos en la función de los canales de iones y los enlaces gap conducen a un aumento de la dispersión de la duración del potencial de acción y el periodo refractario efectivo especialmente en la zona límite que separa el área isquémica del miocardio normal. Se sabe de hace tiempo que un aumento de la dispersión de la duración del potencial de acción facilita la

40 inducción de fibrilación ventricular [23]. Normalmente, en células bien duplicadas, la diferencia en la duración del potencial de acción se estabiliza debido al acoplamiento eléctrico. Sin embargo, el desacoplamiento evitará esta estabilización y contribuirá a un desenmascaramiento de la dispersión de la duración del potencial de acción y el periodo refractario [24]. Si la isquemia se prolonga, se puede observar un grado reducido de expresión de Cx43 y un patrón cambiado de distribución. El cierre de los canales de enlaces gap durante la isquemia aguda, así como los

45 cambios en el patrón de expresión y distribución en isquemia crónica pueden conducir a una conducción lenta, una mayor dispersión, una anisotropía no uniforme y un bloqueo de la conducción unidireccional, facilitando así la inducción de las arritmias por reentrada. De este modo, estudios experimentales han mostrado una correlación entre el sitio de expresión y distribución de conexinas anormales y la localización de circuitos de taquicardia ventricular reentrante [25].

50

[0062] Las condiciones que favorecen el desarrollo de la reentrada, es decir una conducción lenta, un aumento de la dispersión de repolarización, una anisotropía no uniforme y un bloqueo de la conducción unidireccional están presentes en varios grados en un muchas otras enfermedades del corazón. De este modo, en la cardiomiopatía infecciosa o autonómica, la inflamación que tiene lugar puede conducir a la deposición de tejido fibroso en el

55 miocardio, creando de este modo focos de conducción lenta, mayor dispersión y posiblemente el bloqueo de la conducción unidireccional. La cardiomiopatía hipertrófica (por ejemplo, debido a la hipertensión, estenosis aórtica, congénita) puede dar lugar a arritmias por reentrada debido al desajuste entre la gran cantidad de tejido miocárdico y la cantidad relativamente pequeña de tejido conductivo que puede conducir a una conducción lenta, un aumento de la dispersión y un bloqueo de la conducción unidireccional. Las enfermedades congénitas (por ejemplo, el

60 síndrome de QT-largo) y los fármacos que prolongan el intervalo QT (por ejemplo, fármacos antiarrítmicos, fármacos

antipsicóticos, antihistaminas, fármacos antibacterianos, etc.) también incrementan la dispersión de la duración del potencial de acción posiblemente debido a la heterogeneidad de la distribución de canales de iones a lo largo de las diferentes capas del miocardio y es una causa principal muerte súbita inducida por reentrada en sujetos más jóvenes [26].

5

Reentrada auricular:

[0063] La fibrilación auricular – la arritmia cardiaca más común – también está causada por un mecanismo reentrante. En este caso, las múltiples ondeletas viajan a través de las aurículas y reexcitan el tejido que ya no es refractario. La fibrilación auricular puede persistir durante años y finalmente conducir a una remodelación de las aurículas. Una parte importante del proceso de remodelación son los cambios en la distribución de enlaces gap. De este modo, el patrón distribución de Cx40 se vuelve cada vez más heterogéneo. La evolución con el tiempo de los cambios en la distribución y el contenido de enlaces gap de Cx40 se correlacionan con un incremento en la estabilidad y la complejidad de AF y sugiere que la remodelación de enlaces gap de Cx40 podría estar implicada en la patogénesis de fibrilación auricular prolongada [27]. Además, varias líneas de evidencia apoyan la noción de que durante las condiciones con ralentización de la conducción auricular se eleva la susceptibilidad a la fibrilación auricular.

20

Alternancia de repolarización

[0064] La aparición de una alternancia de ondas T electrocardiográficas con un bombeo del corazón elevado o ataque metabólico se ha observado desde hace casi un siglo. La alternancia de ondas T macroscópicas se indica a menudo como un precursor de la muerte súbita arrítmica. Los trabajos recientes sugieren un mecanismo común que puede relacionar la presencia de una alternancia de repolarización discordante en el inicio de diversas arritmias reentrantes, dependiendo de la naturaleza anatómica del sustrato [28]. Bajo un estrés cronotrópico o metabólico, la fase de repolarización del potencial de acción miocárdial desarrolla una alternancia en la morfología y la duración. Con estrés adicional o en presencia de barreras estructurales, la alternancia de repolarización se vuelve espacialmente discordante. La alternancia discordante conduce a gradientes de repolarización suficientemente amplios para producir un bloqueo unidireccional y reentrada. Sin una barrera estructural, la reentrada es funcional y se manifiesta como una fibrilación ventricular o taquicardia ventricular polimórfica. En el establecimiento de una barrera estructural, la reentrada se puede fijar anatómicamente, dando lugar a una taquicardia ventricular monomórfica [29].

[0065] En resumen, parece que una sustancia, tal como los compuestos de la presente invención, que aumenta la conductancia por enlaces gap y hace que la anisotropía sea más uniforme, evitará arritmias por bloqueo unidireccional y reentrada. Dicha sustancia será útil en pacientes con circuitos de reentrada de origen tanto auricular como ventricular. Los pacientes con una alternancia de ondas T son propensos a arritmias por reentrada y una sustancia que aumenta el acoplamiento de enlaces gap y disminuye la anisotropía puede ser útil en la prevención de arritmias ventriculares letales en estos pacientes.

40

Arritmias Brady

[0066] Las arritmias Brady pueden estar causadas por una conducción ralentizada o un bloqueo de la conducción del nódulo sinoauricular, nódulo atrioventricular, haz de His o la rama derecha o izquierda del haz. La conexina principal responsable de la conductancia a través del sistema conductivo es Cx40. Los ratones homocigóticos para la inhibición del gen de Cx40 presentan una conducción auricular, atrioventricular y His-Purkinje significativamente más lenta y presentan un mayor riesgo de arritmias y bloqueo de la rama del haz. [4-6]. De este modo, los enlaces gap de Cx40 de funcionamiento normal son esenciales para el mantenimiento del ritmo normal.

[0067] Una sustancia, tal como los compuestos de la presente invención, que incrementa la conductancia de enlaces gap es útil en la prevención y/o el tratamiento de una conducción ralentizada en el corazón.

Contractilidad reducida

[0068] La contractilidad reducida es una característica común de muchas enfermedades coronarias crónicas. Durante el peor escenario, (es decir, una insuficiencia cardiaca de fase terminal), la contractilidad se reduce hasta un punto en que la fracción de eyección es tan baja que no se pueden mantener más las necesidades basales para la perfusión orgánica. La evidencia experimental, así como la clínica, ha demostrado que cambia la expresión y distribución de conexinas en los corazones de pacientes con insuficiencia cardiaca de fase terminal. De este modo, se desfavorece su expresión de forma significativa de la Cx43 con una distribución muy irregular en el tejido anormal. La expresión de Cx45, que bajo condiciones normales es muy limitada, aumenta de manera significativa en

fallos cardiacos; aunque, las propiedades conductivas de Cx45 son inferiores a las propiedades de Cx43 y, por tanto, no pueden compensar la reducción en Cx43. Una evidencia reciente indica que algunos canales reguladores de iones y receptores se concentran en sitios de unión intercelular y, por tanto, es altamente probable que los cambios en la expresión y distribución de Cx43 puedan afectar al acoplamiento de excitación-contracción y, de este modo, a la contractilidad [30]. Una evidencia firme de la relación entre la función de enlaces gap y la contractilidad es el hecho de que los ratones quiméricos formados a partir de células embrionarias sin Cx43 y blastocitos de tipo salvaje, que expresan de este modo una pérdida heterogénea de Cx43, desarrollan varios defectos contráctiles [31].

10 [0069] Se sugiere que una sustancia, que aumenta la conductancia de enlaces gap, mejorará la comunicación intercelular de los mediadores implicados en el acoplamiento de excitación-contracción y, de este modo, mejorará la contractilidad.

15 [0070] Algunos de los siguientes ejemplos son ejemplos comparativos. Sin embargo, las técnicas descritas en los ejemplos son aplicables a compuestos de prueba de la presente invención.

Ejemplo experimental 1

Efecto del Compuesto 2 sobre GJIC en cardiomiocitos

20 [0071] *Preparación celular:* Se aislaron células de corazones de cobaya mediante perfusión con colagenasa de acuerdo con el procedimiento de Langendorf. En resumen, se heparinizaron las cobayas con una inyección intraperitoneal de heparina (1000 IU/kg). Después de 30 minutos se sacrificó el animal mediante un golpe en el cuello seguido del corte de la espina dorsal por el cuello. Se abrió el tórax y se canuló la aorta. A continuación, se fijó la cánula a la aorta mediante una ligadura, se cortó y se perfundió con solución Tyrodes durante un par de minutos. 25 La solución Tyrodes tenía la siguiente composición en mM: Na^+ 135,33, K^+ 4, Cl^- 145, PO_4^- 0,33, Mg^{2+} 1, Ca^{2+} 2, Hepes 10, Glucosa 10, pH 7,4. Se burbujearon todos los medios de perfusión mediante oxígeno al 100%. Después de ello, se perfundió el corazón durante dos minutos con solución Tyrodes sin Ca^{2+} , seguido de perfusión durante dos minutos con una solución alta en K^+ que contenía en mM: Na^+ 20, K^+ 120, Cl^- 22, glutamato 120, Mg^{2+} 1, Ca^{2+} 25 μM , Hepes 10, Glucosa 10, pH 7,4.

30 [0072] A continuación, se perfundió el corazón con una solución alta en K^+ con colagenasa 0,6 mg/ml, esto se realizó durante 10-15 minutos a juzgar por la apariencia del corazón. Se cortaron las aurículas, se trocearon los ventrículos, a continuación se agitaron las piezas en la solución de colagenasa mediante burbujeo suave oxígeno al 100%. A continuación, se pasaron las células a través de un tamiz para aislar las células liberadas, y se extrajo la colagenasa mediante centrifugación. Se resuspendieron las células en solución Tyrodes sin Ca^{2+} y se incrementó lentamente el Ca^{2+} hasta 0,65 mM. Se guardaron las células en esta solución a temperatura ambiente hasta transferir a la cámara experimental. 35

40 [0073] *Electrofisiología:* se montan los cubreobjetos en una cámara abierta en la platina de un microscopio invertido, en el que las células están superfundidas con solución salin tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco a 1 ml/min, 37°C. La solución contiene (en mM): Na^+ 152, K^+ 4,2, Cl^- 141,5, PO_4^{3-} 9,5, Ca^{2+} 0,9, Mg^{2+} 0,5, pH 7,2. Se estiran pipetas para un fijador ("clamp") de parches a partir de capilares de vidrio de 1,5 mm (GC150F-15, Harvard Apparatus) en un estirador de microelectrodos Sutter Flaming-Brown P-87 y se pulen con fuego hasta una resistencia de 4-6 M Ω . Se llenan las pipetas con una solución de tipo intracelular que contiene en mM: K^+ 145, Na^+ 15, Cl^- 5, Gluconato- 153, Piruvato 5, EGTA 1, HEPES 5, Ca^{2+} 0,42 mM, Mg^{2+} 1,6, pH 7,2. Se añade a esta solución de amfotericina B (240 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a partir de una solución madre de 60 mg/ml (Disolvente: DMSO). 45

50 [0074] La preparación del "clamp" de parches consiste en dos amplificadores discontinuos (SEC-05LX, NPI electronics) sincronizados y los datos se digitalizan utilizando una interfaz INT-10 (NPI electronics) y un panel de adquisición de datos PC1200 (National Instruments). Se filtran a paso bajo ambas señales de corriente y voltaje a 1 kHz utilizando los filtros internos de los amplificadores y se digitalizan a 10 kHz.

55 [0075] Se aproxima una célula de un par con un electrodo utilizando un micromanipulador PatchMan 5173 (Eppendorf). Cuando se obtiene el contacto con la célula (visto como un incremento repentino en la resistencia de entrada), se aplica succión hasta que se establece la configuración de sellado Giga. A continuación, se repite este procedimiento en la otra célula. A continuación, se rompe la membrana bajo las pipetas mediante una aplicación breve de succión y se fija el potencial del interior celular a -70 mV, que está cerca del potencial de membrana espontáneo de las células. Se hiperpolariza consecutivamente cada una de las células cada 10 segundos mediante 10 mV durante 1 segundo y el cambio de corriente resultante en la otra célula pueda utilizarse para calcular la conductancia intercelular (G_j) utilizando la fórmula: 60

$$G_j = \frac{\Delta I_p}{\Delta U_j} = \frac{I_{p, pulso} - I_{p, resto}}{U_p - U_a} \quad (\text{Ecuación 1})$$

5

[0076] Donde $I_{p,pulso}$ y $I_{p,resto}$ representan la corriente en la célula pasiva durante el pulso y antes del pulso respectivamente, y U_p y U_a representan el voltaje de la célula pasiva y activa. Este tipo de experimentos no permite comparación en valores de G_j absolutos debido a las diferencias en el contacto célula a célula y por tanto la cantidad de canales de enlaces gap funcionales. No obstante, puede analizarse el cambio en el valor de G_j a una intervención estandarizada como un fármaco mediante la comparación de los cambios relativos en G_j .

[0077] *Resultados:* En la figura 2 se resumen los resultados de nueve experimentos exitosos. Esta figura muestra la G_j relativa como una función de tiempo antes y durante la estimulación con Compuesto 2 (10^{-8} M). En los cinco experimentos en los que se trató las células con Compuesto 2, el compuesto produjo un incremento significativo en G_j , el cual alcanzó un nivel estable después de aproximadamente 400 segundos de estimulación ($\Delta G_j = +120 \pm 46\%$). No cambió la conductancia en las cuatro preparaciones tratadas con vehículos ($\Delta G_j = -3 \pm 5\%$).

[0078] Estos descubrimientos concuerdan con los experimentos descritos en la técnica que utilizan el análogo de AAP sintético AAP10, que muestran un acoplamiento eléctrico incrementado entre los cardiomiocitos después de la estimulación [32]. No obstante, en el estudio de Müller *et al.* [32], la conductancia de los enlaces gap no fue estable durante las condiciones control. De este modo, en tres de los seis experimentos la aplicación de AAP10 no incrementó la conductancia, pero previno el agotamiento de la conductancia de enlaces gap y en dos de los seis experimentos se incrementó realmente la conductancia de enlaces gap durante el periodo de control. En los experimentos presentados en la presente invención, el Compuesto 2 incrementó la conductancia de enlaces gap en preparaciones con condiciones de control estables.

Ejemplo experimental 2

30 Unión de Compuesto 2 a preparaciones de tejido de corazón murino

Preparación

[0079] Se extirpan los corazones de los ratones (Balb/cJ, 20 g), se enjuagan dos veces en sacarosa 0,32 M congelada (0°C) y se homogeniza en hielo en 10 volúmenes de sacarosa con un homogenizador Ultra Turrax (1000 rpm) durante 2 minutos. Se centrifuga el homogenado a 1000 g_{media} durante 10 minutos a 4° C y se recoge el sobrenadante y se filtra a través de 4 capas de gasa. A continuación, se centrifuga el filtrado a 50.000 g_{media} durante 45 min a 4°C y se resuspende el residuo en 10 vol_{org. en peso mojado} de agua destilada congelada y se incuba durante 60 min a 0° C y se recentrifuga a 50.000 g_{media} durante 45 min a 4°C. El residuo resultante se resuspende en 2 vol_{org. en} peso mojado de PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se conserva a -80° C hasta su uso.

Experimentos de sustitución con Compuesto 2

[0080] Se incuban 40-250 µg de filtrado o material de membrana en un volumen total de 100 µl de D-PBS (Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco que contiene $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 g/l y $CaCl_2$) que contiene [^{125}I]AAP10 0,8 nM y una concentración creciente de los compuestos de análisis AAP y el Compuesto 2. Se determina la unión no específica a AAP10 (CE2) 10 µM.

Cálculos

50

[0081] Los datos de los experimentos de sustitución se ajustan a la ecuación:

$$f = (\text{Total} - ns) / (1 + s / IC_{50}) + ns$$

55 en el que *Total* es la radioactividad de unión total a concentración *s* de ligando marcado, *ns* es unión no específica y IC_{50} es la concentración del compuesto de análisis que reduce la unión específica (Total - ns) hasta un 50% de unión específica máxima.

Resultados

[0082] Tabla 2. Substitución de [¹²⁵I]AAP10 0,8 nM de preparaciones de tejido de corazón murino (n.t.: no probado).

Compuestos de la prueba	Filtrado IC ₅₀ (nM)	Membranas IC ₅₀ (nM)
AAP	1,2	n.t.
AAP10 (CE 2)	1,2	n.t.
Compuesto 2	3,6	1,2

5

[0083] Los valores dados en la Tabla 2 superior están en el mismo orden de magnitud (0,2 nM) que los dado para AAP10 por Dhein et al. [33] utilizando membranas de corazón de conejo.

Método de unión in situ en células intactas

10

Cultivos de células CHO

[0084] Las células CHO se siembran en placas de 24 pocillos en una densidad de 7.900 células/m² (~ 15.000 células/pocillo) y se desarrollan durante 3 días in vitro (DIV) en 1 ml/pocillo de Mezcla de Nutrientes F-12K suplementado con Suero de Ternera Fetal (FCS) al 10% y 1000 unidades de penicilina/1000 µg de estreptomycin (pen/estrep) en una atmósfera de CO₂ al 5% CO₂ y una humedad al 100% a 37°C. La densidad celular se incrementa en ese punto hasta 295.000 células/cm² (152 pg_{prot}/célula ~ 85 µg_{prot}/pocillo).

15

Pretratamiento

20

[0085] En el día del análisis, las células se extraen del incubador y cada pocillo se lava dos veces con, dependiendo del experimento, 2 ml de D-PBS precalentada (37 °C) o enfriada en hielo (0 °C) para eliminar el suero. Es importante mantener el periodo al mínimo durante el cual las células se dejan sin soluciones fisiológicas para evitar que se resequen durante los procedimientos de lavado. Las células lavadas en frío se utilizan directamente para ensayos de unión mientras que las células lavadas en caliente se utilizan para experimentos con privación de glucosa y oxígeno.

25

Privación de glucosa y oxígeno

[0086] Las células se incuban durante 10 min en una atmósfera de N₂ en D-PBS libre de glucosa (pH 7,2) preequilibrada con N₂ durante como mínimo 10 min a 37°C. Las células de control de incuban igualmente durante 10 min, sólo, en condiciones atmosféricas normales y en D-PBS que contenía glucosa (6 mM).

30

Ensayo de unión

[0087] La unión in situ se realiza mediante un protocolo modificado basado en la descripción de Koenig [34]. Se elimina D-PBS del cultivo celular y se añaden 0,50 ml de una solución de [¹²⁵I]AAP10 con o sin ligando no marcado o compuesto de prueba. Las células se incuban durante la noche a 4°C hasta alcanzar el equilibrio. Cada pocillo, uno cada vez, se enjuagan a continuación rápidamente con 2 x 1 ml D-PBS y se dejan secar.

35

[0088] Se añaden 0,25 ml de Triton-X-100 al 0,5% (v/v) a cada pocillo y se deja que las células se solubilizan durante por lo menos una hora. El extracto se transfiere a viales de recuento, los pocillos se enjuagan con 0,25 ml de agua y el extracto del enjuagado se añade a los correspondientes viales. Los viales se cuentan con un contador γ

40

Tabla 3. Unión *in situ*, IC₅₀ (nM)

Compuestos de prueba	IC ₅₀ (nM)
AAP (CE1)	0,8
AAP10(CE2)	130
Compuesto 2	0,5
Compuesto 32	0,5
Compuesto 24	65

[0089] Estos resultados demuestran una unión de afinidad elevada a células CHO por diversas sustancias diferentes de la presente invención comparables con los péptidos de la técnica anterior.

Ejemplo experimental 3

5

Efecto del compuesto 2 en la formación de AMPc en células CHO

Cultivos de células CHO

10 [0090] Se siembran células CHO en placas de microtitulación de 96 pocillos en una densidad de 6.000 células/cm² (~ 2.000 células/pocillo) y se desarrollaron durante 4 días in vitro en 200 µl/pocillo de medio de crecimiento tal como se ha descrito en la sección anterior.

Pretratamiento

15

[0091] En el día del análisis, las células se extraen del incubador y se lavan dos veces con 200 µl de D-PBS precalentada (37 °C) (pH 7,2) para eliminar el suero. Las células se incuban durante 10 minutos en D-PBS libre de glucosa y una atmósfera de N₂ tal como se ha descrito en la sección anterior.

20 Ensayo de eficacia de AMPc

[0092] Las células CHO se incuban a 37°C en D-PBS (pH 7,2) que contenía glucosa 6 mM, IBMX (bloqueador de fosfodiesterasa) 2,0 mM, forskolina (estimula la formación de AMPc) 10 µM y concentraciones crecientes del péptido de prueba. La reacción se detiene después de 20 minutos mediante la adición de 20 µl de HCl 0,5 M y se dejó durante por lo menos 20 minutos a temperatura ambiente.

[0093] El contenido de AMPc se analiza mezclando 20 µl del extracto celular ácido en pocillos FlashPlate™ (kit de ensayo NEN SMP001) que contenía 180 µl de solución rastreadora [¹²⁵I]AMPc. Los pocillos FlashPlates™ se incuban durante la noche a 4°C y se contó la radiactividad unida a las placas en TopCount (Packard Instrument). Los datos se calculan tal como se ha descrito en la sección anterior.

Resultados

35 [0094] La inhibición de la formación de AMPc estimulada por forskolina de compuestos de tipo APP en células CHO indica que los receptores de AAP se acoplan negativamente al sistema de segundo mensajero de AMPc. Además, se demuestra la presencia de receptores de AAP funcionales en células CHO.

Tabla 4. Inhibición de la formación de AMPc estimulada por forskolina en células CHO

Compuestos de prueba	EC ₅₀ (nM)
AAP	53
AAP10 (CE2)	11
Compuesto 2	6,2

Ejemplo experimental 4

40

Análisis del fosfoinositol en cardiomiocitos primarios de rata

Cultivo de cardiomiocitos primarios

45 [0095] Se utilizan ratas Wistar neonatales (1-2 días de vida). Se utiliza una solución salina de Hank equilibrada libre de calcio y magnesio, tamponada con HEPES 10 mM para lavar durante los procedimientos de separación celular. Se extirpan los corazones, se aíslan los ventrículos y el tejido se corta en piezas pequeñas. Las células del miocardio se aíslan mediante una degradación enzimática por etapas con colagenasa al 0,05% tal como se describe en [35]. Después de rondas repetidas de centrifugación y lavado, las células precipitadas se resuspenden en medio de cultivo M199 con sal de Earle, NCS al 10%, penicilina (75 U/mL), y estreptomina (75 U/mL) y se preplacaron en una placa de Petri durante 90 minutos. Las células no adherentes se recogen en el medio de cultivo y se emplaca en multiplacas 2,5*10⁵ células/pocillo. Los cultivos se mantienen en un incubador de CO₂ saturado en agua a 37°C. Los cultivos de cardiomiocitos se utilizan para análisis después de 6-7 días.

Análisis del recambio de fosfoinositol

- [0096]** Se incuban cultivos de cardiomiocitos durante 48 horas en medio de cultivo que contenía 4 $\mu\text{Ci/mL}$ mio-[2-³H]inositol para marcar los fosfolípidos de inositol. En el día del análisis, el medio se sustituye por una solución tampón que contiene litio y se incuba a 37°C, tal como se ha descrito por Meier et al. [36]. Después de por lo menos cinco minutos, este tampón se sustituye por el mismo volumen de tampón que contiene el compuesto de prueba y se incuba durante exactamente 20 minutos. La reacción se detiene mediante la sustitución rápida del tampón por ácido perclórico (PCA) al 4% v/v enfriado en hielo y la incubación durante por lo menos 20 minutos a 0°C. El PCA-extracto se neutraliza y los [³H]inositol fosfatos se separan mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando columnas Amprep™ que contienen 100 mg de amina cuaternaria SAX. Los [³H]inositol mono-fosfatos se eluyen y se mide la radioactividad en la fracción mediante recuento por centelleo líquido.

Privación de glucosa y oxígeno

- [0097]** Antes de añadir las sustancias de prueba a los cultivos, las células se agotan en glucosa y oxígeno mediante su incubación en una atmósfera de N₂ en tampón de litio libre de glucosa durante 10 minutos a 37°C. Así mismo, las células de control se incuban solamente en condiciones atmosféricas normales y en un tampón que contiene glucosa.
- [0098]** La noradrenalina (NA) estimula el recambio de fosfoinositol en los cultivos de cardiomiocitos de una manera dependiente de la concentración. Sin embargo, la capacidad de la noradrenalina (300 nM de NA) para estimular el recambio de fosfoinositol se reduce de manera considerable en cultivos después de 10 minutos de privación de glucosa y oxígeno tal como se muestra en la figura 3.
- [0099]** Bajo condiciones atmosféricas y nutricionales normales, se obtuvo un valor E_{max} de 3852 ± 266 cpm y un valor EC₅₀ de 203 nM (SDR = 1,2), mientras que en células sometidas a una atmósfera de N₂ y agotadas en glucosa, se observó un valor E_{max} de 2248 ± 702 cpm y un valor EC₅₀ de 303 nM (SDR = 1,7).

- [0100]** Para examinar el efecto de las sustancias de la presente invención en el incremento atenuado inducido por noradrenalina en el recambio de fosfoinositol durante estrés celular inducido por isquemia y privación de glucosa, se añadieron el compuesto 2 o AAP10 (CE2) a los cultivos de cardiomiocitos. Ambas sustancias aumentaron de forma potente el recambio de fosfoinositol, siendo el compuesto 2 el más potente. Tal como se muestra en la tabla 5 siguiente, el valor EC₅₀ para AAP10 (CE2) era 200 veces superior durante la normoxia y 10 veces superior durante el estrés metabólico inducido por anoxia y la privación de glucosa que el valor de EC₅₀ para el compuesto 2.

- Tabla 5. Aumento del recambio de fosfo-inositol durante estrés metabólico inducido por anoxia y privación de glucosa por el compuesto y AAP10

	EC50 (nM) AAP10 (CE2)	EC50 (nM) Compuesto 2
Condiciones normales	2000	10
Privación de glucosa y oxígeno	100	10

- [0101]** La adición del compuesto 2 (100 nM) no presentaba un efecto adicional en el incremento inducido por noradrenalina (300 nM) en el recambio de fosfoinositol en cardiomiocitos de ratas neonatales durante las condiciones de control, pero en células sometidas a anoxia y privación de glucosa (estrés metabólico), la adición del compuesto 2 (100 nM) + noradrenalina (300 nm) normalizaba el recambio de fosfoinositol alterado tal como se muestra en la figura 4, un incremento que era aproximadamente un 70% superior que el incremento realizado por la noradrenalina sola.

Ejemplo experimental 5

Modelo de arritmia inducida por calcio en ratones

- [0102]** Los efectos antiarrítmicos de compuestos de la presente invención se analizó en un modelo in vivo de arritmias inducidas por calcio según el modelo de Lynch et al. [37]. Los ratones (25-30 g) se anestesiaron con una combinación anestésica neuroléptica (Hypnorm® (citrato de fentanilo 0,315 mg/ml y fuanisona 10 mg/ml) + midazolam (5 mg/ml)). Las soluciones comerciales de hypnorm y midazolam se diluyeron 1:1 en agua destilada y una parte de Hypnorm® diluido se mezcla con una parte de midazolam diluido.

[0103] La anestesia se indujo mediante la administración s.c. en una dosis de 0,05- 0,075 µl/10 gramos de ratón. Se insertó una cánula i.v. en la vena de la cola. Se registró de manera continua la señal de ECG de derivación II mediante la colocación de electrodos ECG de acero inoxidable en la pata delantera derecha y en la pata trasera izquierda. El electrodo de tierra se colocó en la pata trasera derecha. La señal se amplificó (x 5.000-10.000) y se filtró (0,1-150 Hz) mediante un módulo ECG 689 del modelo Hugo Sachs Electronic. Se digitalizó una señal análoga a través de una placa de adquisición de datos de 12 bits (Traducción de Datos modelo DT321) y se muestreó a 1000 Hz utilizando el software Notocord HEM 3.1 para Windows NT. Después de un periodo de equilibrado de 10 min, la muestra de prueba del fármaco se inyectó en la vena de cola. Los ratones pretratados con el vehículo se analizaron como medida del nivel de control en animales no tratados. El volumen de inyección fue de 100 µl en todos los experimentos. Se inició la infusión de CaCl₂ (30 mg/ml, 0,1 ml/min ≈ 100 mg/kg/min (cloruro de calcio 2-hidratado, Riedel-de Haën, Alemania)) 3 min después de la administración i.v. del fármaco o el vehículo. El periodo de tiempo para el inicio del bloqueo AV de segundo grado se determinó como el tiempo desde el inicio de la infusión de CaCl₂ hasta la aparición del primer suceso arritmico. Un suceso de bloqueo AV de segundo grado se definió como una insuficiencia intermitente de la conducción AV caracterizada por una onda P sin el complejo QRS concomitante.

[0104] Las respuestas se expresaron en relación con el tiempo transcurrido hasta el bloqueo AV de segundo grado en los ratones tratados con vehículo. El efecto máximo de cada una de las sustancias analizadas se resume en la tabla 6 siguiente.

Tabla 6. Actividad antiarrítmica in vivo de compuestos de la invención. +++ se refiere a un incremento >60% en el tiempo hasta la arritmia; ++ se refiere a un incremento del 30-50% en el tiempo hasta la arritmia; + se refiere a un incremento del 15-29% en el tiempo hasta la arritmia; (+) se refiere a un incremento ≤ 15% en el tiempo hasta la arritmia, y nd a "no determinado".

Compuesto No.	Nombre del compuesto	Actividad in vivo
Grupo 1	Ejemplos comparativos	
CE-1	H-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Gly-OH (AAP)	++
CE-2	H-Gly-Ala-Gly-Hyp-Pro-Tyr-NH ₂ (AAP10) 3-(4-hidroxifenil)propionil-Pro-Hyp-Gly-Ala-Gly-OH	+++
CE-3	(HP5) H-GAG-(Pa) ₂ -NH ₂ : Pa es cualquier residuo de aminoácido	++

25 Ejemplo experimental 6

Efectos del Compuesto 2 en corazones de conejo perfundidos aislados

El principio de la técnica de Langendorff

[0105] La técnica Langendorff proporciona un procedimiento de mantenimiento de los requerimientos metabólicos adecuados para un corazón aislado, permitiendo de ese modo experimentos *in vitro* en el corazón entero durante varias horas. En la preparación de Langendorff el corazón se perfunde retrógradamente a través de una cánula insertada en la aorta. Cuando la solución de perfusión entra por la aorta, la presión resultante en la aorta cierra las válvulas aórticas, impidiendo de ese modo que entre el fluido en las cámaras del corazón. En cambio, la solución de perfusión entra en la circulación coronaria que abastece al corazón. De este modo, en la técnica Langendorff el flujo total en la aorta iguala al flujo coronario. Se realizan experimentos de Langendorff utilizando el aparato ISOLATED HEART SIZE 5, Tipo 833 fabricado por Hugo Sachs Elektronik, Alemania. El componente central de este aparato es el bloqueo aórtico al que se une el corazón mediante una cánula. El bloqueo aórtico está conectado directamente a una resistencia de flujo artificial dirigida por un botón rotatorio, permitiendo de ese modo ajustes de la postcarga y por consiguiente la presión de perfusión. El fluido de perfusión se libera de un depósito termostatzado al bloqueo aórtico mediante tubos conectados a una bomba de rodillo. El volumen liberado por la bomba puede ajustarse para satisfacer diferentes necesidades. El fluido en exceso fluye hacia atrás desde el bloqueo aórtico al depósito. Bajo el bloqueo aórtico está una cámara del corazón termostatzada que puede elevarse para cubrir el corazón. Esta preparación permite registros continuos de flujo coronario, presión ventricular izquierda (LVP), presión de perfusión, un ECG de 12 derivaciones, y 8 potenciales de acción monofásica (MAP). Se analiza la salida de estos múltiples registros utilizando el software NOTOCORD HEM 3.3. Este software permite cálculos de un amplio rango de parámetros electrofisiológicos y hemodinámicos cardíacos.

Técnica de perfusión y medios de perfusión

- 5 **[0106]** Los experimentos se realizan en el modo de perfusión a presión constante. Se fija la bomba de flujo para proporcionar 70 ml/min y la postcarga se fija a 50 mmHg, asegurando una presión de perfusión de aproximadamente 60 mmHg. Los corazones están, a menos que se especifique lo contrario, perfundidos con una solución de Krebs-Henseleit modificada precalentada (38°C) con la siguiente composición (mmol/l): NaCl: 118, KCl: 4,7, CaCl₂, 2H₂O: 2,52, KH₂PO₄: 1,18, Mg₂SO₄, 7H₂O: 1,64, piruvato sódico: 2,0, NaHCO₃: 24,88, glucosa: 5,55. Se filtra la solución a través de un filtro "bottletop" de 45 µm antes de su uso.
- 10 **[0107]** Se obtienen un pH de aproximadamente 7,4 y un contenido adecuado de oxígeno de la solución mediante burbujeo continuo con carbógeno (95% de O₂/5% de CO₂). Se dejan que volúmenes de 2 o más litros se equilibren con carbógeno durante por lo menos 20 min, mientras que se deja que volúmenes de menos de 1 litro se equilibren durante 10 min.
- 15 Anestesia, cirugía, y procedimientos experimentales
- 20 **[0108]** Se utilizan conejos Ssc:CPH macho (2,5 - 4,0 kg) obtenidos de Hvldesten, Allerød, Dinamarca. Se sedan con 1,2 ml de Hypnorm® (citrate de fentanilo 0,315 mg/ml y fluanisona 10 mg/ml) I.m. Diez minutos más tarde se induce la anestesia mediante administración i.v. de 0,55 ml de Dormicum® (midazolam 5 mg/ml). Además, se administran 500 IU de heparina I.v. para evitar la coagulación.
- 25 **[0109]** Se colocan los conejos sobre la espalda con las patas delanteras fijadas a los lados y se hace una incisión para exponer la tráquea. Se realiza la traqueotomía y se ventilan los conejos con oxígeno utilizando un ventilador de roedor Ugo Basile (volumen tidal: 18 ml, frecuencia: 60 pr. min).
- 30 **[0110]** Se abre la cavidad abdominal de forma caudal al proceso xifoide y se cortan lateralmente los músculos abdominales en ambos lados. Para lograr acceso a la cavidad torácica se abre el diafragma subesternalmente y el corte se extiende bilateralmente a lo largo de la curvatura costal. Se corta el mediastino lo más cerca posible del esternón y se cortan las costillas en ambos lados en una línea paralela al esternón para permitir que la pared torácica se levante en la dirección craneal. Se fija la pared torácica levantada sobre la cabeza del conejo para proporcionar una visión general completa de la cavidad torácica. Se abre el saco pericardial y se expone la aorta. Se coloca una ligadura floja alrededor de la aorta. Se sujeta cranealmente con abrazaderas la vena cava caudal al hígado para reducir el flujo de vuelta al corazón y se abren la vena cava craneal y la arteria pulmonar para reducir la sobrecarga de volumen del corazón. Se abre la aorta y la cánula, conectada al bloqueo aórtico mediante un tubo de extensión lleno con fluido de perfusión, se inserta inmediatamente en la aorta para permitir la perfusión artificial. Se aprieta la ligadura y se extirpa el corazón y se transfiere al aparato de perfusión. El tiempo desde la sujeción con abrazaderas de la vena cava caudal hasta la inserción de la cánula es de 30 segundos aproximadamente.
- 35 **[0111]** Cuando se ha transferido el corazón al aparato, se realiza una incisión en la aurícula izquierda para permitir la inserción de un globo lleno de fluido (tamaño 12) en el ventrículo izquierdo para mediciones de la presión ventricular izquierda. Se ajusta el volumen del globo para producir una presión diastólica final de 10 mmHg aproximadamente. Se coloca el anillo de electrodo para las mediciones de un ECG de 12 derivaciones alrededor del corazón al nivel del surco coronario, con la punta de la aurícula izquierda entre la 5ª y la 6ª derivación precordial.
- 45 Los 8 electrodos MAP están colocados en el corazón en contacto directo con el epicardio. Se colocan MAP5 y MAP6 en el ventrículo derecho, mientras que los otros electrodos MAP se distribuyen uniformemente sobre el ventrículo izquierdo. Este procedimiento es similar al utilizado por Zabel et al.[38] Cuando los electrodos están colocados se eleva la cámara del corazón para asegurar que el corazón se sumerja en solución de Krebs-Henseleit a 38° C todo el tiempo.
- 50 **[0112]** Antes de que empiece el experimento, se coloca una ligadura alrededor de una rama mayor de la arteria circunfleja que abastece una gran parte del ventrículo izquierdo. Se pasan ambos extremos de la ligadura a través de un pequeño tubo de plástico que permite la inducción de la isquemia presionando el tubo de plástico contra el corazón y humedeciendo los extremos de la ligadura. Se deja que todos los corazones se equilibren durante 15 min
- 55 antes del comienzo del experimento.

[0113] La programación en el tiempo para el experimento es la siguiente:

1. 15 min de perfusión con tampón de Krebs-Henseleit normal (el periodo de equilibración)
- 5 2. 15 min de perfusión con compuesto añadido al tampón Krebs-Henseleit normal (el periodo de control normocalémico; t=0-15 min).
3. 15 min de perfusión con compuesto añadido a la solución Krebs-Henseleit que contiene una concentración de K⁺ reducida (2,5 mM) (el periodo de control hipocalémico: t=15-30 min).
- 10 4. Inducción de isquemia regional seguida de 30 min de perfusión con compuesto añadido a la solución de Krebs-Henseleit que contiene una concentración de K⁺ reducida (2,5 mM) (el periodo de control hipokalémico; t=30-60 min).
- 15 **[0114]** Al final del experimento se perfunden los corazones con colorante azul de Evans para evaluar el área con riesgo de infarto. Las aurículas y el ventrículo derecho se cortan y el ventrículo izquierdo restante se separa en el área teñida por azul de Evans y el área que no se tiñe, es decir, el área con riesgo. Las dos áreas se transfieren en seco utilizando papel absorbente y se pesan para determinar el área porcentual con riesgo de infarto.

20 Registros

[0115] Se registran continuamente los parámetros siguientes: flujo coronario, presión ventricular izquierda, presión de perfusión, un ECG de 12 derivaciones y registros de 8 MAP. Se muestrean el ECG y los MAP a 2000 Hz, y los parámetros de presión y flujo a 500 Hz. Se calcula la duración del potencial de acción promedio a partir de los registros de 8 MAP como la duración promedio desde el momento de la máxima despolarización (tiempo de dV/dt Max) hasta el momento de un 90% de repolarización. Esta duración es referida como APD₉₀ y la dispersión de APD₉₀ se mide como la desviación estándar de las 8 mediciones de APD₉₀.

Resultados

30 **[0116]** Tal y como se muestra en la Figura 5, se estudiaron tres grupos. Se perfundieron los corazones de conejo con tampón de Krebs-Henseleit solo (vehículo; n=11 experimentos), Compuesto 2 10⁻¹⁰ mol/l, (n=10 experimentos), o 10⁻¹⁰ mol/l) o AAP10 (CE2; n=3 experimentos). Se evitó el incremento de la dispersión de APD₉₀ observada durante la isquemia miocárdica aguda hipocalémica en corazones de conejo tratados con vehículo mediante 10⁻¹⁰ mol/l de Compuesto 2, pero no mediante 10⁻¹⁰ mol/l de AAP10_(CE2). Estos descubrimientos demuestran que el Compuesto 2 evita el incremento en la dispersión eléctrica durante la isquemia y sugiere que las propiedades antiarrítmicas del Compuesto 2 están relacionadas con este mecanismo. Se ha descrito previamente que AAP10 (CE2) es capaz de reducir la dispersión del intervalo de activación-recuperación epicárdica y disminuir las alteraciones de los patrones de activación epicárdica inducidos por isquemia regional en el conejo con efecto máximo a una concentración de 10⁻⁸ mol/l [39]. En nuestros experimentos, el Compuesto 2 evitó de forma efectiva el incremento de la dispersión eléctrica inducida durante la isquemia a una concentración de 10⁻¹⁰ mol/l mientras que AAP10 (CE2) fue inefectiva a esta concentración. Estas diferencias no se debieron a diferencias en el tamaño del infarto de miocardio ya que la disminución en el flujo coronario durante la isquemia y el área de riesgo fueron similares en todos los grupos. Estos resultados indican que el Compuesto 2 es más potente que AAP10 (CE2).

45

Ejemplo experimental 7

Efecto del Compuesto 2 en arritmias por reentrada ventricular en perros

50 **[0117]** Se ha aclarado la influencia de los enlaces gap en las arritmias en estudios sobre la influencia de la conexina 43 (Cx43) en las propiedades de conducción del ventrículo [33]. En un ratón "knockout" heterocigoto deficiente en Cx43, hay dos veces la frecuencia de VT espontánea con oclusión arterial coronaria (CAO) [3]. La isquemia desfavorece el efecto de Cx43 después de 6 horas en el perro mostrando un decrecimiento del 60% en Cx43 de punta a punta y un decrecimiento del 49% en Cx43 de lado a lado [40], probablemente secundario a la desfosforilación. En la isquemia subaguda en el perro, se facilita la reentrada epicárdica en áreas en las que se disminuye la Cx43 [21]. De este modo, los mecanismos reentrantes pueden depender de forma crítica del desfavorecimiento mediado por la isquemia de la expresión de Cx43 y presumiblemente la resistencia de los enlaces gap haga que la heterogeneidad de las propiedades de recuperación y conducción predisponga a VT y VF.

[0118] En los estudios descritos más adelante, se examina el efecto del Compuesto 2 en las arritmias por reentrada durante la isquemia miocárdica obtenida mediante CAO de la arteria descendente anterior.

Preparación del animal

5

[0119] Se estudiaron tres perros en estado anestesiado con tórax abierto para facilitar la colocación del electrodo para el mapeo. Se administró α -cloralosa en forma de bolo (200 mg/kg) y a continuación una Infusión constante a 8 mg/kg/h (disuelta en polietilenglicol, PM=200). Se canularon la vena y la arteria femorales para la administración de fluido y fármacos y para la medición de la presión aórtica ascendente, respectivamente.

10

Procedimientos electrofisiológicos

[0120] Se fijaron el nódulo sinusal y se controló con el tiempo el apéndice ventricular con un estimulador programable con salidas de corriente constante en dos veces el umbral diastólico. El índice de control fue de ≥ 200 b/min para controlar el ritmo cardíaco. Un polo del control ventricular de una aguja multipolar en la zona normal empleó un ánodo (7 cm² de acero inoxidable) en el músculo abdominal. Se midió el Periodo Refractario Efectivo Endocárdico (ERP) mediante el procedimiento de extraestímulos estándar. Se midió el umbral diastólico ventricular tardío durante cada intervención; la corriente de control fue cuatro veces el umbral.

20 Registro de Electrograma

[0121] Se eligieron sitios de prueba a lo largo del eje de agujas de 16 polos (J. Kassell, Fayetteville, NC); cada polo rodea completamente el eje de la aguja para evitar la direccionalidad de la orientación de la aguja a partir del registro de fibras de Purkinje adyacentes. Se registraron seis electrogramas bipolares (1 mm espaciado) secuencialmente hacia abajo del eje de la aguja mediante la amplificación hasta 1000 veces, filtrando de 3-1300 Hz y registrando mediante el osciloscopio durante el control auricular. Se registran cuatro electrogramas intramurales en cada aguja multipolar. Se activan los electrogramas epicárdicos más tardíos sobre cada aguja. Se utilizó un conjunto de 23 electrodos multipolares con 17 en la zona de riesgo de infarto de la arteria coronaria descendente anterior y 6 en la zona normal circundante tal y como se describe en detalle por Xing y Martins [43]. La distancia entre agujas medida sobre el epicardio varía entre 6-10 mm en perros que pesan 12-16 kg.

Inducción de arritmia

[0122] Se controló el ritmo del endocardio en la base, el septo apical y la pared libre lateral justo fuera de la zona de riesgo. Después de determinar el ERP, se prolongó el intervalo S1-S2 en 4 ms > ERP y se añadió un S3 al protocolo inicialmente con un intervalo S2-S3 igual a 50 ms > S1-S2. Se acortaron los intervalos hasta que no se pudo capturar. Si no se inducía taquicardia ventricular en ningún sitio de control, se añadieron un tercer (S4) y un cuarto (S5) extraestímulo. Se realizó un protocolo de inducción de taquicardia ventricular completa antes de la CAO para excluir la taquicardia ventricular de artefacto debida a la masa de la aguja o la isquemia debida a las agujas que comprometen el flujo de sangre. Después de confirmar los gases sanguíneos fisiológicos y la anestesia adecuada se ligó la CAO descendente anterior. Después de 60 minutos el tamaño del infarto es casi el 75% de la zona de riesgo y el engrandamiento posterior de la zona de infarto es insignificante. A continuación, se indujo taquicardia ventricular por lo menos dos veces antes de las intervenciones. Se repitió la prueba cada 20 minutos y se continuó hasta 3 horas después de la CAO. Se registró el ERP de músculo cardíaco normal con cada intervención.

45

Mapeo de la arritmia

[0123] Se realizó el mapeo epicárdico utilizando un sistema informático de BARD Electrophysiology Inc. El software requiere 64 canales de datos a una resolución de 12 bits con una frecuencia de muestreo de 1kHz/canal. El filtrado fue de 30-300 Hz. Se desencadenan externamente ventanas de ocho segundos incluyendo hasta 8 s de datos antes de la señal desencadenante. Se utiliza este sistema para registrar a partir de 2-3 bipolos 2-3 epicárdicos externos en cada electrodo de registro.

[0124] Se utilizó el sistema de software habitual para separar las señales de Purkinje de los 3 bipolos internos en cada electrodo multipolar endocárdico mediante muestreo a 3 kHz por canal. Los filtros incorporan frecuencia de Purkinje (3-1300 Hz). El índice de muestreo fue de 235 kHz. Se interconectó el PC con un amplificador que consistía en un multiplexor de señal análoga y 64 circuitos amplificadores de instrumento. Cada uno tuvo una ganancia seleccionable (hasta 1000), y cortes de ancho de banda. La adquisición, el procesamiento y la visualización de los datos electrofisiológicos fueron realizados por el software. La adquisición de alta velocidad permitió 14 s de datos que incluyen hasta 8 s antes de una señal desencadenante.

60

Análisis de mapeo

[0125] Se hizo el análisis de mapeo sin conexión. El ordenador selecciona los tiempos de activación utilizando el primer máximo dv/dt . Los electrogramas se consideraron ininterpretables y se excluyeron de mapas sólo si no eran reproducibles con estímulos; no hubo exclusión basada en el voltaje de los electrogramas. Los potenciales electrotonicos o de campo lejano se consideran presentes cuando el voltaje sustancial y la pérdida de dv/dt tienen lugar en un complejo con intervalos de acoplamiento más cortos que la refractariedad. Se dibujan las isocronas a mano. Los mecanismos de la taquicardia ventricular se definen de la siguiente manera: la taquicardia ventricular reentrante tiene lugar cuando el electrodo que registra la actividad más temprana, que sucede después de que el bloqueo unidireccional se localice inmediatamente adyacente al sitio de la activación más tardía del complejo previo y se registra la actividad diastólica entre complejos. Casi siempre se registra la reentrada epicárdica en la isquemia aguda, de manera que se observa la activación retrógrada (epicárdica a endocárdica) de la pared.

Protocolo experimental

[0126] Después de la instrumentación del corazón y una hora desde que tuvo lugar la CAO, se realizaron protocolos de control del ritmo cardiaco para inducir taquicardia ventricular para confirmar la inducibilidad reproducible (inducción de dos veces de las taquicardias ventriculares con morfologías de superficie similar) o fallo de la inducibilidad (control del ritmo en los tres sitios dos veces sin taquicardia ventricular durante una hora). En los tres perros con taquicardia ventricular reinducible se identificó un mecanismo de reentrada. En estos tres perros, se administró el compuesto 2 como una inyección en bolo i.v. seguido por una infusión constante de 30 min a tres niveles de dosis en dos perros, mientras que el tercer perro se trató con solución salina. A continuación, se repitió las pruebas con extraestímulos a través del protocolo completo en todos los sitios para determinar si estaba presente o no la taquicardia ventricular. El compuesto 2 se administró i.v. en 3 niveles de dosis con el fin de producir concentraciones en plasma de 10^{-10} M (bolo: 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; infusión: 2 $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$), 10^{-9} M (bolo: 1,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; infusión: 21 $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$), y 10^{-8} M (bolo: 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$; infusión: 210 $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$), respectivamente.

Resultados

[0127] El primer animal, del que se incluyen las figuras 6-9, se estudió después de la inducción de la VT monomórfica prolongada sólo desde el sitio del control ventricular lateral dos veces en sucesión que ocurren a las 2 horas y 10 minutos y se repitieron a las 2 horas y 20 minutos después de CAO. En la figura 6, se presenta un mapa de activación después de la estimulación septal que no consiguió producir VT. Esto demuestra el patrón de activación de ortogrado normal con la activación temprana del sitio de control PURK activado a 6 ms después del estímulo y la activación tardía del sitio epicárdica activado más tarde a 107 ms. Cabe indicar que el tiempo de activación adyacente a 86 ms inmediatamente este y sur de la última activación del epicardio es ES en la figura 7. La activación epicárdica del primer complejo de la VT, que inicia en -44 ms antes del inicio del QRS de superficie y que corresponde al electrograma registrado en E-C en la figura 7.

[0128] En la figura 7, se muestra la taquicardia ventricular (VT) monomórfica prolongada inducida por la estimulación en el sitio de control ventricular epicárdico lateral que provoca un circuito de reentrada. La activación avanza en una reentrada de doble bucle que se activa primero a -17 ms y, a continuación, se procede hasta el 57 ms en el bucle noroeste. El bucle sureste que activa primero hasta 2 ms, 31 ms y a continuación hasta 57 ms. El protocolo que indujo VT fue S1-S2=150, S1-S3=280, S1-S4=390, S1-S5=490 ms. La figura ilustra electrogramas epicárdicos (E-) registrados con electrodo de superficie ECG II y V5R durante el segundo a quinto extraestímulo prematuro (se observa mejor en E-L) asegurando 4 complejos de VT. Los electrogramas se registran desde el sitio de control de la zona del límite lateral (L) y este (E), norte (N), centralmente (C), subepicárdicamente (SE), por debajo E-C, así como sur (S) y noroeste (NW) y suroeste (SW) de E-C. E-C muestra electrogramas gradualmente disociados con el último prematuro que muestra un bloqueo del segundo componente (líneas perpendiculares). El retraso de la conducción adyacente en ES permitió la conducción para proceder alrededor y detrás del sitio central (EC) con la excitación reentrante que continúa entre EC y ES (línea recta y línea con flecha).

[0129] La figura 8 ilustra el mapa de activación durante la activación epicárdica del primer complejo de la taquicardia ventricular, que empieza en el ms -44 antes del inicio del QRS de superficie y que corresponde al electrograma registrado en E-C en la figura 7. La activación avanza en una reentrada de doble bucle que se activa primero a -17 ms y, a continuación, se procede hasta el 57 ms en el bucle noroeste. El bucle sureste que activa primero hasta 2 ms, 31 ms y a continuación hasta 57 ms. Este mapa de activación ilustra la activación retrógrada de la pared ventricular durante la arritmia por reentrada.

[0130] El compuesto 2 se administró en tres dosis IV incrementales que no alteraban la presión arterial promedio (MAP = 80 mm Hg). El periodo refractario efectivo en el control fue de 150 ms, 154 ms después de la dosis más baja

y fue de 148 ms en la dosis última y más elevada. La VT que era inducible era por reentrada epicárdica típica mostrada en las figuras 7 y 8. Después de la primera dosis del compuesto 2 (bolo: 0,1 µg/kg; infusión: 2 ng/kg/min), la VT ya no era inducible a pesar del hecho de que los protocolos que inducían VT antes de la administración del compuesto 2 se conseguían de manera reproducible; el protocolo que inducía la VT antes de la administración de fármacos fue S1-S2=150, S1-S3=280, S1-S4=390, S1-S5=490 ms y durante la infusión del compuesto 2, los intervalos fueron 150, 270, 370 y 470 ms, respectivamente. La VT no fue inducible hasta una hora y media después de iniciar la infusión de la dosis más baja de compuesto 2. Los registros electrocardiográficos después de la administración i.v. de la dosis más baja de compuesto 2 se muestran en la figura 9. Estos resultados demuestran que el compuesto 2 bloqueaba de manera eficaz la VT por reentrada en este perro.

10

[0131] Se estudió un segundo perro con VT inducible, esta vez desde dos puntos de control de la zona límite situados lateralmente y septalmente. De nuevo, el compuesto 2 no produjo cambios en MAP que empezó a 90 mm Hg y acabó a 90 mmHg. El periodo refractario efectivo en los dos sitios de inducción permanecieron a 163 y 144 ms, respectivamente, a lo largo del periodo de prueba del compuesto 2, que empezó 85 minutos después de CAO y continuó durante 2 horas más. Después de la dosis más baja de compuesto 2, la VT inducida de la pared lateral ya no era inducible; el mecanismo de esta VT era de reentrada epicárdica, muy similar a la mostrada en las figuras 7-9. La VT inducida del punto septal también era de reentrada epicárdica antes de la administración de compuesto 2, pero después de la administración i.v. del compuesto 2 la reentrada epicárdica estaba completamente bloqueada. De este modo, en estos dos experimentos, la CT reentrante epicárdica era inducible antes de la inducción de la dosis más baja de compuesto 2 y después de la administración de la sustancia ninguna reentrada era reinducible a ninguna dosis.

20

[0132] Finalmente, un animal adicional se sometió a una prueba electrofisiológica durante el marco de tiempo utilizado en los dos experimentos descritos anteriormente sin la introducción del compuesto 2 sin solución salina. Se indujo la reentrada epicárdica una hora después de CAO y se indujo la misma morfología VT y mecanismo reentrante 1 Yz-2 1/2 horas de CAO. De este modo, la reproducibilidad de la VT reentrante en este experimento controlado con el tiempo concuerda con que el compuesto 2 es un compuesto antiarrítmico eficaz durante las condiciones con arritmias por reentrada.

25

[0133] Estos experimentos demuestran que el compuesto 2 es eficaz en la prevención y/o el tratamiento de arritmias por reentrada letales. De este modo, un objetivo de la presente invención es proporcionar compuestos para la preparación de medicamentos útiles en la prevención y/o el tratamiento de arritmias por reentrada cardiacas de origen supraventricular o ventricular. Este objetivo se consigue con los presentes compuestos peptídicos, tales como los compuestos de fórmulas I a VIII, fórmulas 2 a 12 y los compuestos de las tablas 1 a 8 de la presente invención, más específicamente los compuestos de los Ejemplos de síntesis 1-55 de la presente invención.

35

Ejemplo experimental 8

Efecto de los abridores de enlaces gap en células óseas

40 Antecedentes

[0134] Los osteoblastos, que son las células formadoras de huesos, y los osteocitos están bien conectados. Se han observado conexiones osteoblasto-osteoblasto, osteoblasto-osteocito, y osteocito-osteocito en porciones de huesos examinados mediante microscopía electrónica [42]. La conexina más interesante en relación a los huesos es la Cx43, como en el corazón. En las células óseas, la expresión de estas proteínas está unida a la expresión de algunas proteínas específicas de los osteoblastos. Las hormonas calciotrópicas también pueden regular la expresión de las proteínas de los enlaces gap.

45

[0135] Se ha observado que los osteoblastos humanos (HOB) y las células estromales derivadas de la médula ósea (BMSC) expresan Cx43 y Cx45. Están funcionalmente acopladas tal como se demuestra mediante la técnica de transferencia de colorante Amarillo Lucífer (LY) [43]. Las líneas de células osteoblásticas de rata difieren de los cultivos primarios humanos; las células ROS 17/2.8 sólo expresan Cx43 y están muy bien acopladas, mientras que UMR 106-01 expresan predominantemente Cx45 y están poco acopladas con el colorante [44]. Ambas líneas celulares osteoblásticas de ratas están acopladas eléctricamente. La transfección de Cx43 en las células UMR daba lugar a células muy acopladas con el colorante. De este modo, la Cx43 permite la transferencia de LY y otras moléculas más grandes, mientras que Cx45 no permite este paso. En cambio, la introducción de Cx45 a células que expresan Cx43 disminuye el acoplamiento con el colorante. En la diferenciación de osteoblastos, la expresión de Cx43 cambia; por tanto, cuanto más maduros son los osteoblastos, mayor es la expresión de Cx43 [45].

55

[0136] Se ha investigado el efecto de diferentes estímulos sobre células óseas y la relación con los cambios en la comunicación por enlaces gap. Se sabe que un estrés mecánico moderado en los huesos aumenta la densidad

60

ósea. Para imitar esta situación, se expusieron células ROS 17/2.8 a estrés cíclico, lo cual dio lugar a un incremento en el acoplamiento del colorante de las células. El estrés cíclico aplicado a células UMR 106-01 poco acopladas dio lugar también a un incremento en el acoplamiento con colorante, pero de manera menos acusada en comparación con las células ROS. No se observó incremento del ARNm para Cx43, pero sí se observaron más formas fosforiladas de Cx43, indicando que el estrés cíclico sobre células osteoblásticas incrementa la comunicación por enlaces gap entre las células al modular la localización intracelular de la proteína de enlaces gap Cx43. El mismo grupo ha demostrado que la transfección de Cx43 en células UMR 106-01 poco acopladas no sólo incrementa el acoplamiento con colorante [46], sino que también incrementa la expresión de los productos de osteoblastos maduros, osteocalcina y sialoproteína ósea (BSP). La disminución del acoplamiento entre células osteoblásticas (ROS) mediante la transfección de Cx45 en las células disminuye la expresión de osteocalcina y BSP, genes fundamentales para la formación de la matriz ósea y la calcificación. Un estudio reciente mostró que los ratones con falta de Cx43 presentan una formación y desarrollo óseo deficiente en comparación con ratones de tipo salvaje [47]. De este modo, se requiere una red intercelular comunicante para la elaboración completa de un fenotipo osteoblástico diferenciado, así como la formación y recambio óseo norma. Una comunicación por enlaces gap deficiente puede dar lugar por tanto a un aumento de la pérdida ósea.

[0137] También se ha observado que los enlaces gap son parcialmente responsables para la propagación de señales de calcio intercelular en células óseas. La estimulación mecánica de un osteoblasto humano en una monocapa celular induce in vitro un pulso de calcio que se propaga a un conjunto de células circundantes. La propagación de esta señal implica el paso de una molécula mensajera a través de enlaces gap con una posterior activación de células vecinas [48;49]. Estas señales se propagan probablemente a través de la red celular en huesos in vivo en respuesta a estímulos mecánicos y podrían ser responsables del aumento de la formación ósea en respuesta a la carga mecánica en el hueso.

[0138] La comunicación por enlaces gap y el efecto de las hormonas calciotrópicas están relacionados. Se ha observado que la estimulación con 1,25 (OH)₂ vit.D3 de fibroblastos de piel humana aumenta la comunicación a través de enlaces gap, e incrementa también los niveles de proteína Cx43 y ARNm [50], pero sólo en presencia de receptores de vitamina D (VDR) funcionales. Se observa que la pérdida de la expresión de Cx43 disminuye la sensibilidad de las células a PTH, sin ningún cambio en el número de receptores de PTH o respuesta de AMPc [51].

A la inversa, PTH y PGE2 aumentan la comunicación por enlaces gap en cultivos de células osteoblásticas a través de dos mecanismos; una redistribución rápida inicial de Cx43 a la membrana celular y una estimulación posterior de la expresión del gen de Cx32 [52]. De este modo, la modulación de la comunicación intercelular representa un mecanismo por el cual los factores osteotrópicos regulan la actividad de las células formadoras de huesos.

[0139] La comunicación intercelular por enlaces gap puede ser probablemente uno de los mecanismos más importantes por los cuales las células óseas coordinan sus actividades y respuestas a los estímulos mecánicos y hormonales. De este modo, si la comunicación por enlaces gap entre células óseas se pudiera incrementar farmacológicamente, se podría incrementar la actividad de los osteoblastos, aumentando la formación ósea in vivo.

[0140] Los miocitos cardiacos también están conectados por enlaces gap y, como en los osteoblastos, la conexina predominante es Cx43. Se ha observado que ciertos compuestos incrementan la comunicación por enlaces gap entre los miocitos cardiacos, de los cuales el AAP10 (CE2) sintetizado artificialmente es el mejor investigado. Los miocitos cardiacos responden a isquemia con una disminución en el acoplamiento celular. En experimentos in vitro, con la adición de AAP10 (CE2) a miocitos cardiacos expuestos a isquemia, se restauró parte del acoplamiento celular perdido. Si los miocitos cardiacos pueden responder a este grupo de compuestos con un mayor acoplamiento de enlaces gap, los osteoblastos podrían hacer lo mismo. En este caso, es evidente que el incremento en el acoplamiento celular podría ir acompañado muy bien por un incremento en la maduración y actividad de osteoblastos y el posterior incremento en la formación ósea. Para investigar esta hipótesis, se examinó el efecto del compuesto 2 en la GJIC en osteoblastos humanos y células de osteosarcoma de rata. Además, se estudió el efecto del compuesto 2 en un marcador (es decir, fosfatasa alcalina) para la actividad de osteoblastos humanos y la formación ósea.

del compuesto 2 en un marcador (es decir, fosfatasa alcalina) para la actividad de osteoblastos humanos y la formación ósea.

Métodos

55 Cultivo celular

[0141-2] Células de osteoblastos humanos (hOB): se aislaron células de médula ósea humana obtenidas mediante punción de la espina iliaca posterior de voluntarios sanos (edad de 20 a 36): se recogieron 10-15 ml de material de la médula en 15 ml PBS + Ca, Mg (Life Technologies, Cat.No. 14040) con Heparina 100 U/ml (Sigma, Cat.No. H-3149). La fracción mononuclear de la médula se aisló en un gradiente de Lymphoprep (Nycomed Pharma, Cat.No. 1001967), mediante centrifugación a 2200 rpm durante 30 min. Después de la recogida, se lavó una vez la fracción

mononuclear con medio de cultivo y se centrifugó a 1800 rpm durante 10 min. Posteriormente, se contaron las células y se emplacaron en un medio de cultivo a 8×10^5 células/placa de 100 mm. Medio hOB (todos los reactivos obtenidos de Life Technologies): MEM sin Rojo Fenol con Glutamax (Cat.No. 041-93013) suplementado con suero de ternera fetal al 10% inactivada por calor (Cat.No. 10106) y Penicilina/Estreptomicina al 0,1% (Cat.No. 15140). El medio se cambió el día siguiente y las células se cultivaron a 37°C en CO₂ al 5% con cambio de medio cada 7 días. Después de 3-4 semanas de cultivo, las células habían alcanzado una confluencia del 70%. A continuación, el medio se suplementó con Dexametasona 100 nM (Sigma, Cat.No. D-4902) durante 7 días. A continuación, las células se emplacaron para experimentos de obtención de imágenes en video: se colocó un cubreobjetos de vidrio #1 de 25 mm en una placa de 35 mm (o cada pocillo de una multiplaca de 6 pocillos), las células se emplacaron a $2,5 \times 10^5$ células/cubreobjeto y se cultivaron durante 2-3 días antes de su uso.

[0143] Células ROS 17/2.8: se cultivaron células en placas de 100 mm a 37°C con CO₂ al 5% y el medio se cambió cada 2-3 días. Medio ROS (todos los reactivos obtenidos de Life Technologies): MEM (Cat.No. 31095) suplementado con suero de ternera al 10% inactivada por calor (Cat.No. 16170), NEAA al 1% (Cat.No. 11140), piruvato sódico al 1% (Cat.No. 11360), L-glutamina al 1% (Cat.No. 25030) y Penicilina/Estreptomicina al 0,1% (Cat.No. 15140). Para los experimentos de obtención de imágenes, las células se emplacaron en cubreobjetos a $2-3 \times 10^5$ células/cubreobjetos y se cultivaron durante 2-3 días antes de su uso.

Medición de las ondas de calcio

[0144] Las células cultivadas sobre cubreobjetos se cargaron con fura-2-AM 5 μ M (Molecular Probes, Cat.No. F-1221) durante 30 minutos a 37°C y se incubaron en medio fresco durante 20 minutos. A continuación los cubreobjetos se fijaron a una cámara de cultivo con PDMI-2 (Medical Systems Corp.), se mantuvieron a 37°C con una superfusión de CO₂, en un microscopio Zeiss Axiovert. Se indujeron ondas de calcio intercelular mediante estimulación mecánica de una única célula utilizando una micropipeta de vidrio de borosilicato fijada a un micromanipulador Eppendorf 5171. La obtención de imágenes se realizó utilizando un sistema de obtención de imágenes MetaMorph (Universal Imaging). La luz de excitación (340 y 380 nm) fue proporcionada por un monocromador (T.I.L.L. Photonics GmbH). Las imágenes se obtuvieron con una cámara CCD intensificada (Dage MTI) y se digitalizaron con una placa de procesamiento de imágenes Matrox MVP.

Microinyección

[0145] Las células cultivadas sobre cubreobjetos se colocaron en el microscopio tal como se ha descrito anteriormente. Las microinyecciones se realizaron utilizando un micromanipulador Eppendorf 5171 y el sistema Eppendorf Transjector 5346. Se cargó una micropipeta con una solución de Amarillo Lucifer (LY) 10 mM (Sigma, Cat.No. L-0259). Se inyectó cuidadosamente una célula en la monocapa con LY durante 30 segundos, se extrajo la micropipeta de la célula y, después de 30 segundos, se contó el número de células que mostraron transferencia de colorante. La luz de excitación para LY fue de 430 nm y las imágenes se obtuvieron tal como se ha descrito anteriormente.

Ensayo de fosfatasa alcalina

[0146]

Día 1: Las células se emplacaron en placas de 96 pocillos a una concentración de 8000 células/pocillo (hOB) ó 3000 células/pocillo (ROS) en 200 μ l de medio de cultivo normal

Día 2: Se cambió el medio en las células.

Día 4: (Día 3 para ROS): Se lavaron las células con 200 μ l de MEM, BSA al 0,1% (Sigma, Cat.No. A-9418). Se añadieron a las células varias concentraciones de compuesto 2 que contenían 200 μ l de MEM, BSA al 0,1%, y se continuó el cultivo durante 4 días (2 días para células ROS).

Día 8: (Día 5 para ROS): El ensayo de Fosfatasa alcalina (ALP) es un método colorimétrico de punto final para medir la actividad enzimática y se realizó utilizando un Kit de Fosfatasa alcalina (Sigma, Cat.No. 104-LL): Las células se lavaron una vez con 200 μ l de PBS+Ca,Mg. Se añadieron 100 μ l de solución tampón alcalino a cada pocillo y se colocó la placa a 37°C durante 10 min. Se añadieron 100 μ l de solución substrato a cada pocillo y se incubó la placa a 37°C durante 30 min. Se añadieron 100 μ l de NaOH 2,0 N a cada pocillo para detener la reacción. Se midió la absorbancia utilizando un lector de placas a 405 nm.

Efectos del compuesto 2 en GJIC

[0147] A efectos de valorar la capacidad de los modificadores de enlaces gap de incrementar la comunicación mediante señales de calcio intercelular mediadas por enlaces gap, se cargaron monocapas de células osteoblásticas

humanas sobre cubreobjetos de vidrio con fura-2. Durante la obtención de imágenes a tiempo real, se realizó una estimulación mecánica con una micropipeta de vidrio. Apareció un incremento en el calcio intracelular con una extensión posterior de la señal a las células circundantes. El número promedio de células en la onda fue de 6,5 células. A continuación, se añadió adenosin trifosfato (ATP) 100 μ M con el fin de desensibilizar los receptores purinérgicos. Después de la desensibilización, la onda de propagación de calcio depende exclusivamente de GJIC. Después de la estimulación con ATP, se observó un incremento en el calcio intracelular en la mayoría de las células en el campo de visión. De nuevo, se estimuló mecánicamente una sola célula. Ahora la propagación de la onda se limitó a un promedio de sólo 4,5 células en la onda. El compuesto 2 se añadió en una concentración de 10^{-8} mol/l a la solución del baño. Se observó un incremento en las concentraciones de calcio intracelular en la mayoría de las células en el campo de visión. Después de 10 minutos de incubación con el compuesto 2, se estimuló mecánicamente una sola célula. De nuevo, en la célula estimulada se incrementó la concentración de calcio intracelular con una posterior propagación de la onda. Ahora la onda se extendió hasta un promedio de 6,2 células (figura 10), que es un incremento significativo en comparación con antes de la adición del compuesto 2.

[0148] Con el fin de evaluar la capacidad del compuesto para restaurar el acoplamiento por enlaces gap suprimido, se realizaron experimentos similares en la línea de células osteoblásticas ROS 17/2.8 (ROS), pero después de la incubación de las células durante 48 horas bajo condiciones hipóxicas, con sólo O_2 al 3-6%, condiciones conocidas por disminuir el acoplamiento celular. Se cargaron células ROS en monocapas con fura-2 y, bajo las mismas condiciones anteriores, se realizó una estimulación mecánica. Como las células ROS no expresan receptores purinérgicos, no se realizó el pretratamiento con ATP. Tras la estimulación, aumentó la concentración de calcio intracelular en las células estimuladas y se inició una onda que se extendió hasta un promedio total de 2,2 células ($n = 18$). A continuación, se añadió el compuesto 2 a la solución del baño en una concentración final de 10^{-8} M. Después de 10 minutos, se repitió la estimulación mecánica. Ahora, la onda se propagó hasta un promedio de 5,4 células ($n=18$) (Figura 11), que es un incremento significativo en comparación con antes de añadir el compuesto. De este modo, el compuesto 2 incrementa de manera eficaz las ondas de calcio intercelular mediadas por enlaces gap.

[0149] Para valorar el efecto del compuesto en el acoplamiento celular directo, se realizaron experimentos con microinyección según el método descrito anteriormente. Se inyectó el colorante Amarillo Lucifer (LY) en un único osteoblasto humano en una monocapa. Después de 30 segundos, se evaluó el número de células que contenían colorante. Bajo condiciones fisiológicas, el colorante se extendió a un promedio de 14 células ($n = 19$). Para eliminar el acoplamiento celular, las células se incubaron durante hipoxia (O_2 al 3-6%) durante 48 horas. A continuación, se reevaluó el acoplamiento celular mediante la microinyección de LY y, en este punto, el colorante sólo pasó a un promedio de 7 células ($n = 10$). El compuesto 2 se añadió al medio y, después de 10 minutos, se valoró de nuevo el acoplamiento del colorante. Después de 10 minutos de incubación con el compuesto 2, se incrementó el acoplamiento celular con la transferencia de colorante a 9 células ($n = 11$).

[0150] Se realizaron experimentos similares con células ROS. El acoplamiento básico bajo condiciones fisiológicas en células ROS fue de 12 células ($n = 19$). Después de una incubación de 48 horas en O_2 al 3-6%, se observó una reducción en la transferencia de colorante a 9 células ($n = 27$). De nuevo, se añadió el compuesto 2 a la solución de baño y se restauró el acoplamiento celular hasta niveles prehipóxicos con una transferencia promedio de colorante a 12 células ($n = 27$), (figura 12). De este modo, el compuesto 2 es capaz de incrementar la comunicación por enlaces gap y restaurar las reducciones inducidas por hipoxia en el acoplamiento celular.

[0151] El estrés metabólico inducido por la hipoglicemia también es conocido por disminuir la comunicación por enlaces gap. Por lo tanto, se quiso valorar si el compuesto 2 podía invertir la reducción inducida por hipoglicemia en el acoplamiento celular. Se cultivaron las células osteoblásticas humanas en monocapas sobre cubreobjetos de vidrio y se cargaron con fura-2. Después de la desensibilización con ATP tal como se ha descrito anteriormente, se estimuló mecánicamente una única célula y se registró el número de células en la onda. En este grupo de experimentos, la onda se extendió hasta un promedio de 3,2 células ($n = 19$). El medio se cambió a un medio sin glucosa y, después de 8 minutos, se realizó otra estimulación mecánica. Ahora, la onda estaba casi bloqueada con una propagación de onda de únicamente 1,4 células ($n = 20$). El compuesto 2 se añadió al medio en una concentración final de 10^{-8} M. Se realizó una estimulación final y ahora la onda estaba casi restaurada con una extensión promedio de 2,9 células ($n = 18$) (figura 1). De este modo, el compuesto 2 es capaz de restaurar el desacoplamiento celular inducido por hipoglicemia. Finalmente, para valorar el efecto del compuesto 2 en la formación ósea y la actividad de los osteoblastos, se midió el efecto del compuesto en la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de las células. Los osteoblastos humanos se estimularon con diferentes concentraciones de compuesto 2 desde 1×10^{-13} hasta 1×10^{-6} , y se compararon con los controles no tratados. Bajo condiciones de cultivo normales, el compuesto 2 incrementó la actividad ALP en la mayoría de las concentraciones analizadas, a excepción de la concentración más elevada (10^{-6} mol/l), que puede ser tóxica (Figura 14). Además, también se analizó el efecto del compuesto en la actividad ALP durante las condiciones hipóxicas. Se cultivaron osteoblastos humanos durante cuatro días en O_2 al 5%. El medio se enriqueció con el compuesto 2 en diferentes concentraciones

y se comparó con las respuestas durante condiciones normóxicas. Durante la hipoxia, la estimulación de la actividad ALP inducida por el compuesto 2 fue un 15% superior que durante la normoxia en todas las concentraciones en el intervalo de 10^{-11} a 10^{-8} mol/l, (Figura 15).

- 5 [0152] En resumen, estos resultados demuestran que el compuesto 2 es capaz de normalizar la GJIC atenuada entre osteoblastos humanos durante la hipoxia. Además, el compuesto 2 estimula la producción de fosfatasa alcalina, sugiriendo que el compuesto 2 es capaz de estimular la actividad de los osteoblastos y, por tanto, la formación ósea. De este modo, el compuesto 2 puede ser útil en el tratamiento de enfermedades óseas con una formación ósea dañada en relación a la resorción ósea. El efecto del compuesto 2 sobre el acoplamiento célula a
10 célula durante la hipoxia sugiere que las sustancias de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades óseas asociadas con una escasa vascularización, hipoxia e isquemia en tejido óseo.

- [0153] A partir de estos experimentos, se puede concluir que las sustancias de la presente invención que incrementan la GJIC pueden ser útiles para la preparación de medicamentos para la prevención y/o el tratamiento de
15 la osteoporosis. En algunos casos, la osteoporosis es una manifestación de otra enfermedad, tal como el síndrome de Cushing o la osteogénesis imperfecta. En la mayoría de los casos de osteoporosis, sin embargo, ninguna otra enfermedad es evidente. Una forma aparece en la infancia o en adultos jóvenes de ambos sexos y con una función gonadal normal y se denomina frecuentemente osteoporosis idiopática, aunque la mayoría de las otras formas también son de patogénesis desconocida. La osteoporosis de tipo I aparece en un subgrupo de mujeres post-
20 menopáusicas que están entre 51 y 75 años y se caracteriza por una pérdida acelerada y desproporcionada de hueso trabecular. Las fracturas de los cuerpos vertebrales y el antebrazo distal son complicaciones habituales. Una función disminuida de la glándula paratiroides puede ser compensatoria de la una mayor resorción ósea. La osteoporosis de tipo II aparece en mujeres y hombres por encima de los 70 y está asociada con fracturas del cuello femoral, húmero proximal, tibia proximal y pelvis, puntos que contienen huesos tanto cortical como trabecular.
25 Además de la osteoporosis, las sustancias que incrementan la GJIC también pueden incrementar la formación de huesos en enfermedades metabólicas óseas, tales como raquitismo y osteomalacia y en la osteoporosis debido a la administración crónica de glucocorticoides o insuficiencia renal crónica. De este modo, la presente invención proporciona compuestos para la preparación de medicamentos útiles en la prevención y/o el tratamiento de la osteoporosis.
30

Efectos de los abridores de enlaces gap en el cartílago

- [0154] El cartílago articular es un tejido diseñado para aguantar la compresión durante el movimiento de las articulaciones e, in vivo, se somete a una amplia gama de fuerzas de carga mecánica. Se ha demostrado que la
35 mecanosensibilidad influye en el metabolismo de los condrocitos y la homeostasis de los cartílagos. En muchos tipos de células, la estimulación mecánica induce incrementos de la concentración citosólica de Ca^{2+} que se propaga de célula a célula como una onda intercelular de Ca^{2+} . La comunicación célula a célula a través de enlaces gap subyace la coordinación tisular del metabolismo y la sensibilidad a estímulos extracelulares: la permeabilidad de enlaces gap a segundos mensajeros intracelulares permite que se compartan entre varias células mecanismos de transducción
40 de señales, dando lugar finalmente a respuestas coordinadas de los tejidos. Se ha investigado en condrocitos la señalización de Ca^{2+} inducida mecánicamente y se ha demostrado que la comunicación por enlaces gap es esencial para la señalización de Ca^{2+} inducida mecánicamente en condrocitos [53]. Además, la estimulación mecánica activa la fosfolipasa C, conduciendo así a un incremento del inositol 1,4,5-trisfosfato intracelular. El segundo mensajero, mediante la permeación de enlaces gap, estimula la liberación de Ca^{2+} intracelular a células vecinas y este sistema
45 se considera muy importante para la señalización coordinada en condrocitos durante la tensión mecánica y puede proporcionar un mecanismo para la coordinación de la actividad metabólica durante el estrés metabólico en condrocitos [53;54]. La conexina predominante en el cartílago es Cx43 y, además de su papel en la regulación célula a célula del metabolismo y señalización, la Cx43 es esencial para la condrogénesis normal [47;55].

- 50 [0155] Además, la citoarquitectura de las células meniscales depende parcialmente de la comunicación por enlaces gap. La parte de fibrocartílago del menisco, así como la estructura de fibrocartílago de los tendones, depende de la comunicación intercelular. Durante las lesiones, los abridores de enlaces gap mejorarán la velocidad de reparación.

- [0156] De este modo, parece que las sustancias de la presente invención que incrementan la GJIC se pueden
55 utilizar para la prevención y/o tratamiento de enfermedades de las articulaciones que implican un acoplamiento célula a célula alterado. Tal como se ha demostrado en células osteoblásticas humanas, se sugiere que sustancias que incrementan la GJIC se pueden utilizar para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de las articulaciones que implican el estrés metabólico. Éstas incluirían cualquier forma de artritis asociada con una menor vascularización o curación de tejido cartilaginoso fracturado. El efecto del compuesto 2 y el compuesto 40 en la
60 disminución de la comunicación por enlaces gap inducida por DDT en condrocitos humanos se analizará de la misma manera que la descrita a continuación para células osteoblásticas. Los compuestos de prueba se utilizarán

en un intervalo de concentraciones de 10^{-10} - 10^{-6} mol/kg y se espera que los compuestos de prueba inviertan la disminución en la comunicación por enlaces gap inducida por el agente inductor de tumores, el DDT. De este modo, la presente invención proporciona compuestos para la preparación de medicamentos útiles en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de las articulaciones, incluyendo la artritis. La administración será una administración oral, parenteral o intraarticular.

Efectos de los abridores de enlaces gap en el cáncer

[0157] La permeabilidad de enlaces gap y la regulación de la GJIC sucede a diferentes niveles en la célula. Una disminución o ausencia de GJIC puede ser el resultado de cambios en la expresión de Cx durante la transcripción y la traducción, la alteración del procesamiento post-traducciona l y la alteración del ensamblaje de conexones y la inserción en la membrana plasmática. Una característica inusual de Cx es su corta vida media en comparación con otras proteínas de membrana. Se ha observado que el rápido recambio de las conexinas está entre 1,5 y 2 horas. Se ha observado que la degradación de Cx depende de la fosforilación, lo cual conduce a la desestabilización de algunos subtipos de conexinas. La rápida velocidad de recambio proporciona un mecanismo adicional por el cual la GJIC se puede regular rápidamente por sustancias que afectan a la vida media del ARNm de Cx, la traducción, el transporte intracelular y el ensamblaje de Cx en enlaces gap.

[0158] Otra manera de regular la permeabilidad de enlaces gap es el cierre completo o parcial de los canales de enlaces gap bajo ciertas circunstancias mediante el enrosque mecánico de las seis unidades de conexones. Se sabe que el "gating" de enlaces gap es realizado por inductores tumorales que disminuyen la GJIC. Los inductores tumorales son agentes que aumentan o aceleran la carcinogénesis cuando se proporcionan repetidamente después del inicio del tumor. Los mecanismos por los cuales los inductores tumorales modulan la GJIC no se comprenden totalmente, pero existen evidencias que apoyan que los inductores de tumores puedan afectar la GJIC mediante la alteración de la fosforilación de Cx y/o la inhibición de la expresión y ensamblaje de Cx. Resultados recientes han mostrado que la transferencia génica in vivo mediada por retrovirus de conexina 43 en tumores con una capacidad de GJIC baja reducía significativamente la tumorigenicidad [56]. Como apoyo adicional del papel esencial de la GJIC normal en la prevención del cáncer, se ha observado que ratones deficientes en CX32 presentan una incidencia muy elevada de tumores hepáticos espontáneos y un aumento de la susceptibilidad de desarrollar tumores de hígado inducidos químicamente [57]. Además, la acción inductora de tumores del Fenobarbital requiere Cx32 funcional para la progresión de los tumores [58]. Esto sugiere que el desacoplamiento de GJIC es importante para las acciones oncogénicas de fenobarbital [58].

[0159] La carcinogénesis se caracteriza por la progresiva incapacidad de los mecanismos de control del crecimiento en los que están implicados factores de crecimiento, oncogenes y genes supresores de tumores. Dado que la alteración de GJIC podría dar lugar a la alteración del control del crecimiento, el efecto de los factores del crecimiento y oncogenes en la GJIC podría ser crucial para la tumorigénesis. Se ha observado que varios oncogenes median en el desfavorecimiento de la GJIC [59]. Se observa que pp60v-src median en el cierre de enlaces gap de Cx43 mediante un mecanismo de bola y cadena que implica la fosforilación de un residuo de serina C-terminal por la MAP quinasa [59]. De manera destacada, en algunos casos, las células transfectadas con oncogenes podrían comunicarse ente sí, pero podrían carecer de la comunicación heteróloga con las células normales adyacentes.

[0160] La permeabilidad de los enlaces gap en las células tumorales utilizando el ensayo de transferencia de colorantes fue inferior que la GJIC en el tejido hepático circundante. De manera destacada, muchos tumores se encapsulan en una estructura de tipo matriz extracelular y se separan físicamente del tejido normal.

[0161] La transformación neoplásica en los tejidos humanos normales tiene lugar como resultado de una acumulación de alteraciones genéticas. Sin embargo, un punto general en la carcinogénesis y tumorigénesis es el desfavorecimiento de la GJIC. Las diversas conexinas se expresan de una manera específica de tejido. Se han detectado Cx43, Cx26, Cx32 en tejido de mama normal. Se analizó un panel de cánceres de mama humanos para el nivel de expresión de Cx43. No se observaron enlaces gap de Cx43 en carcinomas ductales in situ, carcinomas ductales infiltrantes, y carcinomas lobulares infiltrantes y parecen ser independientes del estado del estrógeno, progesterona y receptor erbB2. En cambio, las líneas celulares de cáncer de mama humano y tejidos de carcinoma mamario de roedor mostraron un desfavorecimiento de la expresión de Cx43 y resultó ser a nivel de ARNm, sugiriendo un mecanismo transcripcional para la disminución de proteína Cx43 en cáncer de mama [60]. Otro ejemplo en la conexión entre cáncer y GJIC es el carcinoma hepatocelular, donde se ha observado que la falta de conexina 32 es propensa para este tipo de cáncer específico [57]. Los estudios con células ovales han indicado que se pueden diferenciar en hepatocitos y que los derivados neoplásicos de células ovales pueden producir neoplasmas tanto hepatocelulares como biliares. La conexina específica expresada por la célula oval diferenciadora determina si se comunica con hepatocitos o células epiteliales biliares. Esta comunicación puede ser necesaria para

la posterior diferenciación y crecimiento regulado de las células ovales diferenciadoras y el deterioro de la GJIC puede contribuir a la formación de neoplasmas hepatocelulares y colangiocelulares. De este modo, la GJIC puede ser un factor clave en la diferenciación de células ovales y una GJIC bloqueada puede inducir su transformación neoplásica. Además, el análisis in vitro de la invasión tumoral en células endoteliales de pulmón de rata tratadas con malotilato mostró que el malotilato inducía el desarrollo de la adhesión célula a célula mediante enlaces gap que daban lugar a la inhibición de la invasión de células tumorales [61]. En conjunto, estos descubrimientos apoyan firmemente la hipótesis de que la alteración de la GJIC es un suceso crítico en la carcinogénesis y que las sustancias de la presente invención que aumentan la GJIC podrían ser beneficiosas en la terapia contra el cáncer. Por lo tanto, la presente invención proporciona compuestos nuevos que incrementan la GJIC como medicamentos para el tratamiento del cáncer debido a su baja concentración eficaz y consecuentemente baja toxicidad.

[0162] Entre los usos específicos de los péptidos de la presente invención se incluyen el tratamiento de las siguientes patologías médicas relacionadas con el cáncer:

Progresión tumoral: durante la tumorigénesis, la interrupción de la interacción fisiológica de células normales con sus células vecinas y la pérdida de características de diferenciación son un denominador común en la progresión tumoral. Se cree que la alteración en la comunicación por enlaces gap se encuentra entre los cambios más tempranos durante la tumorigénesis celular (Wolburg H, Rohlmann A. *Int Rev Cytol.* 1995; 157: 315-73), Klaunig JE, Ruch R.J. 1990; 135-46)). Kyung-Sun Kang, Jun-Won Yun, ByoungSu Yoon, Yoon-Kyu Lim y Yong-Soon Lee (*Cancer Letters* 166 (2001) 147-153) han demostrado que una preincubación y una coinubación con GeO₂ en células epiteliales de hígado de rata tratadas con TPA eliminaba el desfavorecimiento de la GJIC por TPA, sugiriendo que una sustancia que recupera la inhibición de GJIC se puede utilizar en la prevención o inhibición de la inducción tumoral. Suzuki J, Na H-K, Upham BL, Chang C_C y Trosko JE (*Nutrition and Cancer*, vol 36 No. 1 p. 122-8) han demostrado que el aditivo alimentario lambda-carragenano inhibe la GJIC en células epiteliales de hígado de rata de manera similar a la del promotor de tumores bien documentado, forbol éster (TPA) y, por tanto, podría jugar un papel en la carcinogénesis como agente inductor de tumores. De este modo, los compuestos de la presente invención se pueden utilizar en la prevención o tratamiento del cáncer causado por agentes inductores de tumores, tales como TPA y lambda-carragenano.

Resistencia sensible a fármacos: un aumento de la comunicación por enlaces gap mejora el microambiente en tumores y Carystinos GD, Alaoui_jamali MA, Phipps J, Yen L, Batist G.

Metástasis: La pérdida de comunicación intercelular por enlaces gap está asociada con un alto potencial metastásico en todos los cánceres con potencial metastático. (Saunders MM, Seraj MJ, Li Z, Zhou Z, Winter CR, Welch DR Donahue HJ. (*Cancer Res.* 2001; 61: 1765-1767), Nicolson GI, Dulski KM, Trosko JE, *Porc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 473-6)). La prevención de la metástasis se establece mediante el tratamiento con un abridor de enlaces gap que conservará la comunicación por enlaces gap en tumores.

[0163] El tratamiento es un tratamiento adicional a la quimioterapia convencional.

Ejemplo experimental 9

El efecto del compuesto 2 en la disminución en la comunicación por enlaces gap inducida por DDT en células osteoblásticas humanas.

Protocolo y resultados

[0164] El compuesto 1,1-bis(p-clorofenil)-2,2,2-tricloroetano, también conocido como el insecticida DDT, es un inhibidor de la comunicación por enlaces gap y presenta capacidad de inducir tumores. Inhibe la comunicación célula a célula mediante la reducción del número y tamaño de enlaces gap, así como niveles celulares disminuidos de formas fosforiladas (activas) de la proteína de enlace de unión Cx43 y estas acciones se consideran fundamentales para las propiedades oncogénicas de los compuestos. [62-64].

[0165] De este modo, los compuestos con la capacidad de evitar la disminución de GJIC inducida por inductores tumorales pueden ser candidatos potenciales para el uso en la protección contra la inducción tumoral y el tratamiento contra el cáncer [65]. Para examinar si las sustancias de la presente invención evitan la disminución en la GJIC inducida por inductores tumorales, se examinaron los efectos del compuesto 2 en el desacoplamiento inducido por DDT en células osteoblásticas humanas.

Métodos

Cultivo celular

[0166] Células de osteoblastos humanos: Se aislaron células de médula ósea humana obtenidas mediante punción de la espina iliaca posterior de voluntarios sanos (edad de 20 a 36): se recogieron 10-15 ml de material de la médula

en 15 ml PBS + Ca, Mg (Life Technologies, Cat.No. 14040) con Heparina 100 U/ml (Sigma, Cat.No. H-3149). La fracción mononuclear de la médula se aisló en un gradiente de Lymphoprep (Nycomed Pharma, Cat.No. 1001967), mediante centrifugación a 2200 rpm durante 30 min. Después de la recogida, se lavó una vez la fracción mononuclear con medio de cultivo y se centrifugó a 1800 rpm durante 10 min. Posteriormente, se contaron las 5 células y se emplacaron en un medio de cultivo a 8×10^5 células/placa de 100 mm. Medio hOB (todos los reactivos obtenidos de Life Technologies): MEM sin Rojo Fenol con Glutamax (Cat.No. 041-93013) suplementado con suero de ternera fetal al 10% inactivada por calor (Cat.No. 10106) y Penicilina/Estreptomina al 0,1% (Cat.No. 15140). El medio se cambió el día siguiente y las células se cultivaron a 37°C en CO₂ al 5% con cambio de medio cada 7 días. Después de 3-4 semanas de cultivo, las células habían alcanzado una confluencia del 70%. A continuación, el medio 10 se suplementó con Dexametasona 100 nM (Sigma, Cat.No. D-4902) durante 7 días. A continuación, las células se emplacaron para experimentos de registro de imágenes en video: se colocó un cubreobjetos de vidrio #1 de 25 mm en una placa de 35 mm (o cada pocillo de una multiplaca de 6 pocillos), las células se emplacaron a $2,5 \times 10^5$ células/cubreobjeto y se cultivaron durante 2-3 días antes de su uso.

15 Microinyección

[0167] Se cultivaron células en cubreobjetos y se fijaron a una cámara de cultivo con PDMI-2 (Medical Systems Corp.), se mantuvo a 37°C con una superfusión de CO₂, en un microscopio Zeiss Axiovert. Las microinyecciones se realizaron utilizando el micromanipulador Eppendorf 5171 y el sistema Eppendorf Transjector 5346. Se cargó una 20 micropipeta con una solución de Amarillo Lucifer 10 mM (Sigma, Cat.No. L-0259). Se inyectó cuidadosamente una célula en la monocapa con LY durante 30 segundos, se extrajo la micropipeta de la célula y, después de 30 segundos, se contó el número de células que mostraban transferencia de colorante. La luz de excitación (430 nm) fue proporcionada por un monocromador (T.I.L.L. Photonics GmbH). Las imágenes se obtuvieron con una cámara CCD intensificada (Dage MTI) y se digitalizaron con una placa de procesamiento de imágenes Matrox MVP, 25 utilizando el software para imágenes MetaMorph (Universal Imaging).

Resultados

[0168] Con el fin de evaluar la capacidad de los modificadores de enlaces gap de evitar la inducción tumoral, se 30 quiso analizar si los modificadores de enlaces gap podían invertir la comunicación por enlaces gap, inducida por un agente inductor de tumores bien conocido, el DDT. Por lo tanto, se incubaron a 37°C en una atmósfera que contenía CO₂ al 5% monocapas de células osteoblásticas humanas sobre cubreobjetos de vidrio. Se añadió DDT al medio en una concentración final de 13 µM y se dejó durante 60 minutos.

[0169] Para valorar el efecto del compuesto 2 sobre el acoplamiento celular directo después del tratamiento con DDT, se realizaron experimentos con microinyección según el método descrito anteriormente. Se inyectó el colorante 35 Amarillo Lucifer (LY) en un único osteoblasto humano en una monocapa. Después de 30 segundos, se evaluó el número de células que contenían el colorante. Bajo las condiciones de control (sin tratamiento con DDT), el colorante se extendió hasta una mediana de 14,5 células (n = 12). El mismo experimento se realizó con células 40 expuestas a DDT. Estas células mostraron un menor acoplamiento celular con una mediana de 7 (n = 13). Se añadió el compuesto 2 a la solución del baño en una concentración final de 10^{-8} mol/l, y después de 10 minutos, se realizó otra microinyección. El compuesto 2 produce un incremento en la transferencia del colorante célula a célula en todas las preparaciones con una mediana de 8,3 células (figura 15). Este incremento es altamente significativo con $p < 0,01$, utilizando el test estadístico no paramétrico Wilcoxon. De este modo, los abridores de enlaces gap son 45 capaces de invertir el menor acoplamiento intercelular relacionado con la inducción de tumores, lo que sugiere que las sustancias de la presente invención pueden ser útiles en la quimioprevención y/o el tratamiento del cáncer. Los compuestos de la presente invención son útiles para la preparación de medicamentos para la quimioprevención y/o el tratamiento del cáncer. Los compuestos de la presente invención también se pueden utilizar en una terapia de 50 combinación con otros agentes anticancerosos.

50 Métodos farmacológicos adicionales

[0170] La utilidad de los péptidos descritos en la presente invención en métodos de tratamiento terapéutico parecerá 55 clara a partir de los siguientes ejemplos adicionales.

Efectos de los abridores de enlaces gap en la curación de heridas

[0171] Una herida es una discontinuación de la anatomía normal que implica la piel y puede ser una herida 60 quirúrgica o traumática, o puede ser secundaria a diversas enfermedades, tales como la diabetes, arterosclerosis, malnutrición etc. La curación normal de las heridas es un procesos sistemático que tiene lugar por etapas e incluye

la hemostasis y la inflamación. Después de estos procesos se da la remodelación que puede durar años y es la responsable de la formación del tejido cicatrizante. La hemostasis con fibrina proporciona una superficie por debajo de la cual tienen lugar migraciones y movimientos del borde de la herida. La epitelización, la fibroplasia y la proliferación capilar en la curación de la herida comienzan inmediatamente. La expansión capilar angiogénica invade el coágulo de fibrina de la herida y en pocos días organiza una red microvascular a través del tejido de granulación que también consiste en leucocitos y células mononucleares fagocíticas. Tiene lugar una interacción muy dinámica entre los diversos componentes del tejido implicados en el proceso de curación de la herida. El proceso angiogénico es esencial para una curación satisfactoria de la herida. Los enlaces gap de la comunicación intercelular son esenciales para la creación del sincitio de fibroblastos y la proliferación de la red capilar. La distribución normal de conexina 43 es necesaria para este crecimiento de los diferentes componentes del tejido.

[0172] Varios factores locales observados a menudo durante las condiciones patológicas, tales como edema, isquemia, tensión baja de oxígeno e infección, pueden retrasar el proceso de curación de heridas. La curación de heridas implica las interacciones de muchos tipos de células y se considera que la comunicación intercelular mediada por enlaces gap juega un papel importante en la coordinación del metabolismo celular durante el crecimiento y desarrollo de tejidos y órganos. [66-68].

[0173] Se sugiere que las sustancias de la presente invención que aumentan la GJIC se pueden utilizar para el tratamiento de heridas y, en particular, para acelerar la curación de heridas. Considerando que los experimentos sobre tejido cardíaco y óseo sugieren que estas sustancias presentan una mayor eficacia durante estrés metabólico (por ejemplo, hipoglicemia, hipoxia, isquemia), se puede deducir que estas sustancias pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de úlceras isquémicas. De este modo, la presente invención proporciona compuestos para la preparación de medicamentos útiles en el tratamiento de heridas y, en particular, úlceras isquémicas.

25 Procesos de curación de heridas

[0174] Los procesos de curación son una serie de fases solapantes que empiezan con la hemostasis (coagulación). La segunda fase del proceso de curación es una cascada de respuestas inflamatorias en la que se acumulan microfagos en la parte de la herida y se inicia la formulación de tejido de granulación que implica, entre otros componentes, fibroblastos y linfocitos. Las células epiteliales empezarán a continuación a migrar desde el borde de la herida para cubrir el área. La expansión capilar desde el tejido normal hacia la herida también está implicada a efectos de asegurar el suministro de nutrientes, oxígeno y las diferentes células. Todas las células y las células del endotelio capilar presentan una comunicación intercelular activa mediante enlaces gap (Abdullah KM, Luthra G, Bilski JJ, Abdullah SA, Ryenolds LP, Grazul-Bilska AT. (Endocrine. 1999; 10: 35-41). Las áreas con un suministro bajo de oxígeno y/o una concentración elevada de radicales libres observadas a menudo en heridas con tejido necrótico, en diabetes, en arteriosclerosis, en heridas de cirugía, edema, infección, heridas bum y en insuficiencia venosa disminuirán la comunicación por enlaces gap (Nagy JI, Hossain MZ, Lynn BD, Cupern GE, Yang S, Turley EA. Cell Growth Diff. 1996; 7: 745-51)).

[0175] El efecto del abridor de enlaces gap se analiza en un cultivo de fibroblastos in vitro. Los fibroblastos se recogen de células humanas tal como se describe por Arora KK, Lee W, McCulloch C. Am J Physiol Cell Physiol. 2000; 279: C147-57). El cultivo celular se expone a 10^{-10} - 10^{-8} nM del abridor de enlaces gap y se observará un crecimiento celular significativamente más rápido. El crecimiento se analiza mediante métodos convencionales que miden la captación nuclear de timidina con el tiempo.

[0176] La estimulación de los abridores de enlaces gap del crecimiento y formación de células endoteliales del tubo endotelial se estudia antes y después de la exposición al compuesto descrito por Ashton AW, Yokota R, John G, Zhao S, Suadican SO, Spray DC, Ware JA. (J Biol Chem. 1999; 274: 35562-70).

[0177] Los abridores de enlaces gap estimulan los procesos de curación en la mucosa oral. Hara A, et al. (J Gastroenterol 1999 Feb 34:1-6) identificaron las conexinas 26 y 32 en la mucosa oral humana, una indicación de la presencia de enlaces gap en este tejido. Sin embargo, el estudio de inmunofluorescencia no halló diferencias significativas en la expresión de las conexinas entre pacientes con estomatitis aftosa y los controles. El maleato de irsogladina, que refuerza la comunicación intercelular por enlaces gap in vitro, era eficaz para el tratamiento de la estomatitis aftosa transitoria y recurrente, así como para la estomatitis aftosa sintomática e inducida por fármacos. También era útil para la prevención de episodios de estomatitis aftosa recurrente con una administración diaria que evita la reaparición de la estomatitis. Los péptidos de la presente invención se pueden utilizar de la misma manera para acelerar el proceso de curación de heridas en mucosa oral mediante el refuerzo de la comunicación intercelular por enlaces gap entre células de la mucosa oral; y los péptidos de la presente invención también son útiles para el tratamiento y la prevención de la estomatitis aftosa.

[0178] Para examinar la curación de heridas in vivo, se administran el compuesto 2 y el compuesto 40 tópicamente (intervalo de concentración 10^{-9} - 10^{-6} mol/l en gel acuoso) y parenteralmente (10^{-10} - 10^{-6} mol/kg) de dos a cuatro veces diarias a los ratones. Se crean dos heridas redondas por escisión por debajo del panniculus carnosus con una biopsia de 6 mm de penetración en la piel de la espalda de cada ratón. Después de un tratamiento de 5 días con el compuesto 2 y el compuesto 40, el efecto de la piel se evalúa histológicamente mediante microscopía de las biopsias y se mide la curación de las heridas mediante mediciones diarias del diámetro de la herida. Se predice que el compuesto 2 y el compuesto 40 no afectarán a la estructura de la piel sola, sino que ambos compuestos acelerarán la curación de heridas después de las biopsias.

10 [0179] El tratamiento con un abridor de enlaces gap asegurará la máxima comunicación por enlaces gap entre las diferentes células consideradas por jugar un papel importante en el complicado proceso de reparación y, de este modo, mejorar la reparación de heridas. El compuesto se administrará parenteralmente, tópicamente, sistémicamente u oralmente.

15 Efectos de los abridores de enlaces gap en la curación de úlceras gástricas y duodenales

[0180] Los enlaces gap también juegan un papel importante en la comunicación intercelular, proliferación y diferenciación en la célula de la mucosa gástrica. El abridor de enlaces gap estimulará procesos regenerativos después lesión inducida por I (Endo K, Watanabe S, Nagahara A, Hirose M, Sato N.(J Gastroenterol Hepatol. 1995;10: 589-94)).

[0181] Mine et al. han demostrado que la mucosa gástrica normal contiene tanto la conexina 32 como la conexina 43 [69;70]. En cambio, la mucosa gástrica alrededor de una lesión de la úlcera gástrica crónica contiene una cantidad menor de conexina 32 y conexina 43. En los estudios por Mine et al. se investigó la relación entre la aparición de conexas y la curación de úlceras. Cuando se observó la curación de las úlceras, las conexas 32 y 43, que disminuyeron en la etapa de úlcera activa, habían vuelto casi a niveles observados en la mucosa gástrica normal. Estos datos indican que la desaparición de la conexina 32 y la conexina 43 está estrechamente relacionada con la fase de lesiones de úlcera gástrica crónica. Además, utilizando un modelo de rata de úlcera gástrica inducida por ácido acético, el mismo grupo de investigadores demostró que el efecto clínico del fármaco antiúlcerica cimetidina estaba estrechamente relacionada con la reaparición de la conexina 32 [69].

[0182] Los enlaces gap son importantes en el sistema de defensa de la mucosa gástrica y la restitución de lesión inducida por ácido. Takahashi N, Joh T, Yokoyama Y, Seno K, Nomura T, Ohara H, Ueda F, Itoh M. (J Lab Clin Med 2000 Aug;136(2):93-9). Se han acumulado evidencias de que la comunicación intercelular por enlaces gap (GJIC) determinaba si la GJIC media en un proceso de restitución en la mucosa gástrica. Las ratas macho Srague-Dawley se pusieron en ayunas y se anestesiaron. La lesión gástrica se indujo mediante perfusión luminal con HCl 0,2 N durante 10 minutos. La integridad de la mucosa se monitorizó continuamente mediante la medición de la depuración del ácido etilendiaminotetraacético marcado con cromio 51, el cual se utilizó para el análisis de la recuperación de la lesión. La perfusión con octanol al 0,25% (OCT; inhibidor de GJIC) se inició después de la lesión con ácido para valorar su efecto en la restitución. También se evaluó el efecto de la irsogladina (IG; activador de GJIC). La GJIC de la mucosa gástrica se evaluó inmunohistoquímicamente con una proteína de enlace gap (conexina 32) con anticuerpo monoclonal. La recuperación de la lesión de la mucosa inducida con ácido sucedió rápidamente cuando la perfusión con ácido era discontinua (en aproximadamente 60 minutos). OCT, que no causó ninguna lesión a la mucosa gástrica normal, inhibió significativamente la restitución. La IG invirtió esta inhibición de una manera dependiente de la dosis. En un estudio inmunohistoquímico, se demostró el daño inducido por OCT del enlace gap, pero no después del pretratamiento con IG. Estos hallazgos sugieren que la GJIC puede jugar un papel crítico en la restitución en la mucosa gástrica de rata y los péptidos de la presente invención son útiles en el tratamiento de úlceras, tales como úlceras gástricas y duodenales. Para sustanciar esta afirmación, se pueden realizar experimentos en ratas utilizando el diseño experimental general de Takahashi N et al. 2000, anterior, con la administración de COMPUESTO 2 y el COMPUESTO 40 que son estables en solución ácida en concentraciones en el intervalo de 10^{-11} - 10^{-7} M en las ratas. Se espera que estos experimentos muestren el efecto facilitador del COMPUESTO 2 y el COMPUESTO 40 en el acoplamiento de enlaces gap y contrarresten el efecto de la ceruleína dando lugar a la curación de la úlcera gástrica.

55 [0183] La administración de los péptidos será oralmente o parenteralmente, por ejemplo intravenosamente.

[0184] Por lo tanto, las sustancias de la presente invención que incrementan la GJIC pueden inducir la curación de úlceras gástricas y duodenales. De este modo, la presente invención proporciona compuestos para la preparación de medicamentos útiles en el tratamiento de úlceras gástricas y duodenales.

60

Función de los enlaces gap en biología vascular

- [0185]** La coordinación de respuestas celulares en la interfase endotelial entre la sangre y los tejidos subyacentes está mediada por múltiples mecanismos de señalización, incluyendo la comunicación intercelular directa a través de enlaces gap. Entre las funciones en las que se ha implicado la comunicación intercelular endotelial por enlaces gap están en comportamiento migratorio de las células endoteliales después de una lesión, angiogénesis, crecimiento endotelial y senescencia, y la coordinación de respuestas vasomotoras [71].
- [0186]** La regulación del flujo sanguíneo en un amplio rango dinámico requiere las respuestas coordinadas de arterias de resistencia y arterias de alimentación. Dicha coordinación entre los vasos se puede conseguir mediante los efectos vasculares del estrés de cizalladura ejercidos por el torrente sanguíneo o por la conducción de señales vasomotoras a lo largo de células de la pared vascular. De hecho, la aplicación local de ciertos compuestos vasoactivos, tales como acetilcolina (ACh) o norepinefrina (NE), induce no sólo la dilatación o constricción local, sino también respuestas vasomotoras algunos milímetros hacia arriba y hacia abajo [71]. Las respuestas vasomotoras también se pueden conducir desde los capilares a las arteriolas y pueden contribuir a la correlación entre la demanda de los tejidos y el suministro sanguíneo. Esto se ha demostrado de la siguiente manera: Cuando estimulan las fibras de un músculo para la contracción, se observó que las arteriolas por encima de los capilares que suministran estas fibras se dilataban [72].
- [0187]** La velocidad de conducción elevada concuerda con una transmisión electrotonica de una señal a lo largo de la pared vascular. De hecho, se ha demostrado que las hiperpolarizaciones y despolarizaciones inducidas localmente conducen varios milímetros hacia arriba en las células de músculo liso endoteliales y vasculares. La conducción de la señal eléctrica requiere el acoplamiento de las células vasculares mediante enlaces gap que proporcionan conductos de poca resistencia eléctrica entre las células. En el tejido vascular, se expresan al menos tres proteínas conexas (Cx) diferentes (Cx37, Cx40, y Cx43) que forman enlaces gap. Cx40 parece ser la isoforma de conexina predominante en células endoteliales aórticas, mientras que en el músculo liso, es abundante la expresión de Cx43.
- [0188]** Los estudios en ratones deficientes en Cx40 (Cx40^{-/-}) han demostrado que la expansión de la vasodilatación inducida por la aplicación local de acetilcolina o bradiquina es atenuada severamente en animales Cx40^{-/-} en comparación con animales normales de tipo salvaje (Cx^{+/+}) [73]. Además, la presión de arterias sanguíneas aumenta significativamente en animales Cx40^{-/-} en comparación con ratones normales de tipo salvaje (Cx^{+/+}). Estos resultados apoyan el papel significativo de Cx40 en la comunicación intercelular vascular e indican que la comunicación por enlaces gap dañada en la pared vascular se asocia con una menor transmisión de las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio que, a su vez, aumenta la resistencia vascular y provoca hipertensión. Los recientes estudios in vivo sugieren que las oscilaciones en la presión normal en el riñón son extremadamente importantes para la regulación de presión sanguínea [74]. De este modo, las respuestas vasomotoras dañadas debido al poco acoplamiento célula a célula pueden contribuir al desarrollo de la hipertensión en animales deficientes en Cx40.
- [0189]** El desfavorecimiento de la expresión de ARNm y los niveles de proteína de Cx43 en células endoteliales senescentes sugiere que la comunicación intercelular por enlaces gap dañada podría jugar un papel en la progresión del envejecimiento vascular [75].
- [0190]** En base a la información disponible sobre el papel de enlaces gap en respuestas vasculares, es probable que un compuesto farmacológico que incrementa el acoplamiento con enlaces gap en la pared vascular, podría facilitar repuestas vasculares dirigidas y mejorar el suministro sanguíneo durante condiciones con mayor demanda metabólica (por ejemplo, ejercicio físico, taquicardia), y durante isquemia. Además, dicha sustancia es probable que prevenga y/o trate la hipertensión. Por consiguiente, la presente invención proporciona compuestos que incrementan el acoplamiento por enlaces gap y/o GJIC en la pared vascular y, de este modo, son útiles en la prevención o tratamiento de la hipertensión.

Procedimiento experimental

- [0191]** Para todos los experimentos, se utilizan arterias de resistencia aisladas (diámetro interno de aproximadamente 200 μ m) del mesenterio de ratas. Las arterias son ramificaciones de tercer orden de la arteria mesentérica y se diseccionan del mesenterio de ratas Wistar macho de 14-18 semanas de vida. Las arterias se montan en un miógrafo para medir la fuerza isométrica y se estiró pasivamente para obtener la máxima fuerza. El baño del tejido se divide en dos y se monta una arteria en cada una de las dos mitades. Las arterias se bañan en una solución fisiológica de sal tamponada en bicarbonato y, a menos que se indique lo contrario, se gaseó con CO₂

al 5% en O₂ al 21%.

5 [0192] Para la evaluación de la vasomoción, las arterias se activan con noradrenalina en una concentración submaximal. Esto se realiza después de la extracción del endotelio y con concentraciones crecientes de GMPc, que se sabe que aumenta el grado de vasomoción y comunicación intercelular.

10 [0193] Para la evaluación de la función endotelial, se activan las arterias con una concentración de noradrenalina casi máxima y se relajan en presencia de noradrenalina con concentraciones creciente de acetilcolina, que se sabe que relaja las arterias de forma dependiente del endotelio en estas arterias, a través de un mecanismo parcialmente dependiente de NO y parcialmente dependiente de EDHF.

[0194] El efecto de 10⁻⁸ M y 10⁻⁶ M del compuesto 2 y el compuesto 40 se valora sobre la vasomoción y sobre las respuestas a acetilcolina. Cuando el fármaco está presente se utiliza una preincubación de por lo menos 5 min.

15 [0195] Para valorar la vasomoción, una arteria en el baño de tejido sirve como control y la otra arteria se trata con uno entre el compuesto 2 y el compuesto 40.

20 [0196] En experimentos con hipoxia, los tejidos se exponen a CO₂ al 5% en N₂ durante por lo menos 5 minutos antes de realizar los experimentos. Este procedimiento disminuye la PO₂ del baño hasta aproximadamente 5 mm Hg.

[0197] Se espera que los compuestos de la presente invención aumentarán la vasomoción y vasodilatación inducida por acetilcolina. Consecuentemente, estas sustancias serán útiles en el tratamiento de hipertensión y enfermedades vasculares asociadas con la vasoconstricción. El modo de administración será oral o parenteral.

25 Músculos lisos

30 [0198] Sistema vascular. La comunicación intercelular a través de canales de enlaces gap juega un papel fundamental en la regulación y modulación del tono vascular de los miocitos a lo largo del árbol vascular (Christ GJ, Spray DC, Moore LK, El-Sabban ME, Brink PR. (Circ Res. 1996; 79: 631 - 646)). Otro papel importante de la comunicación por enlaces gap es la expansión de la hiperpolarización entre células de músculo liso implicadas en la respuesta a la relajación vascular (Benny JL, Paicca C. Am J Physiol Heart Circ Physiol 1994; 266: H1465-72)).

35 [0199] Las funciones especializadas del endotelio requieren una comunicación intercelular por enlaces gap entre células endoteliales en la monocapa y entre el endotelio y otras células presentes en la pared de los vasos. La comunicación entre estos tipos de células diferentes a través de enlaces gap en capilares coronarios, así como en otros vasos, se ha documentado en varios estudios. También se han demostrado evidencias de la implicación en la arteriogénesis adaptativa (Cai W-J, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Shaper W, Schaper J (J Mol Cell Cardiol 2001; 33: 957-67), Wang H-Z, Day N, Valcic M, Hsieh K, Serels S, Brink PR, Christ GJ. (Am J Physiol Cell Physiol. 2001; 281: C75-88), Schuster A, Oishi H, Benny J-L, Stergiopoulos N, Meisater J-J. (Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001; 280: H1088-96)).

45 [0200] En diferentes situaciones patofisiológicas vasculares en las que se altera la monocapa endotelial como en lesiones hipercolesterolémicas inducidas por la dieta, la comunicación por enlaces gap disminuye en los músculos lisos vasculares (Polacek D, Bech F, McKinsey JF, Davies PF. (J Vasc Res 1997; 34: 19-30). Se observa lesión en la capa celular endotelial durante estasis venosa y cuando se desarrolla tromboflebitis. Kwak BR, Pepper MS, Gros DB, Meda P (Molec Biol Cell 2001; 12: 831-845) han demostrado claramente que la comunicación por enlaces gap sirve para coordinar la migración celular durante la reparación celular y también es importante para la expansión capilar durante la angiogénesis.

50 [0201] El tratamiento con compuestos que facilitan la comunicación por enlaces gap mejorará la comunicación intercelular dañada en las áreas vasculares afectadas y será particularmente útil durante la isquemia orgánica, por ejemplo claudicatio intermittens e infarto de miocardio.

55 [0202] Sin embargo, después de la lesión con catéter de globo en la carótida de la rata, el proceso de curación vascular se caracteriza por un aumento de la comunicación por enlaces gap. (Yeh HI, Lupu F, Dupont E, Severs NJ, (Arterioscle Thromb Vasc Biol 1997;17:3174-84). El compuesto se administrará antes de la intervención del globo y es preferiblemente una terapia adicional al tratamiento médico convencional de esta patología. La administración del compuesto será parenteralmente.

60 [0203] El efecto se analizará en muestras de tejido antes y en puntos de tiempo diferentes después de la lesión con el catéter de globo. Se observará una curación más rápida de la superficie endotelial utilizando microscopía

convencional. También se observó una mejora de la comunicación por enlaces gap.

[0204] (Arterioscle Thromb Vasc Biol 1997;17:3174-84). El tratamiento con abridores de enlaces gap incrementará el proceso de curación.

5

[0205] El efecto profiláctico del tratamiento con un abridor de enlaces gap, tal como el compuesto 2 y el compuesto 40, se analizará en una base experimental descrita por Yeh HI, Lupu F, Dupont E, Severs NJ, (Arterioscle Thromb Vasc Biol 1997;17:3174-84). El compuesto 2 o el compuesto 40 se administrarán antes de la intervención del globo utilizando dosis en el intervalo de 10^{-11} a 10^{-8} dependiendo de la cinética biológica del compuesto, por ejemplo, tal como se determina en modelo de arritmia inducido por cloruro cálcico descrito anteriormente. Se tomarán muestras de tejido antes y en puntos de tiempo diferentes después de la lesión con el catéter de globo. Se observará una curación más rápida de la superficie endotelial utilizando microscopía convencional. También se observó una mejora de la comunicación por enlaces gap.

10

15 **[0206]** La administración del compuesto será, por ejemplo, parenteralmente.

[0207] En otras enfermedades, se altera la comunicación por enlaces gap entre células de músculo liso. En el cuerpo cavernoso, se establece una red celular sincitial mediante enlaces gap y es crítica para la función eréctil y asegura que las células de músculo liso corporal y arterial del pene respondan de una manera uniforme y coordinada. (Christ GJ. (Int J Impot Res. 2000; 12 suppl. 4: S15-25), Melman A, Christ JC. (Urolog Clin North America. 2001; 28: 217-31)). Se observa una función eréctil dañada en diabetes, arteriosclerosis, diferentes enfermedades neurológicas y muchas enfermedades crónicas. A partir de estudios en diabetes, una correlación entre inervación neuronal y acoplamiento intercelular apunta hacia la potencial plasticidad funcional del medio corporal aunque no se establece la comunicación intercelular funcional a través de enlaces gap.

20

25

[0208] El tratamiento con un compuesto que facilita la abertura de enlaces gap mejorará la comunicación a través de enlaces gap y normalizará así la coordinación compleja entre las células de músculo liso en el cuerpo cavernoso y los vasos.

30

[0209] Se establecen células lisas corporales aisladas de ratas tal como se describe por Christ GJ, Moreno AP, Melman A, Spray DC. (Am J Physiol 1992; 263: C373-83). Se mide la comunicación de enlaces gap con Amarillo Lucifer y otro colorante fluorescente utilizando la técnica de microinyección tal como se ha descrito anteriormente o utilizando un método FACS, tal como el descrito por Juul MH et al. Cell Adhes Commun 2000;7(6):501-12. El número de células fluorescentes se cuenta para varios inhibidores de enlaces gap con o sin diferentes dosis de los abridores de enlaces gap descritos, por ejemplo, el compuesto 2 o el compuesto 40, en el intervalo de 10^{-10} - 10^{-8} nM. Se identificará una mejora de más del 25-50% de la comunicación de enlaces gap después de la exposición con los abridores de enlaces gap con una concentración de compuesto en el intervalo indicado.

35

40

[0210] El análisis farmacológico in vivo de la función eréctil de los compuestos se realizará 10 semanas después de la diabetes inducida por estreptozotocina (35 mg/kg i.p.) en ratas (8 semanas de vida) tal como se ha descrito por Rehman J, Cheven E, Brink P, Peterseon B, Walcott B, Wen YP, Melman A, Christ G. (Am J Physiol 1997; 272: H1960-71). Los reflejos peniles y la presión intracavernosa se miden durante la administración local y sistémica de diferentes dosis de los diferentes abridores de enlaces gap con mediciones y técnicas descritas por el mismo grupo de investigación. Se observará un incremento en los reflejos peniles y en la presión intracavernosa del 25% o superior.

45

[0211] El tratamiento de la disfunción eréctil se puede administrar localmente en el cuerpo penil, como inyección subcutánea u oralmente. El tratamiento será una monoterapia o un tratamiento adicional a un tratamiento convencional de esta patología.

50

[0212] La retinopatía diabética se puede diagnosticar de manera muy temprana después de la aparición de la enfermedad mediante la identificación de alteraciones en la velocidad del flujo sanguíneo (Bursell S-V, Clermont AC, Shiba T, King GL. (Curr Eye Res. 1992; 11: 287-95), rotura de la barrera retinal-sanguínea (Cunha-Vaz JG, Faria de Abrue JR, Campos AJ, Figo GM. (Br J Ophthalmol. 1975; 59: 649-56), Do Carmo A, Ramos P, Reis A, Proenca R, Cunha-Vaz JG. (Exp Eye Res. 1998; 67: 569-75)) y/o pérdida de autoregulación (Kohner EM, Patel V, Rassam SMB. (Diabetes 1995; 44: 603-607)). Mediante la utilización de técnicas de transporte de trazador y doble "clamp" de parche celular, Oku H, Koda T, Sakagami K, Puro DG. (Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001;42: 1915-1920) han demostrado un amplio acoplamiento célula a célula. El cierre de las vías de enlaces gap altera la organización multicelular de los microvasos retinales y contribuye a la disfunción vascular retinal diabética. Zhou ZY, Sugawara K, Hashi R, Muramoto K, Mawatari K, Matsukawa T, Liu ZW, Devadas M, Kato S. (Neuroscience. 2001; 102: 959-67) también demostraron que el oxígeno reactivo está implicado en el desacoplamiento de enlaces gap retinales y en el

55

60

reacoplamiento cuando se suministra glutatión.

5 [0213] El efecto de los abridores de enlaces gap sobre la retinopatía diabética se estudiará in vitro utilizando el modelo de rata diabética inducida por estreptozotocina tal como se ha descrito anteriormente. Se transferirán a cubreobjetos microvasos retinales aislados nuevos (Sakagami K, Wu DM, Puro DG. J Physiol (Lond). 1999; 521: 637-50) tal como se ha descrito por Oku H, Koda T, Sakagami K, Puro DG. (Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001; 42: 1915-1920). En esta preparación, la comunicación intercelular entre las células en la pared vascular se medirá con colorante o con trazador. Se analizarán diferentes concentraciones en el intervalo de 10^{-10} a 10^{-7} M de los abridores de enlaces gap, compuesto 2 o compuesto 40, y se observará en la retina diabética un incremento significativo en la comunicación intercelular en comparación con la línea base. Se observará una mejora similar cuando se comparan con los controles (animales sanos). El tratamiento con un abridor de enlaces gap detendrá o ralentizará la progresión de la patología. El tratamiento será sistémico, local u oral.

15 [0214] La terapia es preferiblemente adicional a un tratamiento antidiabético convencional.

20 [0215] No sólo la retinopatía diabética, sino que también otras anomalías vasculares en la retina, como por ejemplo, la arteriosclerosis, se beneficiarán de una comunicación mejorada por enlaces gap mediante el tratamiento con un abridor de enlaces gap. Se ha demostrado que los enlaces gap conectan las células horizontales con otras entre sí y son responsables del acoplamiento eléctrico entre neuronas (Raviola E, Gilula NB. (Proc Natl Acad Sci USA. 1975; 65: 192-222), Raviola E, Dacheux RF. (J Neurocytol. 1990; 19: 731-36), Schneeweis DM, Schnapf JL. (Science 1995;268: 1053-56)). También se indica la transmisión de señales escotópicas entre bastones y conos a través de enlaces gap (Bloofield SA, Dacheux RF. (Retinal Eye Res. 2001; 20: 351-384)). Por lo tanto, un abridor de enlaces gap incrementará la comunicación entre no sólo las neuronas, sino también será capaz de evitar los bastones o conos menos vitales y aún así llevar la señal escotópica al nervio oftálmico.

25 [0216] El efecto de abridores de enlaces gap en la retinopatía arterioesclerótica inducida por la dieta se estudiará in vitro utilizando el modelo de rata a (no diabético) tal como se ha descrito anteriormente. La comunicación intercelular entre las células en la pared vascular se medirá con el método de transferencia de colorante Amarillo Lucifer después de la microinyección o con el método FACS.

30 [0217] El compuesto se administrará parenteralmente.

35 [0218] Los músculos lisos en la vejiga urinaria se caracterizan por contracciones fásicas y muestran contracciones fásicas espontáneas. Sin embargo, la vejiga se encuentra en la condición sana capaz de contener varios cientos de mililitros de orina sin mostrar un aumento de la presión intravesical. A diferencia de la vejiga normal, las vejigas inestables desarrollan aumentos espontáneos en la presión intravesical en relación a la incontinencia de urgencia (Turner WH, Brading AF. (Pharmacol Therap. 1997; 75: 77-110). En comparación con el músculo liso gastrointestinal, los músculos lisos de la vejiga no generan de manera espontánea contracciones coordinadas (Stevens RJ, Weinert JS, Publcover NG. (Am J Physiol. 199; 277: C448-60), Hashitani H, Fukuta H, Takano H, Klemm MF, Suzuki H. (J Physiol. 2001; 530: 273-86)). Recientemente se han demostrado las comunicaciones tanto eléctricas y morfológicas mediante enlaces gap entre células de músculo liso en la vejiga. (Hashitani H, Fukuta H, Takano H, Klemm MF, Suzuki H. (J Physiol. 2001; 530: 273-86), Wang H-Z, Lee SW, Day NS, Christ GJ. (Urology. 2001; Suppl 6A: 111)). La importancia de estos enlaces gap se demostró mediante la inhibición específica de la comunicación. Las ondas de excitación espontánea en el músculo liso de vejiga se propagan a través de enlaces gap.

[0219] La incontinencia de urgencia incontrolada se regulará por tanto mediante el tratamiento con un abridor de enlaces gap.

50 [0220] La mejora de la comunicación por enlaces gap después del tratamiento con un abridor de enlaces gap se estudia en un cultivo celular de células de músculo liso recogidas de la vejiga urinaria utilizando el análisis FACS. El compuesto se dosificará en concentraciones que varían desde 10^{-10} a 10^{-7} M y se observará un aumento significativo en la comunicación en cultivos celulares expuestos a poco oxígeno o estrés por oxígeno.

55 [0221] La presión intravesical se medirá después del pretratamiento y el tratamiento agudo con un abridor de enlaces gap, preferiblemente el compuesto 2 o el compuesto 40, en cobayas normales y en animales con la función de la vejiga experimentalmente dañada. Los animales se anestesian con fenobarbital y la vejiga se cateteriza con un catéter para orina que permite la entrada y salida de agua y un catéter con un transductor "tip". Un abridor de enlaces gap no cambiará una relación volumen-presión normal, mientras que esta relación se normalizará en la vejiga dañada.

60

[0222] La administración será parenteralmente, oralmente o en la vejiga urinaria. La administración será preferiblemente como una adición a un tratamiento con fármacos destinados para normalizar la contracción muscular en la vejiga urinaria.

5 [0223] Las células mioepiteliales que se presentan en los conductos glandulares submandibulares, en la uretra, en los conductos biliares, conductos pancreáticos, conductos lacrimales, se conectan con enlaces gap y la comunicación intercelular es esencial para la sincronización de la función contráctil de las células mioepiteliales (Taugner R, Schiller A. (Cell Tissue Res. 1980; 206: 65-72). La contractilidad dañada en estos conductos se puede normalizar mediante el tratamiento con un abridor de enlaces gap administrado parenteralmente u oralmente.

10 [0224] La comunicación intercelular en nódulo av cardiaco se mantiene a través de enlaces gap. Una función disminuida conduce a una menor conducción y puede conducir a un bloqueo a-v total. El bloqueo AV se observa en el infarto de miocardio agudo, en la enfermedad cardiaca isquémica, intoxicación por digital, intoxicación del bloqueador del canal de calcio y un abridor de enlaces gap mejorará la conducción av.

15 [0225] La infusión intravenosa de CaCl_2 (100 mg/kg/min) en ratones anestesiados neurolépticos indujo un bloqueo av de segundo grado. Cuando se pretrataron con un abridor de enlaces gap en dosis de 10^{-11} a 10^{-6} mol/kg i.v., la dosis de CaCl_2 fue significativamente superior antes de observar el bloqueo av. Otra medición del efecto fue el incremento en el tiempo de ausencia del 30-65% hasta que se observó el bloqueo av de segundo grado CaCl_2 inducido por CaCl_2 . La inducción por CaCl_2 del bloqueo av se describe Ronsberg M, Saunders TK, Chan PS, Cervoni P. Med Sci. 1986;14: 350-51).

20 [0226] La variación del grado de comunicación por enlaces gap aumentado por el bloqueo av normalizará la conductancia av y se reestablecerá el ritmo sinusoidal normal.

25 [0227] La administración de abridores de enlaces gap será parenteralmente u oralmente.

Efectos de abridores de enlaces gap en las cataratas

30 [0228] Las lentes de los ojos de los vertebrados son un quiste sólido de células que crecen durante la vida mediante la adición de nuevas células en la superficie. Las células más viejas, enterradas por las generaciones más nuevas, se diferencian en fibras prismáticas largas, perdiendo sus orgánulos celulares y rellenando sus citoplasmas con concentraciones elevadas de proteínas solubles, los cristalinos. Las fibras de lentes de larga vida están interconectadas mediante enlaces gap, tanto con sí mismas como con una capa anterior de células epiteliales cuboidales simples en la superficie de la lente. Esta red de enlaces gap une las células de la lente en un sincitio con respecto a moléculas pequeñas, permitiendo la cooperación metabólica: difusión intercelular de iones, metabolitos y agua. En contacto con nutrientes en la superficie de la lente, las células epiteliales retienen sus orgánulos celulares y son capaces de proporcionar la energía metabólica para mantener las concentraciones correctas de iones y metabolitos en los citoplasmas de las fibras de las lentes, de manera que los cristalinos permanecen en solución y no se agregan (cataratas). En las lentes están presentes tres tipos de conexinas: Cx43, Cx46 y Cx50 y las mutaciones en cada una de estas proteínas de enlaces gap se han relacionado con las cataratas [79-81]. Estos hallazgos demuestran que la GJIC es esencial para el metabolismo y función normales de las lentes. Por lo tanto, se sugiere que las sustancias de la presente invención, que se sabe que incrementan la GJIC, se pueden utilizar en la prevención y/o el tratamiento de las cataratas. Los canales de enlaces gap formados por las conexinas Cx46 y Cx50 proporcionan vías para la comunicación entre las células de las fibras en las lentes transparentes normales. Los ratones con falta de un gen ("knockout") desprovisto de estas conexinas desarrollan cataratas nucleares que se asocian con la proteólisis de los cristalinos. Estos estudios han establecido la importancia de los enlaces gap en el mantenimiento normal de la transparencia de las lentes mediante la disposición de un mecanismo de señalización o componente estructural célula a célula para la organización correcta de la membrana de las lentes y las proteínas citoplasmáticas (Gong et al., Cell 1997 Dec 12;91(6):833-43). El aumento de la concentración de calcio intracelular es un estímulo principal de la activación de la cisteína proteasa dependiente de calcio Lp82 que es un iniciador clave del proceso de la cataractogénesis (Baruch et al., J Biol Chem 2001;276(31):28999-9006). Para examinar la capacidad de los compuestos 2 y 40 de la presente invención para evitar las cataratas, se analiza el efecto de dichos compuestos (10^{-10} - 10^{-6} mol/l) en el modelo de células de lentes ovinas cultivadas descrito por Churchill et al. (J Cell Sci 1996;109 (Pt 2):355-65)). Brevemente, se investiga la señalización por Ca^{2+} célula a célula en cultivos primarios de células epiteliales ovinas utilizando el colorante informado de Ca^{2+} fura-2 y microscopía de fluorescencia. La estimulación mecánica de una única célula con una micropipeta inicia un incremento propagado en el Ca^{2+} libre citosólico que se extiende desde la célula estimulada a través de 2-8 niveles de células circundantes. Se espera que los compuestos 2 y 40 de la invención incrementen el acoplamiento célula a célula entre las células de las fibras de las lentes y eviten las cataratas.

[0229] El modo de administración será tópico.

[0230] De este modo, la presente invención proporciona compuestos para la preparación de medicamentos útiles en la prevención y/o tratamiento de las cataratas.

5

Efectos de abridores de enlaces gap en enfermedades del oído

[0231] Se han observado muchas mutaciones diferentes de Cx32 en la neuropatía periférica hereditaria-síndrome de Charcot-Marie-Tooth unido a sordera X y se han detectado varias mutaciones de Cx26 y Cx31 en la sordera [80].

10 De este modo, se sugiere que las sustancias de la invención, que son conocidas por incrementar la GJIC, se pueden utilizar en la prevención y/o tratamiento de ciertos tipos de sordera que están asociadas con una GJIC dañada en el oído. De este modo, la presente invención proporciona compuestos para la preparación de medicamentos útiles en la prevención y/o el tratamiento de la sordera asociada con una GJIC dañada.

15 Función de los abridores de enlaces gap en los intestinos

[0232] Tanto la Cx43 como la Cx45 se expresan en la pared del intestino delgado [82]. Se cree que las células que expresan Cx45 a lo largo del plexo muscular profundo del intestino delgado es probable que actúen como un constituyente de un sistema de control del ritmo, que puede incluir un sistema conductivo, mediante la formación de una red celular que actúa a través de tipos específicos de enlaces gap. En el intestino y en el colon, las células intersticiales de Cajal (ICC) son células marcapaso localizadas entre los músculos lisos intestinales; generan ondas lentas espontáneas de las capas de músculo liso y median en la neurotransmisión. La red celular tridimensional de ICC está conectada por enlace gap de Cx43 entre ICC y entre ICC y las células de músculo liso [83]. En pacientes con la enfermedad de Hirschsprung, la falta de expresión de Cx43 en el intestino agangliónico sugiere que la comunicación intercelular dañada entre ICC y las células de músculo liso puede ser parcialmente responsable de la disfunción de la motilidad en este trastorno [83]. Los pacientes con la enfermedad de Chaga (debido a una infección con el protozoo trypanosoma Cruzi) experimentan una reducción destacada de la expresión de CX que se considera responsable de la cardiomiopatía y el megacolon severamente dilatado observados en estos pacientes [7]. De este modo, la comunicación normal por enlaces gap entre ICC y entre ICC y células del músculo liso se considera esencial para la motilidad normal en el intestino delgado y en el colon. Por lo tanto, un objetivo adicional de la invención es proporcionar una sustancia que incremente la conductancia por enlaces gap en el intestino y, por tanto, pueda ser útil en el tratamiento de trastornos de la motilidad gastrointestinal.

20

25

30

Órganos reproductores y enlaces gap

35

Ovarios

[0233] Los enlaces gap entre células granulosas y entre oocitos y las células granulosas circundantes juegan un papel importante durante el desarrollo del folículo ovárico. En el nacimiento, el ovario contiene folículos primordiales que consisten en oocitos detenidos melóticamente rodeados de una única capa de células de apoyo (granulosa). Periódicamente, los subgrupos de folículos primordiales experimentan un desarrollo adicional durante el cual el oocito incrementa su tamaño y las células granulosas proliferan, se estratifican y desarrollan un antrum lleno de fluido. Después de la ovulación, los oocitos reinician la meiosis y las células granulosas retenidas en el folículo se diferencian en células esteroideogénicas, formando el corpus luteum.

45

[0234] Los enlaces gap conectan directamente las células adyacentes que permiten el movimiento por difusión de iones, metabolitos y otras potenciales moléculas de señalización importantes para la regulación del ciclo ovárico y la fertilidad femenina. En apoyo al papel esencial de los enlaces gap en la función normal del ovario, se ha demostrado que los ratones deficientes en Cx37 carecen de folículos maduros (Graafian), no consiguen ovular y desarrollan numerosas corpora lutea inapropiadas. Además, se consigue detener el desarrollo de oocitos antes de la competencia meiótica. De este modo, la señalización célula a célula a través de canales intercelulares regula de manera crítica el grupo altamente coordinado de interacciones celulares requeridas para la oogénesis satisfactoria y la ovulación [84].

50

55

60

[0235] La hormona estimuladora de folículos (FSH) es el principal regulador del crecimiento y el desarrollo del folículo ovárico. A lo largo de sus muchas acciones en la maduración folicular, la FSH mejora el acoplamiento célula a célula entre las células granulosas y aumenta la expresión del gen de Cx43, y posiblemente, la formación de nuevos enlaces gap. [85]. En cambio, la hormona luteinizante (LH) interrumpe la comunicación célula a célula en el folículo ovárico, conduciendo a una disminución de las concentraciones intra-oocitos de AMPc después de la reanudación de la meiosis [86].

[0236] Estos datos ilustran que la presencia de comunicación por enlaces gap normal a través de Cx37 y Cx43 es esencial para el crecimiento folicular normal y la ovulación. De este modo, es probable que ciertas formas de infertilidad femenina sean debidas a poco acoplamiento célula a célula en los ovarios. Por lo tanto, se puede utilizar una sustancia que incrementa el acoplamiento célula a célula para el tratamiento de la infertilidad femenina en mujeres con una expresión y/o regulación dañadas de la función ovárica de enlaces gap. Los compuestos de la presente invención que presentan la capacidad incrementar la GJIC son útiles para el tratamiento de la infertilidad femenina que es debido al poco acoplamiento célula a célula en los ovarios.

10 Útero

[0237] Las poderosas contracciones sincronas del útero en el parte dependen del acoplamiento eléctrico de las células de músculo liso del miometrio mediante enlaces gap. En los seres humanos y otros mamíferos, los enlaces gap son escasos en el miometrio de los úteros no embarazados, pero resultan abundantes en el embarazo y/o con el inicio del parto. La proteína predominante del enlace gap expresada por células de músculo liso del miometrio en humanos es Cx43, pero también se han identificado la Cx26, Cx40 y Cx45 en el miometrio humano [87;88].

[0238] Debido a la gran importancia de las concentraciones musculares coordinadas durante el parto, es un objetivo adicional de la invención proporcionar una sustancia que incremente el acoplamiento célula a célula en el miometrio que se espera que tenga una influencia positiva en la sincronización de las contracciones musculares y dicha sustancia se pueda utilizar junto con oxitocina para la inducción y facilitamiento del parto. Dicho objetivo se consigue con los presentes compuestos.

[0239] Huldobro-Toro JP, Gonzalez R, Varas JA, Rahmer A, Gonzalez R. (Rev Med Chil 2001 Oct; 129(10):1105-12) valoraron la existencia de mecanismos de control del ritmo relacionados con la actividad motora rítmica de los vasos sanguíneos de placenta humana, y hallaron que el bloqueo de los enlaces gap disminuía la frecuencia y amplitud de contracciones espontáneas. Concluyeron que las contracciones rítmicas en la capa circular de vasos coriónicos y umbilicales se desencadenan por células marcapaso localizadas en la capa circular del músculo liso de los vasos sanguíneos y se extienden a través de enlaces gap; probablemente contribuyen al control del flujo sanguíneo. De este modo, la presente invención proporciona una sustancia que incrementa el acoplamiento célula a célula en vasos sanguíneos de placenta que se espera que tenga una influencia positiva en la circulación sanguínea de la placenta y el desarrollo del feto.

Órganos reproductores masculinos

[0240] Cx43 es la conexina más abundante en los testículos y, de manera destacada, cepas de ratas con un nivel disminuido de expresión de Cx43 presentan una espermatogénesis dañada (ratones ebo/ebo, jun-d-/-, Cx43 +), [89]. Además, en trabajos iniciales se sugirió que los pacientes hipospérmicos o aspérmicos presentan menores enlaces gap en los testículos [90]. Estos datos apoyan la sugerencia de que un menor acoplamiento célula a célula en los testículos puede conducir a infertilidad masculina y, por tanto, es un objetivo adicional de la invención proporcionar una sustancia que incremente el acoplamiento célula a célula y, de este modo, puede ser útil terapéuticamente en el tratamiento de la infertilidad masculina asociada con una acoplamiento célula a célula deteriorado.

Función de los enlaces gap en el páncreas

[0241] Los canales de enlaces gap fabricados de Cx43 se acoplan funcionalmente a células sensibles a la glucosa de islotes pancreáticos y de una línea celular de insulinoma de rata [91]. En cambio, las células de varias líneas celulares que secretan insulina de manera anormal no expresan Cx43, presentan pocos enlaces gap, y están poco acopladas. Después de la corrección de estos defectos mediante la transfección estable de ADNc de Cx43, las células que expresan niveles moderados de Cx43 y acoplamiento, tal como se observa en células beta nativas, muestran una expresión del gen de la insulina y un contenido de insulina que es marcadamente elevado, en comparación con los observados en células de tipo salvaje (no acopladas) y en células transfectadas que sobreexpresan Cx43. Estos hallazgos indican que se requiere el acoplamiento adecuado de Cx43 para una producción y almacenamiento correctos de insulina [91]. Además, la estimulación in vivo de la liberación de insulina por glibenclamida está asociada con un aumento de la expresión de Cx43 y un aumento del acoplamiento célula a célula entre células β vecinas en el islote pancreático [9].

[0242] Para examinar el efecto del compuesto 2 y el compuesto 40 sobre la diabetes mellitus no insulino dependiente, se utilizan db/db de 6-16 semanas de vida. Los animales se enjaulan (3 ratones/jaula) bajo condiciones ambiente controladas (20°C, humedad del 55-75%) después de ciclos de luz/oscuridad de 12/12-h con la luz

encendida a las 6 am. Se encuentran con una dieta estándar Altromin No. 1324 con libre acceso a agua corriente. Todos los animales se aclimatan durante por lo menos una semana y se tratan durante dos días antes del primer test de tolerancia oral a la glucosa. Además, para reducir las oscilaciones de la glucosa inducida por estrés, los animales se someten a por lo menos un test de tolerancia oral a la glucosa sin compuesto tal como se describe a continuación antes del experimento.

[0243] Los péptidos se disuelven en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1 M con albúmina bovina al 0,1%, donde el pH se ajustó a 7,4 añadiendo NaOH 5M. Todas las soluciones se preparan nuevas en la mañana inmediatamente antes del experimento. Los compuestos se administran parenteralmente en dosis 10^{-10} - 10^{-6} mol/kg.

10 A los animales tratados con vehículo se les administra PBS con albúmina sola al 0,1%.

[0244] Los animales se pusieron en ayunas durante 17 horas antes del test de tolerancia a la glucosa. Empezando a las 9.00 am se extrae sangre de la punta de la cola ($t = -15$ min) y se mide la glucosa en sangre. La concentración global de glucosa en sangre (mM) se analiza mediante el método de glucosa oxidasa inmovilizada utilizando una gota de sangre (< 5 ml, Elite Autoanalyser, Bayer, Dinamarca). Se excluyen los animales con un nivel de glucosa en sangre severamente elevada en la mañana del experimento ($> 10,5$ mM). Inmediatamente después de la muestra inicial de sangre, los animales reciben una inyección i.p. de vehículo o diferentes dosis de compuesto. Quince minutos después de la administración i.p. de la sustancia, se administra p.o. o i.p. una dosis de glucosa 1 g/kg disuelta en agua (200 ml/50 g de peso corporal) y los animales se devuelven a sus jaulas ($t = 0$). Se miden los niveles de glucosa en sangre a $t=30$ min, $t=60$ min, $t=120$ min y $t=240$ min. Los animales se mantuvieron en ayunas durante el periodo de observación.

[0245] A efectos de analizar los efectos de los compuestos sobre la tolerancia a la glucosa, se calcula la diferencia absoluta y relativa en glucosa en sangre de la línea base ($t = 0$) para cada punto de tiempo después de la carga de glucosa. El área bajo la curva (AUC) para todo el experimento (AUC0-240 min) se determina utilizando el método del trapecioide. De este modo, se generan dos grupos de valores de AUC0-240 min, uno basado en los valores absolutos de glucosa en sangre (unidad: mM x min) y uno basado en los cambios relativos de la glucosa en sangre (unidad: % x min).

[0246] Estas observaciones indican un papel importante del acoplamiento de enlaces gap entre las células β del islote pancreático para la producción y liberación de insulina. De este modo, la presente invención proporciona una sustancia que aumenta la comunicación intercelular por enlaces gap y/o la conductancia eléctrica de enlaces gap y, así, mejora la tolerancia a la glucosa en sujetos con una diabetes mellitus no dependiente de insulina.

[0247] Además, Ito T, Ogoshi K, Nakano I, Ueda F, Sakai H, Kinjo M, Nawata H (Pancreas 1997 Oct 15:297-303) hallaron el efecto de la Irsogladina sobre los enlaces gap en pancreatitis aguda inducida por ceruleína en ratas. La capacidad para la comunicación intercelular (IC) a través de enlaces gap se halla en células acinares pancreáticas normales y se investigó el papel de la IC en la pancreatitis aguda inducida por ceruleína (Cn) en ratas utilizando irsogladina, un potenciador de la IC a través de enlaces gap. Se indujo pancreatitis edematosa aguda en ratas mediante dos inyecciones intraperitoneales de 40 microgramos/kg Cn. Las ratas recibieron oralmente varias dosis (25, 50 ó 100 mg/kg de peso corporal) de irsogladina, 15 y 2 h antes de la primera inyección con cn. El grupo de control normal recibió sólo el vehículo. La gravedad de la pancreatitis se evaluó enzimáticamente e histológicamente 5 h después de la primera inyección con Cn. En la pancreatitis aguda inducida por Cn, la irsogladina disminuyó significativamente el nivel de amilasa en suero, el peso pancreático en mojado, y la amilasa pancreática y el contenido de ADN, de una manera dependiente con la dosis. Particularmente, el contenido de amilasa mejoró hasta el nivel de los controles normales. Histológicamente, la gravedad de la pancreatitis se redujo significativamente mediante el tratamiento con irsogladina y no se observó una vacuolización distinguible en el grupo con un tratamiento con irsogladina de 100 mg/kg. Mediante la inmunofluorotinción de páncreas con anticuerpo anti-conexina 32 (Cx32; una proteína de enlace gap), se observó que los acinos pancreáticos se difundían positivamente para Cx32 en el grupo de control, pero el número de gránulos positivos en Cx32 disminuyó de forma destacada, hasta un 19%, en el grupo con pancreatitis. Con un tratamiento con irsogladina de 100 mg/kg, el número de gránulos de Cx32 se recuperaron hasta un 70% del valor de control normal. Estos hallazgos indican que la IC a través del enlace gap se ve dañada en la pancreatitis inducida por Cn, lo que puede dar lugar a la descomposición de la homeostasis tisular y la progresión de la pancreatitis aguda.

[0248] De este modo, los péptidos descritos aquí son útiles en el tratamiento de la pancreatitis. Para sustanciar esta afirmación, se pueden realizar experimentos en ratas utilizando el diseño experimental general de Ito T et al. 2001, anterior, con la administración del COMPUESTO 2 y el COMPUESTO 40 en concentraciones en el intervalo de 10^{-11} - 10^{-8} M a las ratas. Estos experimentos se esperan que muestren el efecto facilitador del COMPUESTO y el COMPUESTO 40 en el acoplamiento de enlaces gap y contrarresten el efecto de la ceruleína.

[0249] La administración de los péptidos será por vía intravenosa.

Efectos de los abridores de enlaces gap (péptidos antiarrítmicos) en la trombosis.

- 5 [0250] La actividad antitrombótica de dos péptidos estrechamente relacionados con las sustancias de la presente invención ha mostrado tener actividad antitrombótica. De este modo, Dikshit et al. [15] hallaron que los péptidos Gly-Pro-Prp-Gly-Ala-Gly y Gly-Pro-Gly-Gly-Ala-Gly evitaban el desarrollo de un embolismo pulmonar en ratones administrados con una dosis i.v. de colágeno y adrenalina. La patente. US 4.775.743 describe HP5, un péptido derivado de AAP que tiene la secuencia N-3-(4-hidroxifenil) proplonil-Pro-4Hyp-Gly-Ala-Gly-OH, y que es activo
10 contra la aglutinación de plaquetas. Los compuestos de la presente invención presentan una similitud sorprendente y es probable que presenten efectos similares sobre la trombosis. De este modo, las sustancias de la presente invención se pueden utilizar en la prevención de la trombosis.

Inmunología

- 15 [0251] Las interacciones célula a célula son cruciales para la maduración y activación de linfocitos. Un amplio rango de moléculas de membrana aseguran la adhesión intercelular y permiten la señalización célula-célula durante la migración celular y activación en el sistema inmunitario. Los linfocitos T, B y NK humanos circulantes expresan Cx43 y se ha demostrado que los enlaces gap activos entre las células utilizando métodos con colorantes tal como se ha descrito previamente. También se ha demostrado que la disminución en el acoplamiento intercelular por enlaces gap
20 disminuía de manera destacada la secreción de IgM, IgG e IgA indicando que la señalización intercelular a través de enlaces gap es un componente importante de los mecanismos que subyacen la cooperación metabólica en el sistema inmune (Oviedo-Orta E, Hoy T, Evans WH. (Immunology. 2000; 99: 578-90), Oviedo-Orta E, Gasque P, Evans WH. (FASEB. 2001; 15:768-774)).

- 25 [0252] En la inflamación subcrónica o crónica, es deseable un aumento local en la síntesis de inmunoglobulinas independientemente de la etiología. Durante la inflamación, el tejido es a menudo diferente del tejido sano normal y una tensión baja de oxígeno produce el desacoplamiento de la comunicación intercelular por enlaces gap (La importancia de oxígeno bajo para el desacoplamiento de GJIC se ha demostrado en varios sistemas celulares
30 diferentes sugiriendo que la tensión de oxígeno es un regulador universal de GJIC.

- [0253] En cultivos primarios de cardiomiocitos ventriculares de ratas neonatales, la privación de oxígeno y glucosa conduce a un descenso en la estimulación inducida por noradrenalina del recambio de fosfoinositol (PI) en aproximadamente un 50% del nivel en condiciones atmosféricas y nutricionales normales. Se ha observado que el
35 modificador de los enlaces gap, el COMPUESTO 2, normaliza la alteración de la estimulación inducida por noradrenalina del recambio de PI durante la privación de oxígeno y glucosa mediante un aumento del recambio de PI hasta aproximadamente un 90% del nivel normal. Además, se ha observado que el COMPUESTO 2 no altera el nivel de recambio de PI inducido por noradrenalina durante las condiciones atmosféricas y nutricionales normales (Meier, E y Beck, M M: ZS42-0123 enhances norepinephrine (NE) - induced phosphoinositol (PI) turnover in cultured
40 cardiomyocytes during metabolic stress. 2001 International Gap Junction Conference, Agosto 4-9, 2001, Hawaii, USA, resumen no. 132). Así mismo, en cultivos de osteoblastos humanos cultivados y en líneas de células osteoblásticas de osteosarcoma de rata, la hipoxia descendió la propagación de ondas de calcio intracelulares medida como la transferencia de colorantes después de inyección con Amarillo Lucifer. Este descenso se podía invertir completamente mediante el tratamiento con el COMPUESTO 2 (Teilmann, S C, Henriksen, Z, Meier, E,
45 Petersen, J S, Sørensen, O H y Jørgensen, N R: The gap junction opener ZS42-0123 enhances intercellular communication in osteoblastic cells. 2001 International Gap Junction Conference, Aug 4-9, 2001, Hawaii, USA, resumen no. 176).

- [0254] Debido al desacoplamiento celular durante la inflamación, un abridor de enlaces gap mejorará la síntesis de
50 inmunoglobulinas durante la inflamación.

- [0255] El test in vitro del efecto de los abridores de enlaces gap tras la síntesis de inmunoglobulinas se analizará en linfocitos T y B estimulados y no estimulados aislados de amígdalas humanas y purificadas tal como se describe por Oviedo-Orta E, Gasque P, Evans WH. (FASEB. 2001; 15:768-774)). Las inmunoglobulinas se medirán mediante
55 ELISA y los enlaces gap mediante análisis FACS. Los abridores de enlaces gap se analizarán en concentraciones de 10^{-10} a 10^{-7} M.

- [0256] Se realizarán pruebas farmacológicas in vivo en modelos inflamatorios experimentales en modelos no infecciosos e infecciosos. Las pruebas farmacológicas in vivo se pueden realizar experimentalmente en una serie de
60 modelos de animales:

1) inhibición edemas en pata trasera de rata inducida por carragenanos (volumen de pata), 2) atenuación del

reclutamiento celular inducido por carragenanos en una bolsa de aire en ratas (reclutamiento de leucocitos y volumen de exudado), 3) atenuación de la artritis inducida por la pared de células de estreptococos (SCW) en la articulación tibiotarsiana (hinchamiento del tobillo) y 4) atenuación de la progresión de artritis inducida por colágeno en ratas (signos clínicos e hinchamiento de las articulaciones).

5

[0257] Ye P, Chapple CC, Kumar RK, y Hunter N (J Pathol 192:58; 2000 Sep) han demostrado que se producía una reducción sorprendente en las conexinas 26 y 43 en el epitelio de recubrimiento de encías inflamadas apoyando el concepto de que la capacidad del epitelio de actuar como una barrera eficaz contra los productos microbianos en los tejidos se ve gravemente comprometida en la periodontitis. De este modo, el tratamiento de las encías inflamadas con un abridor de enlaces gap, por ejemplo, en combinación con un antibiótico, puede ser ventajoso en la recuperación de la GJIC y la curación del epitelio.

10

Neuropatía periférica y dolor neuropático

15 [0258] Se ha descrito que la neuropatía y dolor periférico tal como se observan en la diabetes, durante la diálisis, la cirrosis hepática y muchas otras patologías implican nervios somáticos y autonómicos. Los mecanismos exactos de la lesión de nervios periféricos en las diversas patologías aún son especulativos, aunque se han descrito la destrucción de nervios terminales, menor conductancia, desmielinación y aumento de la respuesta inflamatoria. Los elementos comunes para varias patologías en el protocolo experimental son que se observa un aumento de radicales libres, un aumento de óxido de nítrico, estrés con oxígeno y falta de atrapadores de radicales libres y se registra una reducción de comunicación de enlaces gap (Pitre DA, Seifert JL, Bauer JA (Neurosci Lett. 2001; 303: 67-71), Bolanos JP, Medina JM. (J Neurochem. 1996; 66: 2019-9), Low PA, Nickander, KK. (Diabetes. 1991; 40: 873-7), Levy D, Hoke A, Zochone DW. (Neurosci Lett. 1999; 260: 207-9), Bruzzone R, Ressayat C. J Eur Neurosci. 1997; 9: 1-6)).

20

25 [0259] Se realizarán estudios in vitro en cultivos de astrocitos o células Schwann de ratas y se analizarán los abridores de enlaces gap, tales como el compuesto 2 y el compuesto 40, en células estresadas con óxido nítrico tal como han descrito Bolanos JP, Medina JM. (J Neurochem. 1996; 66: 2019-9) utilizando nitroprusiato sódico como donante de óxido nítrico (Blasits S, Maune S, Santos-Sacchi J. (Phlugers Arch. 2000; 440: 710-12)). Las concentraciones de los compuestos estará en el intervalo de 10^{-10} y 10^{-7} M y la abertura de los enlaces gap dependiente de la dosis se medirá utilizando el análisis FACS.

30

[0260] La administración será parenteralmente.

35 Déficit auditivo

[0261] La pérdida del oído inducida por ruido, presbiacusia, conocida por estar asociada con la producción de radicales libres, está relacionada con la inhibición del acoplamiento de enlaces gap entre células Hensen y células Deiters de órgano de Corti en la cóclea (Todt I, Ngezahayo A, Ernst A, Kolb H-A. (J Membrane Biol. 2001;181: 107-114), Blasits S, Maune S, Santos-Sacchi J. (Phlugers Arch. 2000; 440: 710-12) Lagostena L, Ashmore JF, Kachar B. (J Physiol. 2001; 531: 693-707)). La comunicación por enlaces gap entre estas células cocleares de apoyo proporciona la homeostasis importante para las células sensoriales y, de este modo, una actividad neuronal normal de las células de pelos externos (Johnstone BM, Pantuzzi R, Syka J, Sykova E. (J Physiol 1989; 408: 77-92)). Esta comunicación se ve dañada durante el estrés oxidativo (Todt I, Ngezahayo A, Ernst A, Kolb H-A. (J Membrane Biol. 2001; 181: 107-114)). Se evitará la pérdida del oído adquirida o dependiente de la edad cuando se trate con un compuesto que puede mantener la comunicación por enlaces gap en las células de apoyo.

45

[0262] Se realizará las pruebas in vitro de abridores de enlaces gap en células Hensen de cobayas tal como se ha descrito por Todt I, Ngezahayo A, Ernst A, Kolb H-A. (J Membrane Biol. 2001; 181:107-114). Se investigarán el compuesto 2 o el compuesto 40 en el intervalo de concentraciones de 10^{-10} – 10^{-8} M y se estudiarán sus efectos en condiciones estresadas por oxígeno y estresadas mecánicamente. El compuestos antagonizará significativamente el desacoplamiento inducido de enlaces gap.

50

[0263] A las ratas que se les administró una infusión i.v. de compuesto 2 se sometieron a tests de emisiones otoacústicas por producto de dispersión (DPOAE). Se sometió el oído a dos tonos a la vez de onda sinusoidal cercanos en frecuencia (f1 y f2). El sonido emitido del oído interno consiste en productos de distorsión producidos por las células de pelos externos. El más fuerte de estos productos de distorsión se encuentra habitualmente a la frecuencia de 2f1-f2. Por ejemplo, si los tonos utilizados están a una frecuencia de 1000 Hz (f1) y 1200 Hz (f2), el producto de distorsión más fuerte estará a 2x1000 - 1200, ó 800 Hz. La intensidad relativa del producto de distorsión, en comparación con las dos ondas sinusoidales, se puede utilizar para valorar la integridad de las células

60

de los pelos externos. kHz.

[0264] El compuesto se administrará parenteralmente.

- 5 [0265] Los melanocitos en el área de células oscuras del órgano vestibular se comunican de manera importante a través de enlaces gap y pueden jugar un papel en el transporte de material entre la endolinfa y la perlinfa y también puede ser importante en el mantenimiento de la homeostasis del microambiente en el oído interno (Masuda M, Usami S-I, Yamazaki K, Takumi Y, Shinkawa H, Kurashima K. (Anat Rec. 2001; 262; 137-146)). El hidrops endolinfático está relacionado con varias condiciones clínicas caracterizadas por vértigo y un oído reducido. Una menor capacidad de comunicación por enlaces gap puede ser importante en la regulación del transporte transmembrana de varias sustancias originalmente secretadas o excretadas a través de tipos específicos de transportadores.

Anemia y trasplante de médula ósea dependiente de la edad

15

- [0266] La existencia de enlaces gap funcionales entre células progenitoras hematopoyéticas y células estromales del microambiente hematopoyético fue durante muchos años controvertido, pero algunos estudios han demostrado ahora la existencia de una comunicación por enlaces gap en humanos (Rosendaal M, Gregan A, Green C. Tissue Cell. 1991; 23: 457-470), Dürig J, Rosenthal C, Halfmeyer K, Wiemann M, Novotny J, Bingmann D, Dührsen U, Schirmacher K. (Brit J Haematol. 2000; 111: 416-25)). También se ha demostrado que la comunicación es bidireccional favoreciendo la hipótesis de que las células estromales controlan el comportamiento proliferativo de las células progenitoras hematopoyéticas, pero también su estado funcional puede estar regulado por células hematopoyéticas inmaduras (Gupta P, Blazar B, Gupta K, Verfaillie C. (Blood. 1998; 91: 3724-3733)).

- 25 [0267] Con la edad, la funcionalidad del tejido hematopoyético desciende y a menudo se observa anemia en las personas de edad avanzada.

- [0268] La capacidad reducida de tejido hematopoyético también se observa en tumores hematológicos y después del tratamiento con quimioterapia. El trasplante de médula ósea del donante se utiliza para prevenir la pancitopenia.

- [0269] Se estudiará el efecto de un compuesto que facilita la comunicación por enlaces gap en ratas pretratadas expuestas a ciclofosfamida de dosis elevada. En estos animales, la médula ósea ha detenido la producción de células hematopoyéticas maduras. El número de reticulocitos a diferentes intervalos de tiempo después de la ciclofosfamida será significativamente superior en los animales pretratados con el abridor de enlaces gap, compuesto 2, que utiliza dosis de aproximadamente 100 microlitros de compuesto 2 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M en comparación con animales no pretratados.

- [0270] La administración del fármaco será parenteralmente.

40

Hipofunción pituitaria e hipotalámica

- [0271] Las hormonas de la glándula pituitaria anterior muestran una variación circadiana en la secreción de minutos, horas, días y estaciones. La parte del sistema nervioso responsable de la mayor parte del ritmo circadiano se localiza en una pareja de estructuras en el hipotálamo conocidas como núcleo supraquiasmático. En este centro, este reloj biológico es intrínseco en las células individuales. Sin embargo, la actividad eléctrica coordinada está mediada por células vecinas a través de la comunicación de enlaces gap (Colwell CS. (J Neurobiol. 2000; 43: 379-88)). Debido también a que la pituitaria anterior carece de inervaciones directas, la comunicación célula a célula mediada por enlaces gap en el glándula debe ser indispensable para la coordinación célula a célula adecuada y la sincronización requerida para asegurar una secreción hormonal apropiada y programada (Vitale ML, Cardin J, Gilula NB, Carbajal ME, Pelletier R-M. (Biol Reporo. 2001; 64: 625-633)). Guerineau NC, Bonnefont X, Stoeckel L, Mollard P. (J Biol Chem. 1998; 273: 10389-95) concluyó que las células endocrinas espontáneamente activas son unidades individuales o están dispuestas en ensamblajes acoplados por enlaces gap sincronizados dispersos a través de la glándula pituitaria anterior. La sincronía entre las células espontáneamente excitables puede ayudar a conformar los patrones de la secreción basal. A partir de la glándula pituitaria anterior, se sintetizan la hormona del crecimiento, la prolactina, la hormona adrenocorticoide, la hormona tiroidea, y hormonas de gonadotropina bajo el control de hormonas estimulantes del hipotálamo. Por tanto, uno de los mecanismos es la disritmia de las glándulas endocrinas- pituitarias hipotalámicas complicadas en uno de los ejes está también relacionado con una comunicación reducida a través de enlaces gap. Las enfermedades son diabetes insípida, hipogonadismo hipogonadotropo, mixoedema, hipofunción adrenocorticoide y enanismo. El tratamiento con un abridor de enlaces

gap mejorará los síntomas.

[0272] Además, las neuronas en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo dependen de la comunicación óptima de enlaces gap. En el eje mencionado anteriormente, el abridor de enlaces gap con modo de acción en esta región también beneficiará a los pacientes con un ritmo circadiano alterado (Shinohara K, Funabashi T, Mitsishiba D, Kimura F. (Neurosci Lett. 2000; 286: 107-10).

Hipertensión renovascular y nefrotoxicidad

10 [0273] Los enlaces gap específicos de riñón y endoteliales están ampliamente distribuidos en el riñón hallándose en el glomérulo, túbulo y vasculatura, incluyendo capilares intraglomerulares y arteriolas yuxttaglomerulares (Haefliger J-A, Demetz S, Braissant O, Suter E. (Kidney Int. 2001; 60: 190-201)). En ese estudio, los autores demostraron la presencia de enlaces gap que conectan las células que secretan renina de la arteriola aferente. El papel del enlace gap podría contribuir a la detección y propagación de señales de transmisión sanguínea, tales como las provocadas por el aumento de la presión sanguínea. En el riñón, dichas señales necesitan ser convertidas en estímulos autocrinos, paracrinos y endocrinos por las células endoteliales de la arteriola aferente y transmitidas a las células secretoras de renina. La comunicación por enlaces gap juega así un papel importante en la formación del aparato yuxttaglomerular interconectado. Las rápidas transiciones de abertura a cierre de los canales de enlaces gap implican además una rápida respuesta a los cambios vasculares locales asegurando la continua retroalimentación requerida para adaptar la función glomerular y tubular, así como la secreción de renina a las necesidades fisiológicas. Las enfermedades caracterizadas por una comunicación renal por enlaces gap dañada se beneficiará del tratamiento con un abridor específico de enlaces gap administrado oralmente o parenteralmente. Los metales pasados son nefrotóxicos y provocan lesiones renales. Se ha demostrado que los metales tóxicos como el cadmio (Fukumoto M, Kujiraoka T, Hara M, Shibasaki T, Hosoya T, Yoshida M. (Life Sciences. 2001;69:247-54)), así como el mercurio (Yoshida M, Kujiraoka T, Hara M, Nakazawas H, Sumi Y. (Arch Toxicol. 1998; 72: 192-96)) en cultivos de células primarias de túbulo proximal de rata desacoplan los enlaces gap y ambos grupos sugieren que la disfunción renal está relacionada con la comunicación intercelular reducida.

[0274] El tratamiento de envenenamiento con metales pesados de un abridor de enlaces gap reducirá el daño en el tejido y evitará la progresiva devastación del tejido.

[0275] El test in vitro se realizará en cultivos celulares de células de túbulo y se investigará la prevención de los compuestos (compuesto 2 o compuesto 40 en una concentración de aproximadamente 10^{-10} – 10^{-7} M) del desacoplamiento de enlaces gap cuando se exponer a metales pesados. La comunicación por enlaces gap se analizará con el método de colorante de Lucifer descrito previamente.

[0276] Después de la administración sistémica de metales pesados a animales experimentales (ratas), se midió la función renal utilizando ^3H -insulina como marcador de depuración de la velocidad de filtración glomerular, tetraetilamonio marcado con ^{14}C como marcador de depuración para el flujo en plasma renal y litio como marcador para la función tubular proximal (Petersen JS, Schalmi M, Lam HR, Christensen S, J. Pharmacol. Esp. Ther. 1991, 258:1-7) antes y después de diferentes tiempos del tratamiento crónico con metales pesados. El tratamiento crónico con un abridor específico de enlaces gap, tales como el Compuesto 2, se iniciará cuando la función renal está comprometida y se observará después del tratamiento una mejora significativa de parámetros de la función renal (velocidad de filtración glomerular y presión sanguínea).

[0277] La administración del compuesto serán parenteralmente.

[0278] La inflamación no infecciosa, así como infecciones con diferentes microbios, induce cambios crónicos significativos no específicos en la función renal también caracterizada por una velocidad de filtración glomerular reducida, una excreción reducida de electrolitos y agua y cambios en la presión sanguínea. Algunos de estos síntomas se tratarán también con un abridor específico de enlaces gap y los síntomas disminuirán.

ESTABILIDAD

55 Estabilidad de los compuestos de la invención

[0279] Además, los compuestos de la presente invención se caracterizan por ser estables frente a la degradación enzimática, y/o ser estables frente a la degradación en plasma y/o tener una vida media in vivo mejorada. Se prefiere que los compuestos que incluyen compuestos antiarrítmicos de la presente invención sean estables frente a la degradación enzimática y/o estables en el plasma. Los diversos derivados y modificaciones químicas de la secuencia del péptido nativo de AAP presentada por la presente invención, por ejemplo, la amidación C-terminal o

las modificaciones N-terminales, representan modificaciones que se diseñan para aumentar la estabilidad manteniendo las propiedades antiarrítmicas y/o antitrombóticas de AAP nativo.

5 [0280] Los péptidos normalmente se degradan muy fácilmente mediante enzimas proteolíticas presentes en el sistema gastrointestinal y tejidos vivos y fluidos corporales. Por lo tanto, en la presente invención se prefieren utilizar péptidos que han sido modificados para transmitir una mayor estabilidad. Se prefiere que los compuestos que incluyen los compuestos antiarrítmicos de la presente invención sean estables frente a la degradación enzimática y/o estables en el plasma. Los péptidos preferidos para utilizar en el método de la presente invención presentan una vida media en solución medida en un ensayo de estabilidad estándar de más de 50 minutos y preferiblemente más de 4 horas. Como es evidente en las tablas 7 y 8 siguientes una serie de péptidos de la presente invención presentan una vida media de degradación de más de 5 horas en un ensayo de estabilidad estándar. La estabilidad es un parámetro importante para la eficacia del fármaco y se prefiere una vida media prolongada, tal como una T1/2 de más de 300 min, de los péptidos de la presente invención. Un ensayo de estabilidad estándar tal como se utiliza aquí se refiere al ensayo de estabilidad en plasma in vitro descrito a continuación.

15 **MÉTODO DE ANÁLISIS DE ESTABILIDAD EN PLASMA IN VITRO**

[0281] La estabilidad de los péptidos se analiza en suero y plasma. Los péptidos se incuban a 37°C en plasma o suero y las muestras tomadas en aproximadamente 9 intervalos regulares entre t=0 y t=156 min se analizan mediante HPLC.

[0282] Se estiman las condiciones apropiadas (columna, disolvente, gradiente y temperatura) para los análisis HPLC para asegurar que los picos del fármaco y del plasma no presentan el mismo tiempo de retención. Esto se realiza mediante inyecciones posteriores del fármaco, plasma y una coinyección con el fármaco y el plasma, seguido de la optimización de los parámetros del método de LC hasta obtener una separación satisfactoria. Se realizan tres experimentos en paralelo para cada tipo de plasma. Se mezclan 100 ml de péptido con 900 ml de plasma a t = 0 y se incuban a 37°C (mezcla de fármaco-plasma a concentración 0,1 mg/ml). Se extraen las muestras de 100 ml de la mezcla de fármaco-plasma en los intervalos apropiados y se detiene la degradación mediante la precipitación de la muestra con 10 ml de MeCN:TFA 50:50 v/v. También se toma de la misma manera una muestra de plasma de control sin el fármaco. Las muestras de plasma se centrifugan durante 15 min a 12.000 rpm (centrífuga Eppendorf) a temperatura ambiente. La solución sobrenadante resultante se transfiere a viales de automuestra HP de 300 ml y se analizan mediante HPLC. Las muestras se analizan en el siguiente orden: blanco, péptido a 0.1 mg/mL, plasma sin péptido, las tres muestras en paralelo para t = 0, las tres muestras en paralelo para t = 5 min., las tres muestras en paralelo para t = 10 min. etc. Finalmente, se repiten las tres muestras en paralelo para t = 0 para asegurarse que no ha habido degradación u otro fallo durante el análisis. Las concentraciones de las muestras (altura del pico en mAU) se representan frente al tiempo y se ajustan a una función que describa una caída monoexponencial (Excel). La vida media de degradación (T1/2) (min.) de varios compuestos de la invención en comparación con AAP10, AAP y HP5 en plasma humano se presentan en la siguiente Tabla 7 como promedio (n=3) ± desviación estándar, los compuestos 2, 3, 27, 48 y 49 son considerablemente más estables en plasma y suero que AAP10 que presenta una vida media inferior a 10 minutos y HP5 que tiene una vida media inferior a 12 minutos.

Tabla 7. Resultados del test de estabilidad in vitro en plasma y suero, T1/2 en min y h

MEDIO Y COMPUESTOS	PLASMA	HEPARINA		SUERO	
	RATA	CONEJO	HUMANO	CONEJO	HUMANO
AAP		4,4 min \pm 12%	7,6 min \pm 6%		
AAP10	8,2 min \pm 13%	9,5 min \pm 12%	-	2,7 min \pm 4%	-
HP5		3,7 min \pm 1%	11,9 min \pm 11%		
Ciclo(retro-AAP-10-Asn)	-	* BR > 5 h	-	-	* > 5 h
Ac-retro(AAP-10)-(todoD)-NH ₂	-	* > 5 h	* > 5 hrs	-	* > 5 h
CF ₃ C(O)-AAP10-NH ₂	-	3,8 h \pm 0,5%	-	-	3,1 h \pm 10%
Ciclo(GAG-Hyp-PYN)	-	30 h \pm 8%	9 h \pm 1%	-	-
Ciclo(GAG-Hyp-PYQ)	-	14 h \pm 2%	15 h \pm 1%	-	-
H-D-Y-D-N-G-NH ₂	-		296 min \pm 34%		

[0283] La siguiente Tabla 8 muestra la actividad de los compuestos en un modelo de arritmia inducida por cloruro de calcio y la vida media.

TABLA 8	CaCl ₂ ratones, in vivo %	CaCl ₂ ratones, Valoración	Vida media en plasma humano, min
HPP-5-OH	50 +/- 11	2	12
HPP-PHypGAGKKKKKK-OH	80 +/- 17	3	2
H-AAP-10-NH ₂ (H-GAG-4Hyp-PYNH ₂)	76 +/- 21	3	13
H-AAP-10-K6-OH	64 +/- 10	3	87*
Ciclo(retro-AAP-10-Asn)	59 +/- 9	2	>300
Ac-Retro(AAP-10)-(todo D)-NH ₂	65 +/- 7	3	>300
Ac-Retro(AAP-10)-OH	50 +/- 20	1	
CF ₃ C(O)-AAP10-NH ₂	48 +/- 13	3	240
HPP-PHypGAGKKKKKK-NH ₂	21 +/- 17	1	>300
[Pro ⁴]AAP10-NH ₂	62 +/- 9	3	5
AAP	35 +/- 7	2	8
H-[D-Hyp ⁴]AAP-10-NH ₂	28 +/- 10	1	
H-[D-Pro ⁴ ,Ala ⁵]AAP-10-NH ₂	29 +/- 12	1	
AAP-10-K6-NH ₂	33 +/- 17	2	
H-(Acm)GAGHypPYC(Acm)-NH ₂	23 +/- 10	1	
H-AAP-10-Asn-NH ₂	31 +/- 6	2	
Ciclo(GAGHypPYN)	57 +/- 8	2	780
Ciclo(GAGHypPYQ)	48 +/- 14	2	900
H-HypPYNGAG-NH ₂	34 +/- 10	2	
H-GAG-T4c-PY-NH ₂	32 +/- 6	2	
H-GA-Sar-Hyp-PY-NH ₂	46 +/- 11	2	
H-Sar-A-Sar-Hyp-PY-NH ₂	24 +/- 7	1	
H-GAG-Pc-PY-NH ₂	21 +/- 11	1	
H-GAGGPY-NH ₂	32 +/- 9	2	
H-GAG-DHypAY-NH ₂	29 +/- 9	1	
H-GAG-DHyp-DProY-NH ₂	49 +/- 6	2	
des-Hyp ⁴ -[Asn ⁵]AAP-10-NH ₂	53 +/- 15	2	7
AcGNY	46 +/- 9	2	2140
GNY	58 +/- 10	2	63
H-GANY-NH ₂	21 +/- 7	1	
H-DY-DN-G-NH ₂	25 +/- 9	1	296
H-YNG-NH ₂	34 +/- 9	2	
H-GGY-NH ₂	39 +/- 9	2	
H-G-DN-Y-NH ₂	37 +/- 10	2	
H-Y-DN-G-OH	39 +/- 9	2	
Ac-Y-DN-G-OH	44 +/- 10	2	
Ac-G-D-N-Y-NH ₂	19 +/- 8	1	
Ac-Y-D-N-G-NH ₂	17 +/- 8	1	
H-GK(DNP)Y-NH ₂	25 +/- 7	1	

*Vida media en plasma humano medido en plasma con EDTA, HPP se refiere al radical 3-(4-hidroxifenil)propionilo

Tabla 9	Análisis de la estabilidad en plasma in vitro de AAP10 y el compuesto 2 bajo condiciones estériles					
	El objetivo del estudio es estimar la vida media in vitro de los fármacos de prueba (péptidos) en plasma de diferentes especies					
	Los fármacos se incuban bajo condiciones estériles a 37°C en plasma de varias especies y se sigue la degradación de los fármacos. Las muestras se analizan mediante HPLC.					
	Fármaco	No. de lote	PM (g/mol)	Contenido de péptido	Disolvente	
		Bx. 24.53 B	575,63	83,47	MQW	
Secuencia:	H-GAG-4Hyp-PY-NH ₂ , H-AAP-10-NH ₂					
Media de prueba	Plasma de rata, heparina					
Grupos de estudio (n = 3/grupo)	Conc. en plasma	Conc. de péptido		Tiempo de análisis		
	90%	0,2 mM		t = 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 y 20 min		
Media de prueba	Plasma humano, heparina					
Grupos de estudio (n = 3/grupo)	Conc. en plasma	Conc. de péptido		Tiempo de análisis		
	90%	0,2 mM		t = 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 y 20 min		
	Fármaco	No. de lote	Pm (g/mol)	Contenido de péptido	Disolvente	
		Bx. 20.17B-2A	617,66	100%	MQW	
Secuencia:	Ac-D-Tyr-D-Pro-D-Hyp-Gly-D-Ala-Gly-NH ₂					
Media de prueba	Plasma de rata, heparina					
Grupos de estudio (n = 3/grupo)	Conc. en plasma	Conc. de péptido		Tiempo de análisis		
	90%	0,2 mM		t = 0, 390, 1370, 1865, 2800, 3240, 4242, 4702 y 10007 min		
Media de prueba	Plasma humano, heparina					
Grupos de estudio (n = 3/grupo)	Conc. en plasma	Conc. de péptido		Tiempo de análisis		
	90%	0,2 mM		t = 0, 390, 1368, 1863, 2798, 3238, 4240, 4700 y 10005 min		

Método análisis	<p>y Método:</p> <p>Se estiman las condiciones apropiadas (columna, disolvente, gradiente y temperatura) para los análisis HPLC para asegurar que el pico del fármaco y los picos del plasma no tengan el mismo tiempo de retención. Esto se realiza mediante inyecciones posteriores del fármaco, plasma y una coinyección con el fármaco y el plasma, seguido de la optimización de los parámetros del método de LC hasta obtener una separación satisfactoria.</p> <p>Se realizan tres experimentos en paralelo para cada tipo de plasma bajo condiciones estériles. Se mezclarán 100 µl de los péptidos de prueba (2 mM en MQW) con 900 µl de plasma a t = 0 y se incubarán a 37°C (mezcla de fármaco-plasma a concentración 0,2 mM). Se extraen muestras de 100 µl de la mezcla fármaco-plasma en los intervalos apropiados y la degradación se detiene mediante la precipitación de la muestra con 10 µl de MeCN:TFA 50:50 v/v. También se toma una muestra de plasma de control sin el fármaco tratado de la misma manera. Las muestras de plasma se centrifugan durante 15 min a 12.000 rpm (centrífuga Eppendorf) a temperatura ambiente. La solución de sobrenadante resultante se transfiere a 300 µl de viales de automuestras HP y se analiza mediante HPLC.</p> <p><i>El análisis HPLC se realiza de la siguiente manera:</i></p> <p>Detección: DAD1, 214,5 nm. Flujo: 0,200 ml/min. Volumen de inyección 10 µl. Temperatura 30°C.</p> <p>AAP10:</p> <p>Columna: Vydac 218MS52, # 000517, 250 mm x 2,1 mm. Disolventes; A: TFA al 0,1 % en MQW B. TFA al 0,1% en MQW: MeCN 10:90 Gradiente (tiempo, %B): 0;0 2;0 14;25 15;100 16;100 17;0 30;0 Fichero del método: TJE_63A.M Fichero de la secuencia: 010712T1 (HPLC 2)</p> <p>Compuesto 2</p> <p>Columna: Luna 3u, C18(2), No. 296440, 150 x 2 mm. Disolventes; A: HFBA al 0,02% en MQW B. HFBA al 0,02% en MQW: MeOH 10:90 Gradiente (tiempo, %B): 0;0 5;30 15;30 16;95 17;95 18;5 35;5 Fichero del método: TJE_123A.M Fichero de la secuencia: 010712T2 (HPLC 2)</p> <p>Las muestras se analizan en el siguiente orden: blanco, el fármaco a 0,2 mM, el plasma sin el fármaco, las tres muestras en paralelo para t = 0, las tres muestras en paralelo para t1, las tres muestras en paralelo para t2, etc. Finalmente, se repiten las tres muestras en paralelo para t = 0 para asegurar que no ha habido degradación u otros fallos durante el análisis.</p>
Cálculos estadística	<p>y Las concentraciones en plasma (altura del pico en mAU) se representarán frente al tiempo y se ajustarán a una función que describe un descenso monoexponencial (Excel). La vida media del fármaco de prueba en los diferentes tipos de plasma se presentará como media +/- desviación estándar</p>
Estabilidad en plasma H-AAP-10-NH₂	<p>3,8 min +/- 0,1 min (rata); 1,8 min +/- 1,0 min (humano); incubación 20 min</p>
Ac-Retro (AAP-10)-(todos D)-NH₂	<p>10,3 días +/- 1,2 días (rata); 14,1 días +/- 1,5 días (humano); incubación 7 días</p>

FORMULACIONES Y COMPOSICIONES

- [0284]** Las formulaciones que contienen un compuesto tal como se describe aquí para el tratamiento de las enfermedades y condiciones médicas mencionadas anteriormente pueden estar en cualquier forma adecuada que se pueda administrar por el personal médico o por el paciente según sea necesario. Ejemplos son formulaciones de inyección para administración i.v., formulaciones para administración oral, incluyendo comprimidos y cápsulas y supositorios. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar como un medicamento independiente o en un tratamiento de combinación con otros medicamentos adecuados para el tratamiento de la enfermedad particular. Los compuestos descritos aquí son péptidos de peso molecular relativamente bajo que pueden tener una biodisponibilidad oral relativamente baja, en cuyo caso se preferirán las formulaciones no orales, por ejemplo, formulaciones para la administración por inyección o para la administración a través del epitelio nasal o rectal o a través de la piel, por ejemplo, ayudado por iontoforesis.
- [0285]** En los métodos terapéuticos de la presente invención, se puede administrar un compuesto para el tratamiento a un sujeto en cualquiera de las diversas maneras incluyendo intracorporalmente o tópicamente.
- [0286]** Un compuesto para el tratamiento se puede administrar a un sujeto, ya sea solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos, como composición farmacéutica en mezcla con excipientes convencionales, es decir, sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para la aplicación parenteral, enteral o intranasal que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos activos y no son perjudiciales para el receptor de los mismos. Los portadores adecuados farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de petroetral, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. Las preparaciones farmacéuticas se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, sustancias aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares, que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos activos.
- [0287]** Dichas composiciones se pueden preparar para su uso en administración parenteral, particularmente en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para administración oral, particularmente en forma de comprimidos o cápsulas; intranasalmente, particularmente en forma de polvos, gotas nasales, o aerosoles; vaginalmente; tópicamente, por ejemplo, en forma de crema; rectalmente, por ejemplo, como supositorio; etc.
- [0288]** Los agentes farmacéuticos se pueden administrar de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos conocidos en el sector farmacéutico, por ejemplo, tal como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980). Las formulaciones para administración parenteral pueden contener como excipientes habituales, agua estéril o solución salina, polialquilenglicoles, tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados, y similares. En particular, polímeros de láctido, copolímero de láctido/glicólido o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno biodegradables y biocompatibles pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación de ciertos compuestos de la invención.
- [0289]** Otros sistemas de liberación parenteral potencialmente útiles incluyen partículas de copolímero etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas. Las formulaciones para la administración por inhalación contienen como excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato y desoxicolato, o soluciones oleosas para la administración en forma de gotas nasales, o como gel a aplicar intranasalmente. Las formulaciones para la administración parenteral también pueden incluir glicocolato para administración bucal, metoxisalicilato para administración rectal, o ácido cítrico para administración vaginal. Otros sistemas de liberación administrarán el agente o agentes terapéuticos directamente a un punto quirúrgico, por ejemplo, la administración mediante el uso de stents.
- [0290]** La concentración de uno o más compuestos de tratamiento en una composición terapéutica variarán dependiendo de una serie de factores, incluyendo la dosis del compuesto de la invención a administrar, las características químicas (por ejemplo, hidrofobicidad) de la composición utilizada, y el modo y ruta de administración pretendidos. Se pueden disponer uno o más compuestos de la invención en una solución de tampón fisiológico acuoso que contiene aproximadamente de un 0,1 a un 10% p/v de un compuesto para administración parenteral.
- [0291]** Se entenderá que las cantidades realmente preferidas de compuestos activos utilizados en una terapia determinada variarán según, por ejemplo, el compuesto específico a utilizar, la composición concreta formulada, el

modo de administración y las características del sujeto, por ejemplo, la especie, el sexo, el peso, la salud general y la edad del sujeto. Las tasas de administración óptimas para un protocolo determinado de administración se pueden determinar fácilmente por los expertos en la materia utilizando tests convencionales de de determinación de la dosis realizados con respecto a las directrices anteriores. Los intervalos de dosis adecuados pueden incluir desde 5 aproximadamente 1mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día.

10 [0292] Los compuestos terapéuticos de la presente invención se administran de manera adecuada en una forma protonada y soluble en agua, por ejemplo, como sal farmacéuticamente aceptable, habitualmente una sal de adición de ácido, tal como una sal de adición de un ácido inorgánico, por ejemplo, un clorhidrato, sulfato, o sal de fosfato, o como una sal de adición de ácido orgánico, tal como una sal de acetato, maleato, fumarato o citrato. Las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos terapéuticos de la presente invención también pueden incluir sales metálicas, particularmente sales de metales alcalinos, tales como una sal de sodio o una sal de potasio; sales de metales alcalinotérreos, tales como una sal de magnesio o calcio; sales de amonio, tales como una sal de amonio o tetrametilamonio; o una sal de adición de aminoácido, tal como una sal de lisina, glicina o fenilalanina.

15 Composiciones

20 [0293] La presente invención también se refiere a una composición que comprende un péptido antiarrítmico farmacológicamente activo tal como se define en la presente invención en combinación con un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Dichas combinaciones pueden estar en una forma adaptada a la administración oral, subcutánea, parenteral (intravenosa, intraperitoneal), intramuscular, rectal, epidural, intratraqueal, intranasal, dérmica, vaginal, bucal, ocular, directamente al cerebro o pulmonar, preferiblemente en una forma adaptada a la administración subcutánea, intravenosa u oral, y dichas composiciones se pueden preparar de una manera conocida por el experto en la materia, por ejemplo tal como se describe en general en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 y ediciones más recientes y en monográficos en la serie "Drugs and the Pharmaceutical Sciences", Marcel Dekker. Las composiciones pueden aparecer en formas convencionales, por ejemplo, soluciones y suspensiones para inyección, incluyendo concentrados de infusión i.v., cápsulas y comprimidos, preferiblemente en forma de formulaciones entéricas, por ejemplos, tal como se describen en US 5,350,741, para administración oral.

30 [0294] El portador o diluyente farmacéutico utilizado puede ser un portador sólido o líquido convencional. Los ejemplos de portadores sólidos son lactosa, terra alba, sacarosa, ciclodextrina, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico o éteres de alquilo inferior de celulosa. Ejemplos de portadores líquidos son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, fosfolípidos, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, polioxietileno y 35 agua.

[0295] De manera similar, el portador o diluyente pueden incluir cualquier material de liberación prolongada conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclados con una cera.

40 [0296] Si se utiliza una portador sólido para administraciones orales, la preparación se puede comprimir, colocar en una cápsula de gelatina dura en polvo o en forma de pélet o puede estar en forma de trocisco o pastilla. La cantidad de portador sólido variará ampliamente, pero normalmente será de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1 g.

45 [0297] Un comprimido habitual que se puede preparar mediante técnicas habituales de obtención de comprimidos puede contener: Núcleo: 100 mg de compuesto activo (como compuesto libre o una sal del mismo); 1,5 mg de dióxido de silicio coloidal (Aerosil); 70 mg de celulosa microcristalina. (Avicel); 7,5 mg de goma de celulosa modificada (Ac-Di-Sol); estearato de magnesio.

50 [0298] Recubrimiento: HPMC aprox. 9 mg; *Mywacett 9-40T aprox. 0,9 mg; *monoglicérido acilado utilizado como plastificante para el recubrimiento de la película.

[0299] Si se utiliza un portador líquido, la preparación puede estar en forma de un jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda o líquido estéril inyectable, tal como una suspensión o solución líquida acuosa o no acuosa.

55 [0300] La composición también puede estar en una forma adecuada para la inyección local o sistémica o infusión y, por tanto, se puede formular con agua estéril o una solución salina isotónica o una solución de glucosa. Las composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales que son bien conocidas en la técnica. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso o filtrarse bajo condiciones asépticas 60 y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con la solución acuosa estéril antes de la administración. La composición puede contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para

aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro de calcio, etc.

Formulación de péptidos para inyección intravenosa

- 5
- [0301]** Las formulaciones multi-dosis se pueden preparar como una solución de un compuesto de la presente invención en una solución salina isotónica estéril guardada en viales tapados y, si es necesario, se añade un conservante (por ejemplo, benzoatos). Las formulaciones a dosis fija se pueden preparar como una solución del compuesto en solución salina isotónica estéril, guardada en ampollas de vidrio, y si es necesario rellenas de gas
- 10 inerte. Cada dosis del compuesto se almacena en seco en ampollas o viales tapados, y si es necesario rellenos de un gas inerte. La formulación multi-dosis requiere el grado más elevado de estabilidad del compuesto. Cuando la estabilidad del compuesto es baja, se pueden utilizar formulaciones de dosis fija. El péptido también se puede formular como un concentrado para infusión i.v.
- 15 **[0302]** Para la administración nasal, la preparación puede contener un compuesto de la presente invención disuelto o suspendido en un portador líquido, en particular, un portador acuoso, para aplicación en aerosol. El vehículo portador puede contener aditivos tales como agentes solubilizadores, por ejemplo, propilenglicol, tensoactivos, tales como sales de ácidos biliares o éteres de alcoholes superiores de polioxietileno, potenciadores de la absorción tales como lecitina (fosfatidilcolina) o ciclodextrina, o conservantes tales como parabinas.
- 20 **[0303]** Además, el tamaño pequeño de los compuestos peptídicos de la presente invención puede ser una ventaja para la administración oral y nasal, ya que la absorción relativamente rápida a través de membranas de la mucosa en comparación con péptidos más grandes minimiza la degradación enzimática, especialmente el duodeno y el íleon.
- 25 **[0304]** La presente invención también se refiere a un péptido antiarrítmico o derivado de péptido o un análogo funcional del mismo farmacológicamente activos tal como se describen en la presente invención para su uso en terapia, y el uso del mismo tal como se ha definido aquí para la fabricación de una composición farmacéutica para su uso en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de arritmias y complicaciones trombóticas durante trastornos
- 30 cardiovasculares, tales como la enfermedad cardíaca isquémica aguda (por ejemplo, angina de pecho estable, angina de pecho inestable, infarto de miocardio agudo), insuficiencia cardíaca congestiva (por ejemplo, insuficiencia cardíaca sistólica, diastólica, hiperdinámica, hipodinámica o de la parte derecha o izquierda), enfermedades cardíacas congénitas, cor pulmonale, cardiomiopatías, miocarditis, enfermedad cardíaca hipertensa y durante la revascularización coronaria.
- 35 **[0305]** En realizaciones específicas, se puede utilizar un péptido antiarrítmico según la presente invención para tratar y/o prevenir arritmias brady (por ejemplo, debido a una enfermedad en el nódulo sinusal, nódulo AV, haz de His, o la rama derecha o izquierda del haz) y taquiarritmias asociadas con la reentrada (por ejemplo, complejos auriculares prematuros, complejos de unión AV, complejos ventriculares prematuros, fibrilación auricular, aleteo auricular,
- 40 taquicardia supraventricular paroximal, taquicardia por reentrada de nódulo sinusal, taquicardia por reentrada de nódulo AV, taquicardia ventricular no prolongada, ya sean solos o en combinación con otros compuestos antiarrítmicos, tales como agentes de la clase I (por ejemplo, lidocaína), agentes de la clase II (por ejemplo, metoprolol o propranolol), agentes de la clase III (por ejemplo, amiodarona o sotalol) o agentes de la clase IV (por ejemplo, verapamil).
- 45 **[0306]** En realizaciones específicas, un péptido antiarrítmico según la presente invención se puede utilizar para evitar sucesos trombóticos en pacientes con enfermedades en la pared de los vasos (por ejemplo, aterosclerosis), mayor producción de plaquetas (policitemia universal), y/o un flujo menor (enfermedad cardíaca, enfermedad vascular), ya sea solo o en combinación con inhibidores de GP IIb/IIIa (por ejemplo, c7E3 Fab; abciximab),
- 50 inhibidores de ciclooxigenasa (por ejemplo, aspirina), antagonistas de tromboxano A2, derivados de coumadina (por ejemplo, warfarina), o el péptido sintético, integrilina.
- [0307]** En realizaciones específicas, un péptido antiarrítmico según la presente invención se puede utilizar, debido al efecto en los canales intercelulares de enlaces gap, para tratar y/o prevenir la pérdida ósea y el incremento de la
- 55 curación de fracturas óseas [93]; tratar y/o prevenir una enfermedad en cartílagos y articulaciones poco vascularizados [94]; tratar y/o prevenir las cataratas [81]; tratar y/o prevenir la vascularización de la córnea en estados atóxicos con poca nutrición de la córnea y aumento de la curación de lesiones en la córnea [95]; tratar y/o prevenir el crecimiento y expansión de células cancerosas, tales como células cancerosas derivadas de líneas de células epiteliales [96]; tratar y/o prevenir la hipertensión mediante el incremento de la vasomoción [74]; evitar el
- 60 rechazo de implantes, tales como células y órganos, en un organismo.

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

[0308] A continuación se describe un procedimiento general preferido. Sin embargo, en WO 98/11125 se encuentran descripciones más detalladas de la síntesis de péptidos en fase sólida.

5

[0309] Aparato y estrategia sintética

[0310] Los péptidos se sintetizaron por lotes en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración utilizando 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) como grupo protector N- α -amino y grupos de protección habituales adecuados para las funciones de las cadenas laterales.

10

Disolventes

[0311] El disolvente DMF (*N,N*-dimetilformamida, Riedel de-Häen, Alemania) se purificó haciéndolo pasar a través de una columna rellena con una resina fuerte intercambiadora de cationes (ácido fuerte Lewatit S 100 MB/H, Bayer AG Leverkusen, Alemania) y se analizaron, antes de usar, las aminas libres mediante adición de 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (Dhbt-OH) que da lugar a un color amarillo (anión Dhbt-O⁻) si las aminas libres están presente. El disolvente DCM (diclorometano, grado analítico, Riedel de-Häen, Alemania) se usó directamente sin purificación. El acetonitrilo (grado HPLC, Lab-Scan, Dublín, Irlanda) se usó directamente sin purificación adicional.

20

Aminoácidos

[0312] Los aminoácidos protegidos con Fmoc se adquirieron de Advanced ChemTech (ACT) en formas adecuadamente protegidas en la cadena lateral. Aminoácidos protegidos de otra manera (Fmoc-Glu(OH)-OAlilo; Fmoc-Asp(OH)-OAlilo de NovaBiochem (Suiza), Fmoc-4-Hyp(OtBu)-OH; de Bachem (Suiza).

25

Reactivos de acoplamiento

[0313] El reactivo de acoplamiento diisopropilcarbodiimida (DIC) se adquirió de (Riedel de-Häen, Alemania), PyBop de Advanced ChemTech.

30

Enlazadores

[0314] El ácido (4-hidroximetilfenoxi)acético (HMPA), se adquirió de Novabiochem, Suiza; y se acopló a la resina como un éster de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) preformado generado mediante DIC.

35

Soportes sólidos

[0315] Los péptidos se sintetizaron según la estrategia Fmoc en resinas TentaGel S 0,22-0,31 mmol/g (TentaGel-SNH₂; TentaGel S-Ram, TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc; Rapp polymere, Alemania).

40

Catalizadores y otros reactivos

[0316] La diisopropiletilamina (DIEA) se adquirió de Aldrich, Alemania, y la etilendiamina de Fluka, la piperidina y la piridina de Riedel-de Häen, Frankfurt, Alemania. La 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP) se adquirió de Fluka, Suiza y se utilizó como catalizador en reacciones de acoplamiento que implican anhídridos simétricos. El etanditiol se adquirió de Riedel-de Häen, Frankfurt, Alemania. La 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (Dhbt-OH), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (HOAt) se obtuvieron de Fluka, Suiza.

45

50 Procedimientos de acoplamiento

[0317] El primer aminoácido se acopló como un anhídrido simétrico en DMF generado a partir del aminoácido N- α -protegido apropiado y DIC. Los siguientes aminoácidos se acoplaron como ésteres HOBt o HOAt generados in situ producidos a partir de aminoácidos N- α -protegidos apropiados y HOBt o HOAt mediante DIC en DMF. Las acilaciones se comprobaron mediante el test de ninhidrina realizado a 80 °C con el fin de evitar la desprotección de Fmoc durante el test [97].

55

Desprotección del grupo protector N- α -amino (Fmoc).

[0318] La desprotección del grupo Fmoc se realizó mediante tratamiento con piperidina al 20% en DMF (1 x 5 y 1 x 10 min.), seguido de lavado con DMF (5 x 15 ml, 5 min. cada uno) hasta que no se pudo detectar color amarillo

60

después de la adición de Dhbt-OH a DMF drenado.

Desprotección de alilo

- 5 **[0319]** Se añadió una solución de 3 eq. de Pd(PPh₃)₄ disuelta en 15-20 ml de CHCl₃, AcOH, NMM (37:2:1) a la resina del péptido. El tratamiento continuó durante tres horas a temperatura ambiente acompañado por el burbujeo de una corriente de N₂ a través de la mezcla.

Acoplamiento de ésteres de HOBt

- 10 **[0320]** Se disolvieron 3 eq. de aminoácido N-α-amino protegido en DMF junto con 3 eq. de HOBt y 3 eq. de DIC y a continuación se añadieron a la resina.

Anhídrido simétrico preformado

- 15 **[0321]** Se disolvieron 6 eq. de aminoácido N-α-amino protegido en DCM y se enfrió hasta 0°C. Se añadió DIC (3 eq.) y la reacción continuó durante 10 min. Se extrajo el disolvente al vacío y el resto se disolvió en DMF. La solución se añadió inmediatamente a la resina, seguido de 0,1 eq. de DMAP.

20 Ciclación del péptido en la resina

[0322] Se disolvieron 1,5 eq. de PyBop en DMF junto con 1,5 eq. de HOBt y se añadieron 3 eq. de NMM a la resina del péptido. La reacción continuó durante la noche.

25 Separación del péptido de la resina con ácido

- [0323]** Los péptidos se separaron de las resinas mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% (TFA, Riedel-de Hæen, Frankfurt, Alemania)-agua v/v o con TFA al 95% y etandiol al 5% v/v a temperatura ambiente durante 2 h. Las resinas filtradas se lavaron con TFA al 95%-agua y los filtrados y lavados se evaporaron a presión reducida. El residuo se lavó con éter y se liofilizó a partir de ácido acético-agua. El producto crudo liofilizado se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y se identificó mediante espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESMS).

Síntesis de péptidos por lotes en resina TentaGel (PEG-PS)

- 35 **[0324]** La resina TentaGel (1g, 0,22-0,31 mmol/g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración. La resina se hinchó en DMF (15 ml) y se trató con piperidina al 20% en DMF para asegurar la presencia de grupos amino no protonados en la resina. La resina se drenó y se lavó con DMF hasta que no se pudo detectar color amarillo después de la adición de Dhbt-OH al DMF drenado. Se acopló HMPA (3 eq.) como un éster de HOBt preformado tal como se ha descrito anteriormente y el acoplamiento continuó durante 24 horas. La resina se drenó y se lavó con DMF (5 x 5 ml, 5 min cada uno) y la acilación se comprobó mediante el test de ninhidrina. El primer aminoácido se acopló como un anhídrido asimétrico preformado tal como se ha descrito anteriormente. Los siguientes aminoácidos según la secuencia se acoplaron como ésteres de HOBt preformados protegidos con Fmoc (3 eq.) tal como se ha descrito anteriormente. Los acoplamientos continuaron durante 2 horas, a menos que se especifique lo contrario. La resina se drenó y se lavó con DMF (5 x 15 ml, 5 min cada uno) a efectos de eliminar el exceso de reactivo. Todas las acilaciones se comprobaron mediante el test de ninhidrina realizado a 80°C. Después de completar la síntesis, el péptido-resina se lavó con DMF (3 x 15 ml, 5 min cada uno), DCM (3 x 15 ml, 1 min cada uno) y finalmente dietil éter (3x15 ml, 1 min cada uno) y se secó al vacío.

50 Condiciones HPLC

- [0325]** El análisis por HPLC en gradiente se realizó utilizando un sistema Hewlett Packard HP 1100 HPLC que consistía en una Bomba Cuaternaria HP 1100, un Automuestreador HP 1100, un Termostato de Columna HP 1100 y un Detector de múltiples longitudes de onda HP 1100. Se utilizó la Hewlett Packard Chemstation para software LC (rev. A.06.01) para el control del instrumento y la obtención de datos.

[0326] Se utilizaron las siguientes columnas y sistemas tampón de HPLC:

Columna

Kromasil, Phenomenex 00F-3033-E0, 329889 (nueva); 5 µm C-18, 100Å 150 x 4,6 mm; Lote nr. 5243-10.

- 60 Sistema tampón: A: TFA al 0,1% en MQV; B: 0,085% TFA, 10% MQV, 90% MeCN.

Gradiente:

- 1-1,5 min. 25% B
 1,5-13,5 min 25-50% B
 13,5-14,5 min 50-100% B
 14,5-15,5 min 100% B
 5 15,5-17,5 min 100 - 25% B
 17,5-20 min 25% B
 Flujo 1,5 ml/min
 Temperatura del horno 40°C
 Detección UV: $\lambda = 215 \text{ nm}$
 10 Espectro de masas obtenido en un instrumento Micro-mass LCT.

- [0327] Volviendo a la presente invención, es aplicable en general para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con una comunicación intercelular disminuida o dañada. La comunicación intercelular por enlaces gap (GJIC) es vital para el funcionamiento normal de células y tejidos mamíferos, y el cierre o "gating" de los
 15 enlaces gap se correlaciona a menudo con estados patológicos. En la literatura se han descrito varios ejemplos de comunicación intercelular por enlaces gap asociada con estados patológicos. Aunque las sustancias que bloquean los enlaces gap son conocidas, las descripciones sobre el uso de compuestos que facilitan o median la comunicación por enlaces gap o aumentan la GJIC en el tratamiento de enfermedades no proliferativas se limitan al uso del compuesto irsogladina (6-(2,5-diclorofenil)-2,4-diamino-1,3,5-triazina) que se ha descrito que activa la
 20 comunicación intercelular por enlaces gap a través del receptor muscarínico de acetilcolina M1, donde se ha inhibido la GJIC, pero la irsogladina 10^{-10} a 10^{-6} sola no afectaba a GJIC (Ueda, F. et al. J Pharmacol Exp Ther 1995 Aug;274(2):815-9).

Síntesis peptídica de péptidos individuales

- 25 Ejemplo de síntesis 1. Síntesis peptídica de Ac-Tyr-Pro-4Hyp-Gly-Ala-Gly-OH (Compuesto 1) en TentaGel-S-NH₂; Rapp polymere, Alemania.
- [0328] Primer lote: Se colocó TentaGel-S-NH₂ seco (0,27 mmol/g, 1 g) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración y se trató tal como se ha descrito en "síntesis de péptidos por lotes en resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la tirosina N-terminal. Todos los acoplamientos continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc el grupo amino N-terminal se acetiló con anhídrido de ácido acético (1 ml, 10,5 mmol) junto con 100 μl de piridina disueltos en 2 ml de DMF. El acoplamiento continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron mediante el test de ninhidrina realizado a 80 °C tal como se ha
 30 descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido-resina se lavó con DMF (3 x 15 ml, 1 min cada uno), DCM (3 x 15 ml, 1 min cada uno), dietil éter (3 x 15 ml, 1 min cada uno) y se secó al vacío.
- [0329] El péptido se separó de la resina tal como se ha descrito anteriormente y se liofilizó del ácido acético. El producto crudo liofilizado se analizó mediante HPLC y se observó que la pureza era mayor que el 70% and la identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH^+ hallado 619,24, MH^+ calculado 619,26). El rendimiento del material crudo fue de 137,7 mg. Después de la purificación utilizando HPLC preparativo tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 58 mg de producto peptídico con una pureza mayor que 95 %. El rendimiento total del producto peptídico purificado fue de 35%.
 40
- [0330] Segundo lote: Se colocó TentaGel-S-NH₂ seco (0,27 mmol/g, 1 g) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración y se trató tal como se ha descrito en "síntesis de péptidos por lotes en resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la tirosina N-terminal. Todos los acoplamientos continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló con anhídrido de ácido acético (1 ml, 10,5 mmol) junto con 100 μl de piridina disueltos en 2 ml de DMF. El acoplamiento continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron mediante el test de ninhidrina realizado a 80 °C tal como se ha
 50 descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido-resina se lavó con DMF (3 x 15 ml, 1 min cada uno), DCM (3 x 15 ml, 1 min cada uno), dietil éter (3 x 15 ml, 1 min cada uno) y se secó al vacío.
- [0331] El péptido se separó de la resina tal como se ha descrito anteriormente y se liofilizó del ácido acético. El producto crudo liofilizado se analizó mediante HPLC y se observó que la pureza era mayor que el 70% y la identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH^+ hallado 619 25, MH^+ calculado 619,26). El rendimiento del material crudo es de 137,3 mg. Después de la purificación utilizando HPLC preparativo tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 27,9 mg de producto peptídico con una pureza mayor que 91 %. El rendimiento total del producto peptídico purificado fue de 15,5%.
 55

Ejemplo de síntesis 2. Síntesis peptídica de Ac-D-Tyr-D-Pro-D-4Hyp-Gly-D-Ala-Gly-NH₂ (Compuesto 2) en TentaGel-S-Ram; Rapp polymere, Alemania

5 [0332] Primer lote: Se colocó TentaGel-S-Ram (0,23 mmol/g, 1 g) seco en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración y se trató tal como se ha descrito en "síntesis de péptidos por lotes en resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la D-tirosina N-terminal. Todos los acoplamientos continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló con anhídrido de ácido acético (1 ml, 10,5 mmol) junto con 100 µl de piridina disueltos en 2 ml de DMF. El acoplamiento continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron mediante el test de ninhidrina realizado a 80 °C tal como se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido-resina se lavó con DMF (3 x 15 ml, 1 min cada uno), DCM (3 x 15 ml, 1 min cada uno), dietil éter (3 x 15 ml, 1 min cada uno) y se secó al vacío.

15 [0333] El péptido se separó de la resina tal como se ha descrito anteriormente de forma liofilizada del ácido acético. El rendimiento de producto crudo liofilizado fue de 119,7 mg. La identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH⁺ hallado 618,25, MH⁺ calculado 618,28). Después de la purificación utilizando HPLC preparativo tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 42 mg de producto peptídico con una pureza mayor que 95 %. El rendimiento total del producto peptídico purificado fue de 30%.

20 [0334] Segundo lote: Se colocó TentaGel-S-Ram (0,23 mmol/g, 1 g) seco en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración y se trató tal como se ha descrito en "síntesis de péptidos por lotes en resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la D-tirosina N-terminal. Todos los acoplamientos continuaron durante la noche. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló con anhídrido de ácido acético (1 ml, 10,5 mmol) junto con 100 µl de piridina disueltos en 2 ml de DMF. El acoplamiento continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron mediante el test de ninhidrina realizado a 80 °C tal como se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido-resina se lavó con DMF (3 x 15 ml, 1 min cada uno), DCM (3 x 15 ml, 1 min cada uno), dietil éter (3 x 15 ml, 1 min cada uno) y se secó al vacío.

30 [0335] El péptido se separó de la resina tal como se ha descrito anteriormente y se liofilizó del ácido acético. El rendimiento de producto crudo liofilizado fue de 119,7 mg. La identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH⁺ hallado 618,29, MH⁺ calculado 618,28). Después de la purificación utilizando HPLC preparativo tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 100 mg de producto peptídico con una pureza mayor que 99 %. El rendimiento total del producto peptídico purificado fue de 71%.

35 **Ejemplo 3:** Síntesis en fase sólida de Ac-Asn-Tyr-NH₂ (Compuesto 56), Ac-Gly-Tyr-NH₂ (Compuesto 57), Hidroxiacetil-Asn-Tyr-NH₂ (Compuesto 58).

[0336] En la solicitud PCT WO 01/98324 titulada Conjugados de péptidos nuevos de Larsen, B.D et al se describen métodos generales de síntesis en fase sólida.

40 [0337] Síntesis peptídica de Ac-Asn-Tyr-NH₂ (Compuesto 56) en TentaGel-S-Ram; Rapp polymere, Alemania.

45 [0338] Se colocó TentaGel-S-Ram (0,23 mmol/g, 1 g) seco en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración y se trató tal como se ha descrito en "síntesis de péptidos por lotes en resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la asparagina N-terminal. Después de la desprotección del grupo Fmoc el grupo amino N-terminal se acetiló con anhídrido de ácido acético (1 ml, 10,5 mmol) junto con 100 µl de piridina disueltos en 2 ml de DMF. El acoplamiento continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron mediante el test de ninhidrina realizado a 80°C tal como se ha descrito anteriormente. Después de la acilación del grupo amino N-terminal, el péptido-resina se lavó con DMF (3 x 15 ml, 1 min cada uno), DCM (3 x 15 ml, 1 min cada uno), dietil éter (3 x 15 ml, 1 min cada uno) y se secó al vacío.

50 [0339] El péptido se separó de la resina tal como se ha descrito anteriormente y se liofilizó del ácido acético.

[0340] Síntesis peptídica de Ac-Gly-Tyr-NH₂ (Compuesto 57) en TentaGel-S-Ram; Rapp polymere, Alemania.

55 [0341] Se colocó TentaGel-S-Ram (0,23 mmol/g, 1 g) seco en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración y se trató tal como se ha descrito en "síntesis de péptidos por lotes en resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la glicina N-terminal. Después de la desprotección del grupo Fmoc el grupo amino N-terminal se acetiló con anhídrido de ácido acético (1 ml, 10,5 mmol) junto con 100 µl de piridina disueltos en 2 ml de DMF. El acoplamiento continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron mediante el test de ninhidrina realizado a 80°C tal como se ha descrito anteriormente. Después de la acilación del grupo amino

60

N-terminal, el péptido-resina se lavó con DMF (3 x 15 ml, 1 min cada uno), DCM (3 x 15 ml, 1 min cada uno), dietil éter (3 x 15 ml, 1 min cada uno) y se secó al vacío.

[0342] El péptido se separó de la resina tal como se ha descrito anteriormente y se liofilizó del ácido acético.

5

[0343] Síntesis peptídica de Hidroxiacetil-Asn-Tyr-NH₂ (Compuesto 58) en TentaGel-S-Ram; Rapp polymere, Alemania.

[0344] Se colocó TentaGel-S-Ram (0,23 mmol/g, 1 g) seco en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración y se trató tal como se ha descrito en "síntesis de péptidos por lotes en resina TentaGel" hasta finalizar el acoplamiento de la asparagina N-terminal. Después de la desprotección del grupo Fmoc, el grupo amino N-terminal se acetiló con ácido hidroxiaacético utilizando el procedimiento de acoplamiento estándar descrito anteriormente. El acoplamiento continuó durante la noche. Las acilaciones se comprobaron mediante el test de ninhidrina realizado a 80°C tal como se ha descrito anteriormente. Después de la acilación del grupo amino N-terminal, el péptido-resina se lavó con DMF (3 x 15 ml, 1 min cada uno), DCM (3 x 15 ml, 1 min cada uno), dietil éter (3 x 15 ml, 1 min cada uno) y se secó al vacío.

[0345] El péptido se separó de la resina tal como se ha descrito anteriormente y se liofilizó del ácido acético.

20 Lista de referencias

[0346]

- [1.] A. L. Waldo, A. J. Camm, H. deRuyter, P. L. Friedman, D. J. MacNeil, J. F. Pauls, B. Pitt, C. M. Pratt, P. J. Schwartz, E. P. Veltri, *Lancet* 1996, 348 7-12.
- [2.] P. A. Guerrero, R. B. Schuessler, L. M. Davis, E. C. Beyer, C. M. Johnson, K. A. Yamada, J. E. Saffitz, *J Clin Invest* 1997, 99 1991-1998.
- [3.] D. L. Lerner, K. A. Yamada, R. B. Schuessler, J. E. Saffitz, *Circulation* 2000, 101 547-552.
- [4.] A. Hagendorff, B. Schumacher, S. Kirchhoff, B. Luderitz, K. Willecke, *Circulation* 1999, 99 1508-1515.
- [5.] S. Kirchhoff, E. Nelles, A. Hagendorff, O. Kruger, O. Traub, K. Willecke, *Curr Biol* 1998, 8 299-302.
- [6.] A. M. Simon, D. A. Goodenough, D. L. Paul, *Curr Biol* 1998, 8 295-298.
- [7.] A. C. de Carvalho, M. O. Masuda, H. B. Tanowitz, M. Wittner, R. C. Goldenberg, D. C. Spray, *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994, 5 686-698.
- [8.] R. R. Kaprielian, M. Gunning, E. Dupont, M. N. Sheppard, S. M. Rothery, R. Underwood, D. J. Pennell, K. Fox, J. Pepper, P. A. Poole-Wilson, N. J. Severs, *Circulation* 1998, 97 651-660.
- [9.] N. S. Peters, C. R. Green, P. A. Poole-Wilson, N. J. Severs, *Circulation* 1993, 88 864-875.
- [10.] J. E. Saffitz, R. B. Schuessler, K. A. Yamada, *Cardiovasc Res* 1999, 42 309-317.
- [11.] S. Aonuma, Y. Kohama, K. Akai, Y. Komiyama, S. Nakajima, M. Wakabayashi, T. Makino, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1980, 28 3332-3339.
- [12.] S. Aonuma, Y. Kohama, K. Akai, S. Iwasaki, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1980, 28 3340-3346.
- [13.] S. Aonuma, Y. Kohama, T. Makino, Y. Fujisawa, *J Pharmacobiodyn* 1982, 5 40-48.
- [14.] M. A. Ronsberg, T. K. Saunders, P. S. Chan, P. Cervoni, *Med Sci* 86 A.D., 14 350-351.
- [15.] M. Dikshit, R. Srivastava, B. Kundu, K. B. Mathur, K. Kar, *Indian J Exp Biol* 1988, 26 874-876.
- [16.] Y. Kohama, N. Okimoto, T. Mimura, C. Fukaya, M. Watanabe, K. Yokoyama, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1987, 35 3928-3930.
- [17.] Y. Kohama, S. Kuwahara, K. Yamamoto, M. Okabe, T. Mimura, C. Fukaya, M. Watanabe, K. Yokoyama, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1988, 36 4597-4599.
- [18.] S. Dhein, N. Manicone, A. Muller, R. Gerwin, U. Ziskoven, A. Irankhahi, C. Minke, W. Klaus, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994, 350 174-184.
- [19.] T. Argentieri, E. Cantor, J. R. Wiggins, *Experientia* 1989, 45 737-738.
- [20.] A. Muller, M. Gottwald, T. Tudyka, W. Linke, W. Klaus, S. Dhein, *Eur J Pharmacol* 1997, 327 65-72.
- [21.] R. Grover, S. Dhein, *Peptides* 1998, 19 1725-1729.
- [22.] S. Dhein, T. Tudyka, *Drugs* 1995, 49 851-855.
- [23.] C. S. Kuo, K. Munakata, C. P. Reddy, B. Surawicz, *Circulation* 1983, 67 1356-1367.
- [24.] S. Dhein, K. Krusemann, T. Schaefer, *Br J Pharmacol* 1999, 128 1375-1384.
- [25.] N. S. Peters, J. Coromilas, N. J. Severs, A. L. Wit, *Circulation* 1997, 95 988-996.
- [26.] D. W. Liu, C. Antzelevitch, *Circ Res* 1995, 76 351-365.
- [27.] Kanagaratnam, P., Severs, N. J., and Peters, N. S. The Relationship between Conduction, Activation pattern and Quantity of Immunoreactive Connexin in Chronic Human Auricular Fibrillation. *Circulation* 102[18], II-485. 2000. Ref Type: Abstract
- [28.] J. M. Pastore, D. S. Rosenbaum, *Circulation Research* 2000, 87 1157-1163.
- [29.] R. D. Berger, *Circulation Research* 2000, 87 1083-1084.
- [30.] J. E. Saffitz, K. A. Yamada, *Circulation* 1998, 97 630-632.

- [31.] Gutstein, D. E., Morley, G. E., Tamaddon, Houman S., Vaidya, D., Schneider, M. D., Chen, J., Chien, K. R., Stuhmann, H., and Fishman, G. I. Genetic Manipulation of Connexin43 Expression in the Heart: Establishing a Role for Gap Junction Remodeling in Arrhythmogenesis and Ventricular Dysfunction. *Circulation* 102[18], II-15. 2001. Ref Type: Abstract
- 5 [32.] A. Muller, T. Schaefer, W. Linke, T. Tudyka, M. Gottwald, W. Klaus, S. Dhein, Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 1997, 356 76-82.
- [33.] S. Dhein, R. Grover, A. Müller, M. Lauen, P. Poeppel, T. Schaefer, *Circulation* 1999, 100 I-426.
- [34.] Koenig, J. I. Radioligand binding in intact cells. Keen, M. [106], 89-98. 1999. Totowa, NJ, Humana Press Inc. Methods in Molecular Biology. Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- 10 [35.] K. Wassermann, K. Mølgaard, E. Steiness, *Cancer Chemother.Pharmacol.* 1985, 15 244-252.
- [36.] E. Meier, K. Frederiksen, M. Nielsen, H. L. Lembøl, H. Pedersen, J. Hyttel, *Drug Development Research* 1997, 40 1-16.
- [37.] J. J. Lynch, R. G. Rahwan, D. T. Witiak, *J Cardiovasc.Pharmacol.* 1981, 3 49-60.
- [38.] M. Zabel, S. H. Hohnloser, S. Behrens, R. L. Woosley, M. R. Franz, *J Cardiovasc Electrophysiol* 1997, 8 1239-1245.
- 15 [39.] S. Dhein, N. Manicone, A. Muller, R. Gerwin, U. Ziskoven, A. Irankhahl, C. Minke, W. Klaus, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1994, 350 174-184.
- [40.] X. D. Huang, G. E. Sandusky, D. P. Zipes, *J Cardiovasc.Electrophysiol.* 1999, 10 79-91.
- [41.] D. Xing, J. B. Martins, *Am J Physiol Heart Circ.Physiol* 2001, 280 H684-H692.
- 20 [42.] F. Shapiro, *Calcif Tissue Int* 1997, 61 285-293.
- [43.] R. Civitelli, E. C. Beyer, P. M. Warlow, A. J. Robertson, S. T. Geist, T. H. Steinberg, *J.Clin.Invest.* 1993, 91 1888-1896.
- [44.] T. H. Steinberg, R. Civitelli, S. T. Geist, A. J. Robertson, E. Hick, R. D. Veenstra, H. Z. Wang, P. M. Warlow, E. M. Westphale, J. G. Laing, a. et, *EMBO J.* 1994, 13 744-750.
- 25 [45.] H. Chiba, N. Sawada, M. Oyamada, T. Kojima, S. Nomura, S. Ishii, M. Mori, *Cell Struct.Funct.* 1993, 18 419-426.
- [46.] F. Lecanda, D. A. Towler, K. Ziambaras, S. L. Cheng, M. Koval, T. H. Steinberg, R. Civitelli, *Mol Biol Cell* 1998, 9 2249-2258.
- [47.] F. Lecanda, P. M. Warlow, S. Sheikh, F. Furlan, T. H. Steinberg, R. Civitelli, *J.Cell Biol.* 2000, 151 931-943.
- 30 [48.] N. R. Jorgensen, S. T. Geist, R. Civitelli, T. H. Steinberg, *J.Cell Biol.* 1997, 139 497-506.
- [49.] N. R. Jorgensen, Z. Henriksen, C. Brot, E. F. Eriksen, O. H. Sorensen, R. Civitelli, T. H. Steinberg, *J Bone Miner.Res.* 2000, 15 1024-1032.
- [50.] A. Clairmont, D. Tessman, A. Stock, S. Nicolai, W. Stahl, H. Sies, *Carcinogenesis* 1996, 17 1389-1391.
- [51.] M. A. Van der Molen, C. T: Rubin, K. J. McLeod, L. K. McCauley, H. J. Donahue, *J.Biol.Chem.* 1996, 271 12165-12171.
- 35 [52.] R. Civitelli, K. Ziambaras, P. M. Warlow, F. Lecanda, T. Nelson, J. Harley, N. Atal, E. C. Beyer, T. H. Steinberg, *J.Cell Biochem.* 1998, 68 8-21.
- [53.] P. D'Andrea, A. Calabrese, I. Capozzi, M. Grandolfo, R. Tonon, F. Vittur, *Biorheology* 2000, 37 75-83.
- [54.] P. D'Andrea, F. Vittur, *Cell Calcium* 1996, 20 389-397.
- 40 [55.] S. Loty, C. Foll, N. Forest, J. Sautier, *Arch.Oral Biol.* 2000, 45 843-856.
- [56.] N. Cirenèl, B. M. Colombo, M. Mesnil, S. Benedetti, H. Yamasaki, G. Finocchiaro, *Gene Ther.* 1998, 5 1221-1226.
- [57.] O. Moennikes, A. Buchmann, K. Willecke, O. Traub, M. Schwarz, *Hepatology* 2000, 32 501-506.
- [58.] O. Moennikes, A. Buchmann, A. Romualdi, T. Ott, J. Werringloer, K. Willecke, M. Schwarz, *Cancer Res.* 2000, 60 5087-5091.
- 45 [59.] L. Zhou, E. M. Kasperek, B. J. Nicholson, *J Cell Biol.* 1999, 144 1033-1045.
- [60.] D. W. Laird, P. Fistouris, G. Batist, L. Alpert, H. T. Huynh, G. D. Carystinos, M. A. Alaoui-Jamali, *Cancer Res.* 1999, 59 4104-4110.
- [61.] T. Shibata, H. Nagayasu, J. Hamada, S. Konaka, M. Hosokawa, T. Kawano, H. Kitajo, M. Arisue, *Tumour.Biol.* 2000, 21 299-308.
- 50 [62.] X. Guan, R. J. Ruch, *Carcinogenesis* 1996, 17 1791-1798.
- [63.] R. J. Ruch, W. J. Bonney, K. Sigler, X. Guan, D. Matesic, L. D. Schafer, E. Dupont, J. E. Trosko, *Carcinogenesis* 1994, 15 301-306.
- [64.] B. V. Madhukar, H. L. Feijter-Rupp, J. E. Trosko, *Cancer Lett.* 1996, 106 117-123.
- 55 [65.] W. K. Hong, M. B. Sporn, *Science* 1997, 278 1073-1077.
- [66.] K. M. Abdullah, G. Luthra, J. J. Bilski, S. A. Abdullah, L. P. Reynolds, D. A. Redmer, A. T. Grazul-Biliska, *Endocrine.* 1999, 10 35-41.
- [67.] M. Saitoh, M. Oyamada, Y. Oyamada, T. Kaku, M. Mori, *Carcinogenesis* 1997, 18 1319-1328.
- [68.] J. A. Goliger, D. L. Paul, *Mol.Biol.Cell* 1995, 6 1491-1501.
- 60 [69.] T. Mine, R. Kushima, T. Fujita, *J Clin.Gastroenterol.* 1997, 25 Suppl 1 S111-S115.
- [70.] T. Mine, H. Yusuda, A. Kataoka, A. Tajima, J. Nagasawa, T. Takano, *J Clin.Gastroenterol.* 1995, 21 Suppl 1

S104-S107.

- [71.] G. J. Christ, P. R. Brink, *Braz.J Med Biol.Res.* 2000, 33 423-429.
- [72.] B. R. Berg, K. D. Cohen, I. H. Sarelius, *Am J Physiol* 1997, 272 H2693-H2700.
- [73.] C. de Wit, F. Roos, S. S. Bolz, S. Kirchhoff, O. Kruger, K. Willecke, U. Pohl, *Circulation Research* 2000, 86 649-655.
- [74.] B. Nafz, J. Stegemann, M. H. Bestle, N. Richter, E. Seeliger, I. Schimke, H. W. Reinhardt, P. B. Persson, *Circulation* 2000, 101 553-557.
- [75.] H. Q. Xie, V. W. Hu, *Exp.Cell Res.* 1994, 214 172-176.
- [76.] R. Dermietzel, *Brain Res Brain Res Rev* 1998, 26 176-183.
- 10 [77.] R. Rozental, M. Srinivas, S. Gokhan, M. Urban, R. Dermietzel, J. A. Kessler, D. C. Spray, M. F. Mehler, *Brain Res.Brain Res.Rev.* 2000, 32 57-71.
- [78.] H. Aldskogius, E. N. Kozlova, *Prog.Neurobiol* 1998, 55 1-26.
- [79.] J. D. Pal, X. Liu, D. Mackay, A. Shiels, V. M. Berthoud, E. C. Beyer, L. Ebihara, *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, 279 C596-C602.
- 15 [80.] V. Krutovskikh, H. Yamasaki, *Mutat.Res.* 2000, 462 197-207.
- [81.] D. Mackay, A. Ionides, Z. Kibar, G. Rouleau, V. Berry, A. Moore, A. Shiels, S. Bhattacharya, *Am J Hum.Genet.* 1999, 64 1357-1364.
- [82.] K. Nakamura, Y. Shibata, *Cells Tissues.Organs* 1999, 165 16-21.
- [83.] L. Nemeth, S. Maddur, P. Puri, *J Pediatr.Surg.* 2000, 35 823-828.
- 20 [84.] A. M. Simon, D. A. Goodenough, E. U, D. L. Paul, *Nature* 1997, 385 525-529.
- [85.] B. Sommersberg, A. Bulling, U. Salzer, U. Frohlich, R. E. Garfield, A. Amsterdam, A. Mayerhofer, *Biol.Reprod.* 2000, 63 1661-1668.
- [86.] I. Granot, N. Dekel, *Hum.Reprod.* 1998, 13 Suppl 4 85-97.
- [87.] W. M. Kilarski, E. Dupont, S. Coppen, H. I. Yeh, C. Vozzi, R. G. Gourdie, M. Rezapour, U. Ulmsten, G. M. Roomans, N. J. Severs, *Eur.J Cell Biol.* 1998, 75 1-8.
- 25 [88.] H. N. Ciray, X. Fu, M. Olovsson, G. Ahlsen, C. Shuman, B. Lindblom, U. Ulmsten, *Am J Obstet.Gynecol.* 2000, 182 926-930.
- [89.] C. Batias, N. Defamie, A. Lablack, D. Thepot, P. Fenichel, D. Segretain, G. Pointis, *Cell Tissue Res.* 1999, 298 113-121.
- 30 [90.] E. Schleiermacher, *Hum.Genet.* 1980, 54 391-404.
- [91.] C. Vozzi, S. Ullrich, A. Charollais, J. Philippe, L. Orci, P. Meda, *J Cell Biol.* 1995, 131 1561-1572.
- [92.] P. Meda, M. Chanson, M. Pepper, E. Giordano, D. Bosco, O. Traub, K. Willecke, A. el Aoumari, D. Gros, E. C. Beyer, *Exp.Cell Res.* 1991, 192 469-480.
- [93.] K. Ziambaras, F. Lecanda, T. H. Steinberg, R. Civitelli, *J.Bone Miner.Res.* 1998, 13 218-228.
- 35 [94.] I. Capozzi, R. Tonon, P. D'Andrea, *Biochem J* 1999, 344 Pt 2 545-553.
- [95.] S. G. Spanakis, S. Petridou, S. K. Masur, *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1998, 39 1320-1328.
- [96.] H. Yamasaki, V. Krutovskikh, M. Mesnil, T. Tanaka, D. M. Zaidan, Y. Omori, *C.R.Acad.Sci.III.* 1999, 322 151-159.
- [97.] B. D. Larsen, A. Holm, *Int.J Pept.Protein Res.* 1994, 43 1-9.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que es acetil-Asn-Tyr-NH₂, hidroxiacetil-Asn-Tyr-OH/NH₂, o hidroxiacetil-Gly-Tyr-OH; o una sal de los mismos.
- 5 2. Compuesto según la reivindicación 1, que es hidroxiacetil-Asn-Tyr-NH₂, o una sal del mismo.
3. Compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la sal es una sal de adición de ácido o una sal básica.
- 10 4. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal del mismo, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4 que se selecciona del grupo que consiste en un comprimido entérico y una preparación para inyección.
- 15 6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en terapia.
7. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una comunicación intercelular por enlaces gap (GJC) dañada.
- 20 8. Utilización según la reivindicación 7, en la que el medicamento es para el tratamiento de arritmia.
9. Utilización según la reivindicación 8, en la que la arritmia es una arritmia por reentrada de origen auricular o ventricular, incluyendo arritmia por alternancia de repolarización donde tanto las taquiarritmias supraventriculares como ventriculares pueden presentarse como taquicardia, aleteo o fibrilación.
- 25 10. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una conducción ralentizada en el corazón.
- 30 11. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento para la mejora de la contractilidad del corazón.
12. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de estados patológicos asociados con una comunicación intercelular por enlaces gap (GJC) dañada durante el estrés metabólico, incluyendo la privación de glucosa y oxígeno.
- 35 13. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento antitrombótico.
- 40 14. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil en la prevención y/o el tratamiento de la osteoporosis.
15. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de las articulaciones incluyendo artritis.
- 45 16. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad en cartílagos y articulaciones poco vascularizadas incluyendo artritis.
- 50 17. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil en la prevención y/o el tratamiento de pérdida ósea y el incremento de curación de fracturas óseas.
18. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil en la prevención y/o el tratamiento de la vascularización de la córnea es estados patológicos con una escasa nutrición de la córnea y para incrementar la curación de lesiones en la córnea.
- 55 19. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de heridas y/o úlceras isquémicas.
- 60

20. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de úlceras gástricas y úlceras duodenales.
- 5 21. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que aumenta el acoplamiento de enlaces gap y/o GJIC en la pared vascular para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión.
- 10 22. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de medicamentos útiles en la prevención del daño isquémico en el cerebro y para el tratamiento de psicosis orgánicas.
- 15 23. Utilización según la reivindicación 22, en la que las psicosis orgánicas son la depresión, la ansiedad, déficit en el aprendizaje y la memoria, fobias o alucinaciones.
- 20 24. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil en la prevención y/o el tratamiento de las cataratas.
- 25 25. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil en la prevención y/o el tratamiento de la sordera asociada con una comunicación intercelular por enlaces gap (GJIC) dañada.
- 30 26. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil en la prevención y/o el tratamiento de trastornos de motilidad gastrointestinal.
- 35 27. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de la infertilidad femenina que es debido a un acoplamiento célula a célula escaso en los ovarios.
- 40 28. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil junto con oxitocina para la inducción y facilitación del parto.
- 45 29. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de la infertilidad masculina asociada con un acoplamiento célula a célula alterado.
- 30 30. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento útil en la mejora de la tolerancia a la glucosa en un sujeto con diabetes mellitus no dependiente de insulina debido a una GJIC dañada entre células β .
- 35 31. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en tejido de origen endodérmico, mesodérmico o ectodérmico, carcinomas, neoplasmas hepatocelulares o colangiocelulares o cáncer de hueso.
- 40 32. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de heridas o lesiones en la piel o mucosa oral.
- 45 33. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del crecimiento o expansión de células cancerosas.
34. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la pancreatitis.

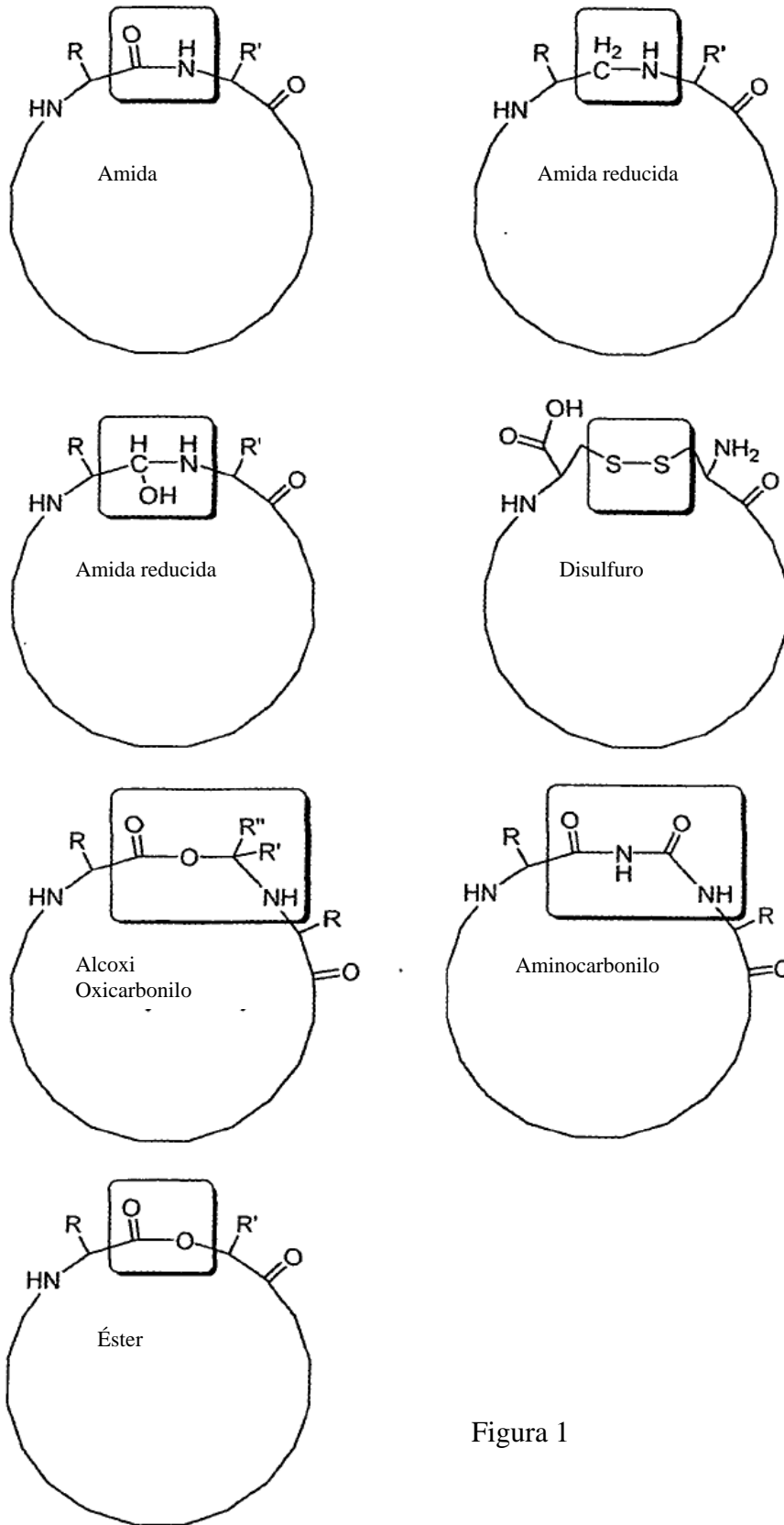


Figura 1

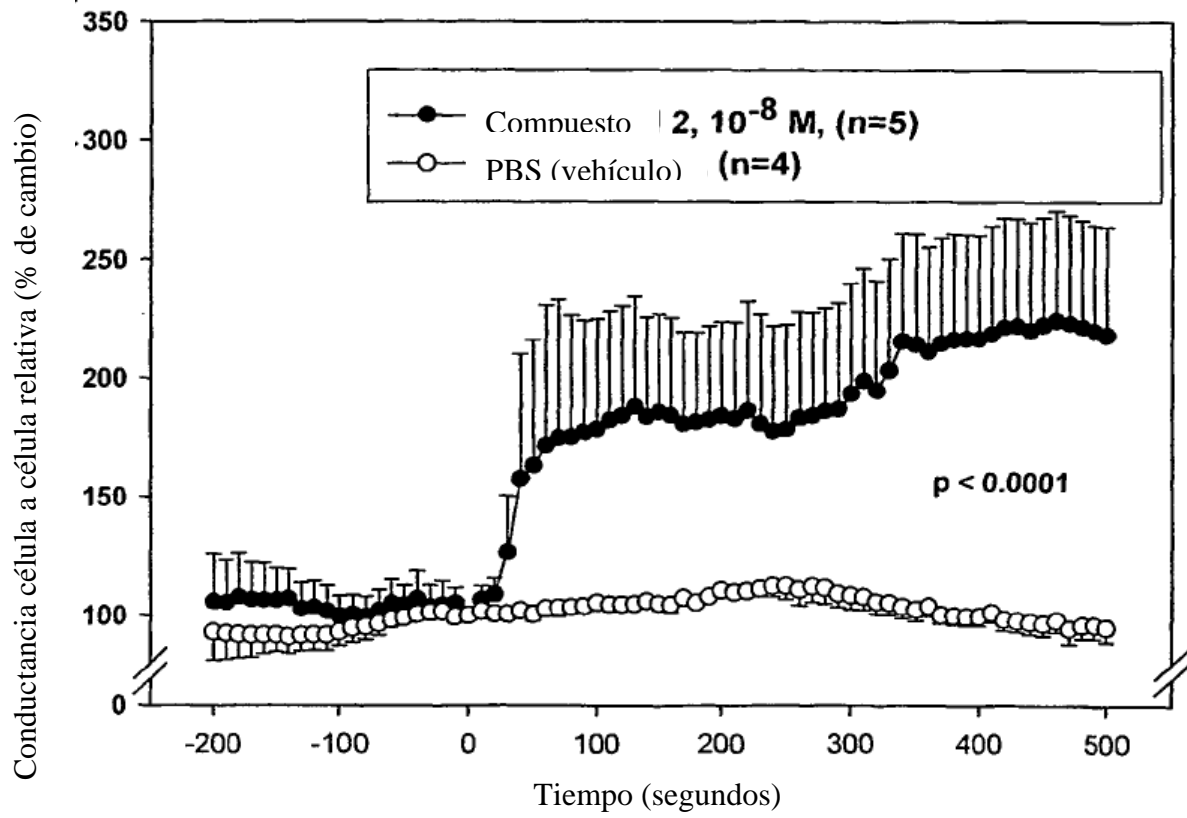


Figura 2

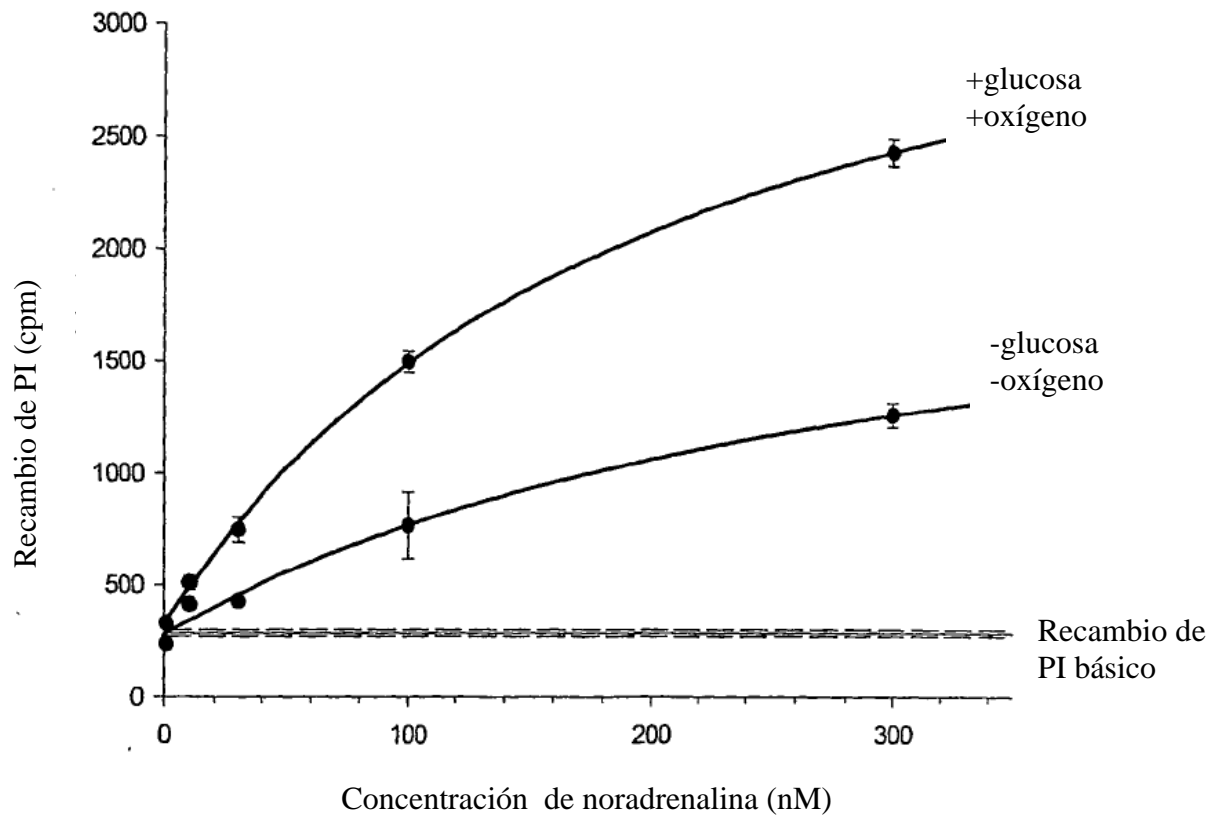


Figura 3

Recambio de PI en cardiomiocitos de rata neonatal

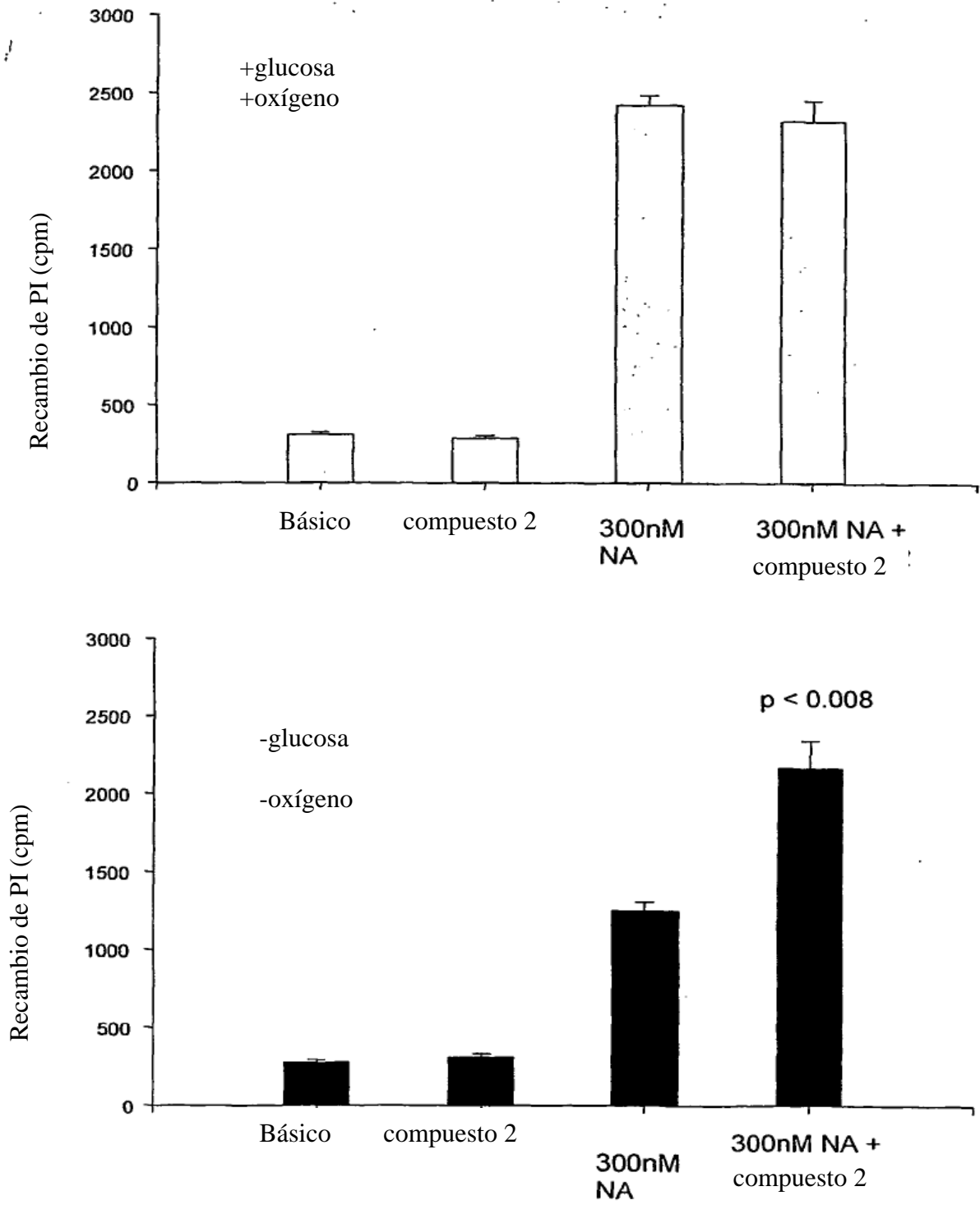
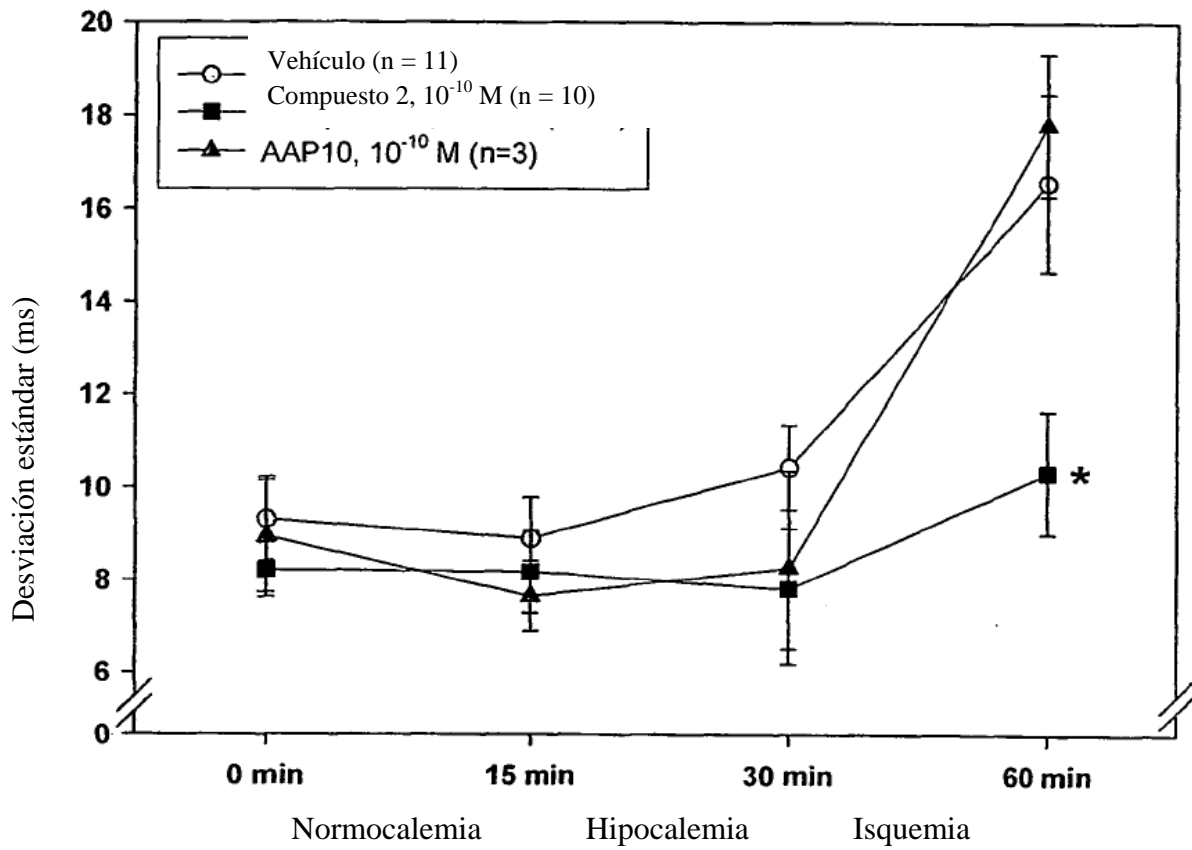


Figura 4

Dispersión APD₉₀ ventricular total



*: p < 0,05 frente a vehículo

Figura 5

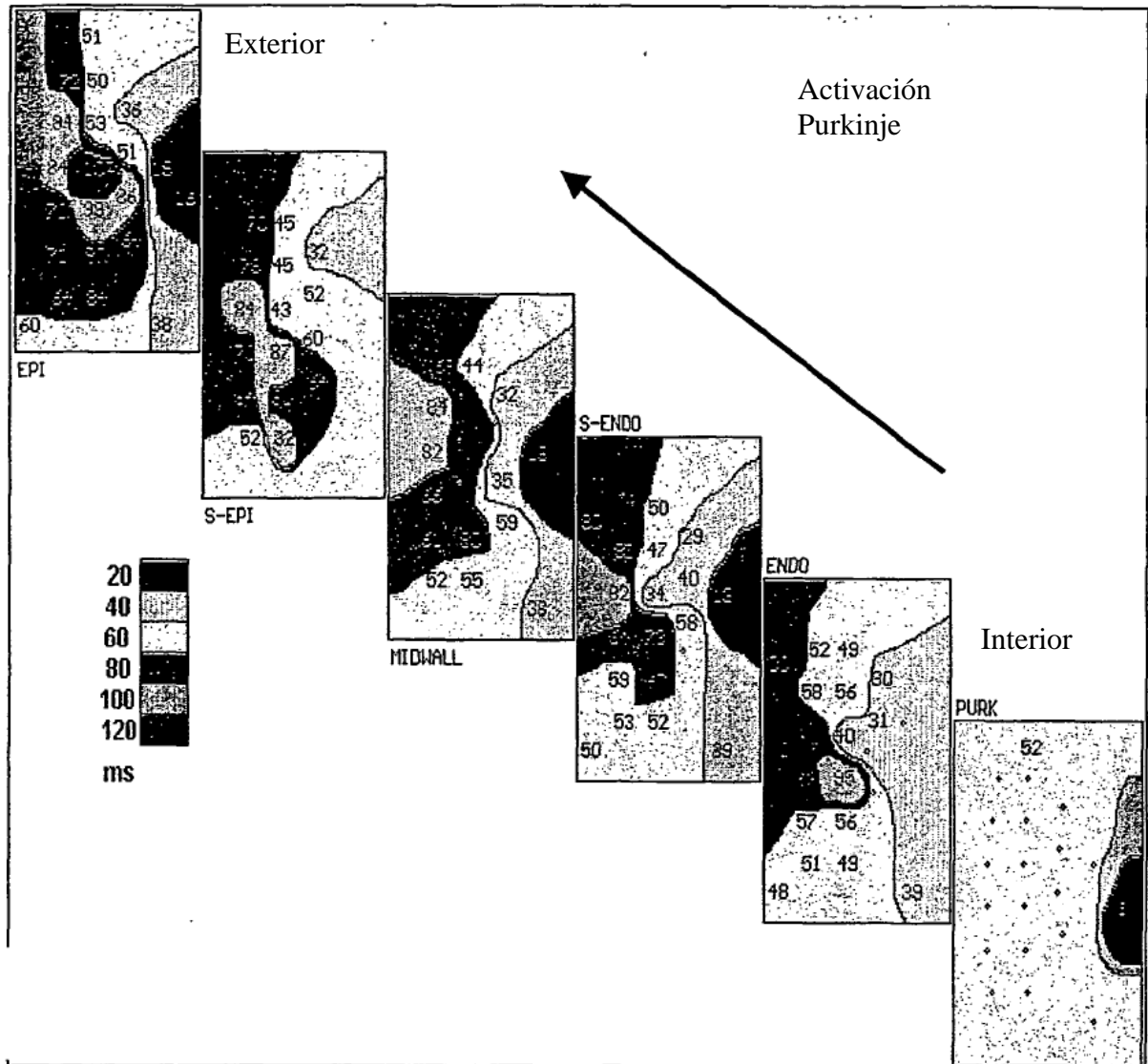


Figura 6

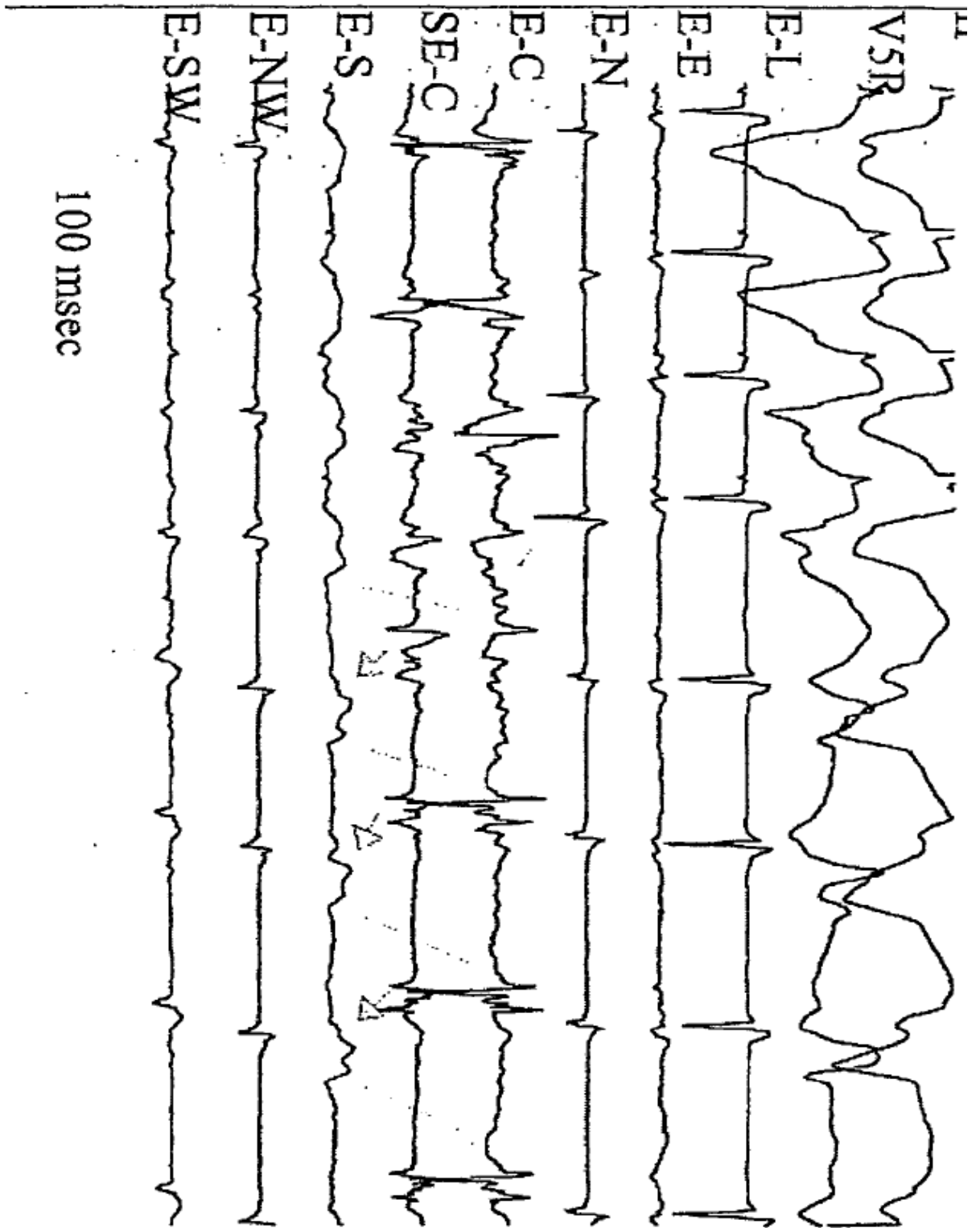


Figura 7

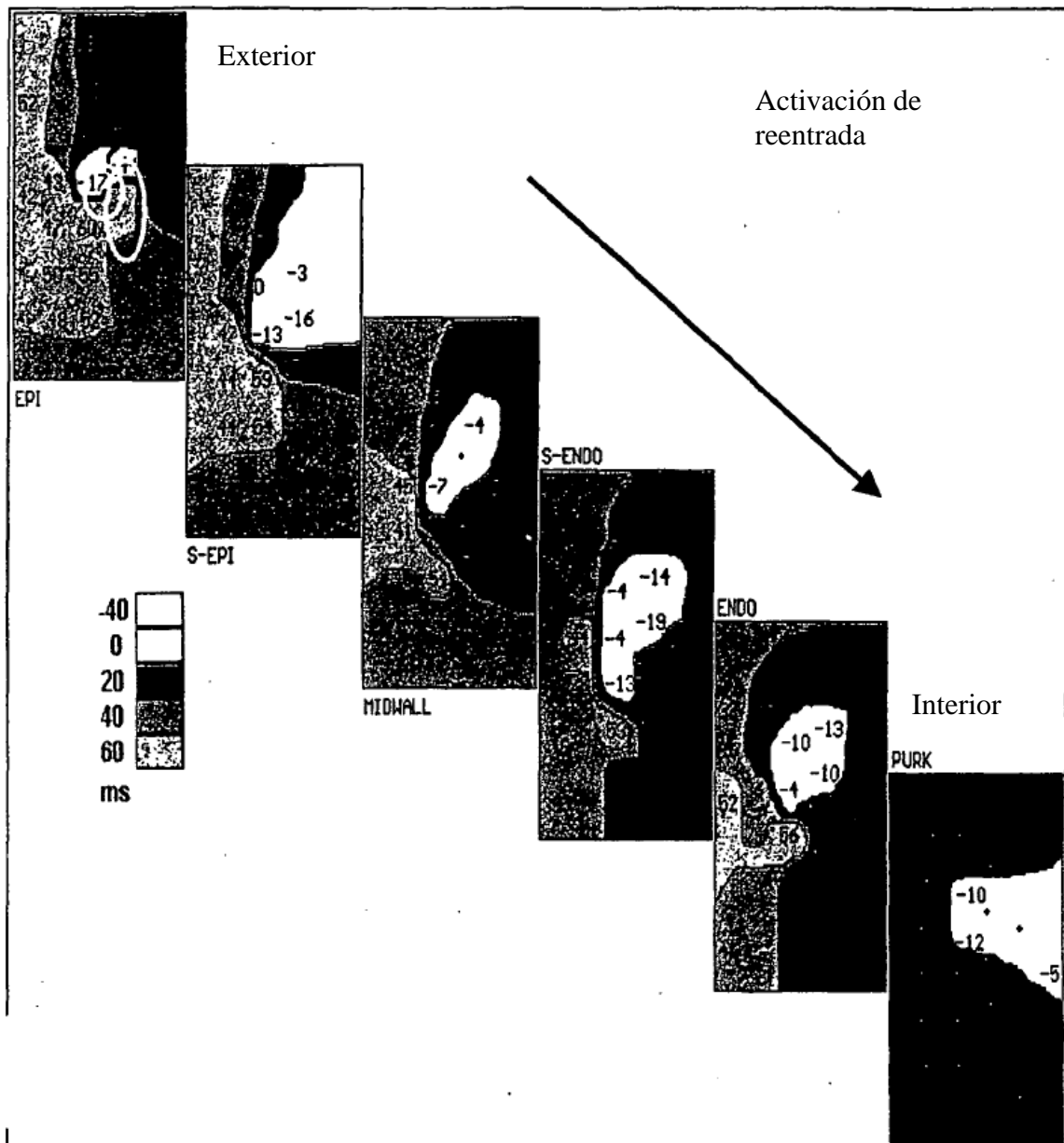


Figura 8

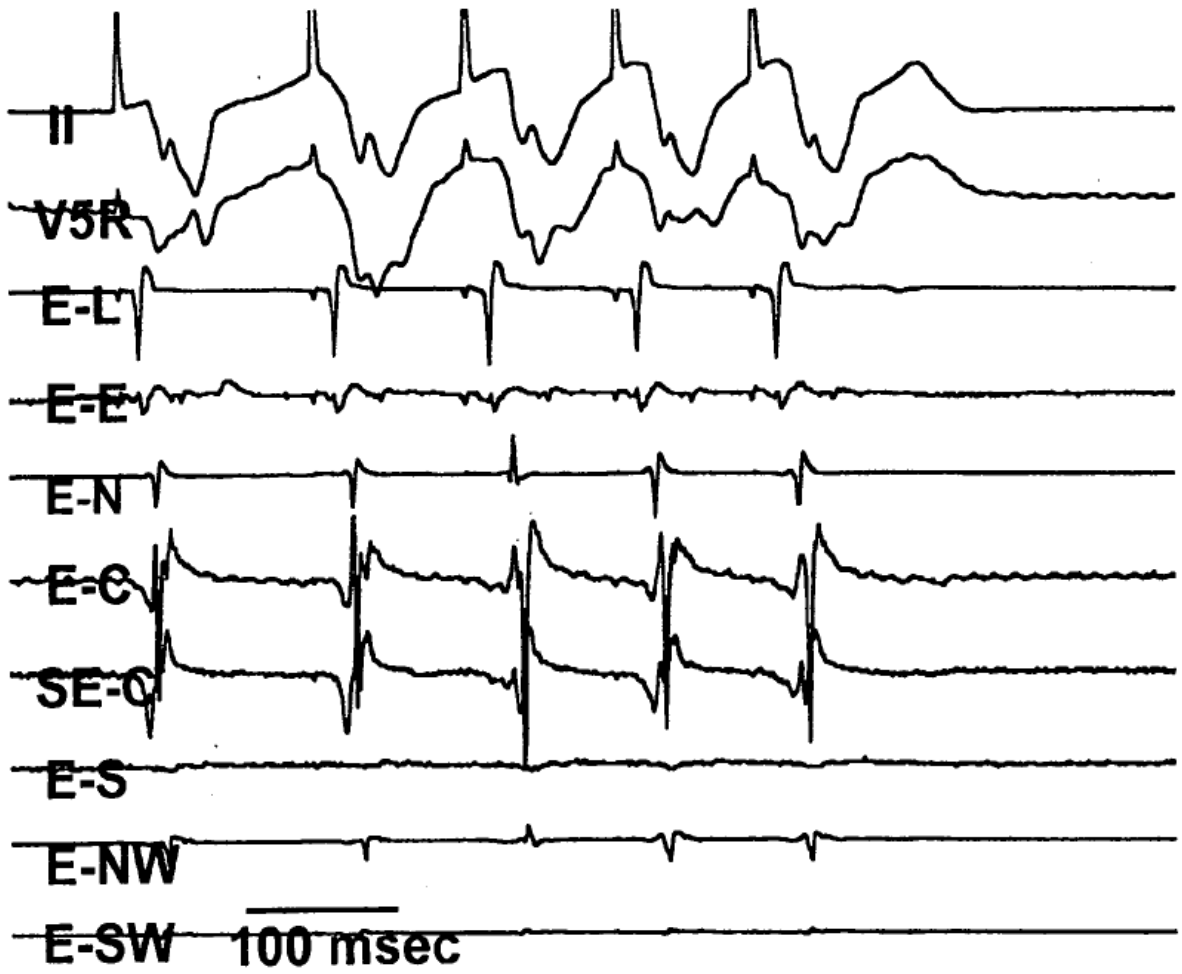


Figura 9

Ondas de calcio en HOB

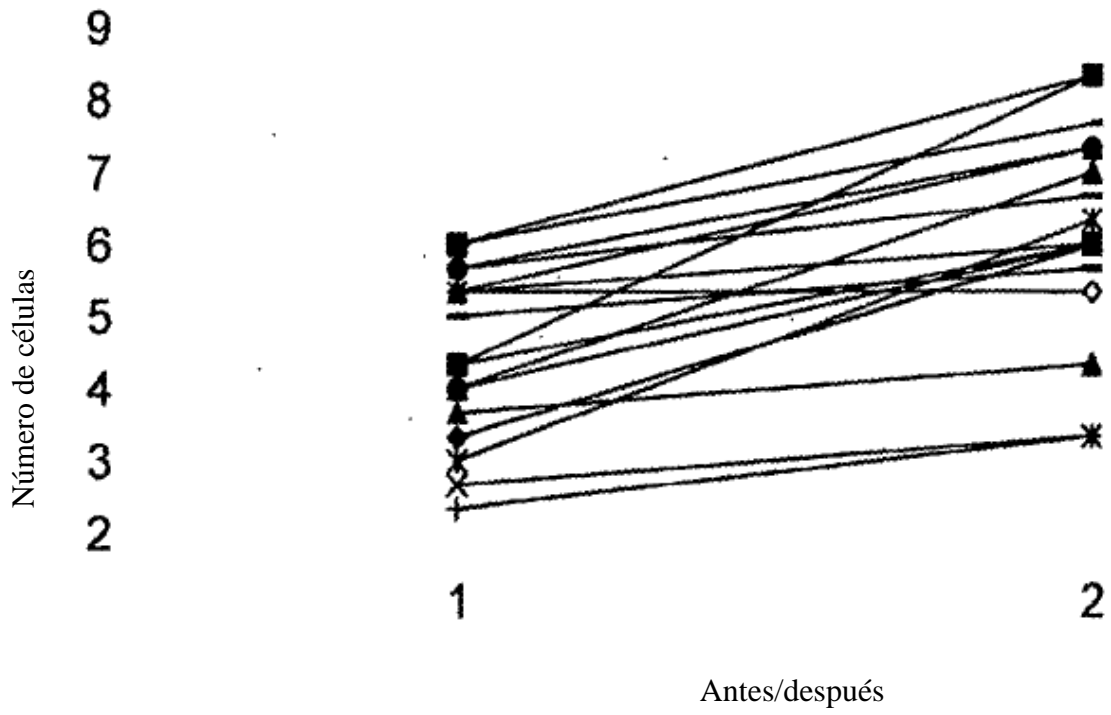


Figura 10

Ondas de calcio en ROS después de 48 h en O₂ al 3-6%

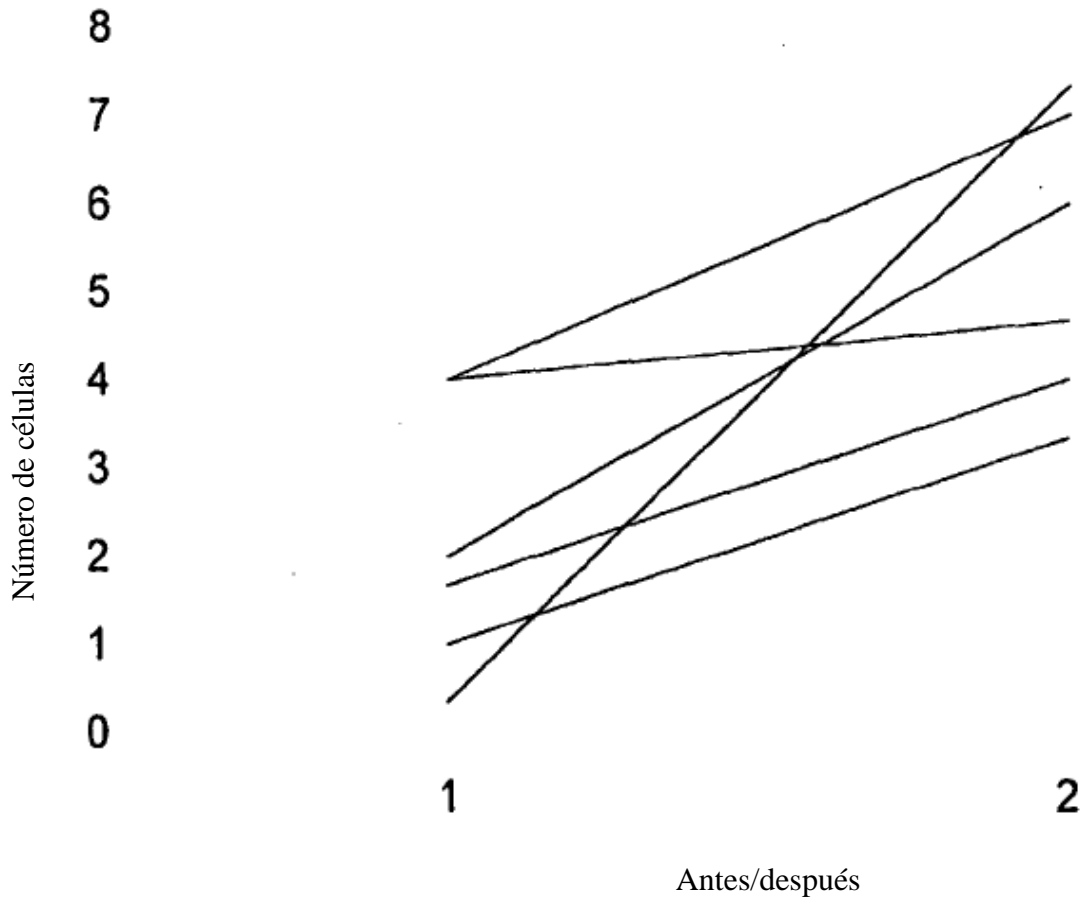


Figura 11

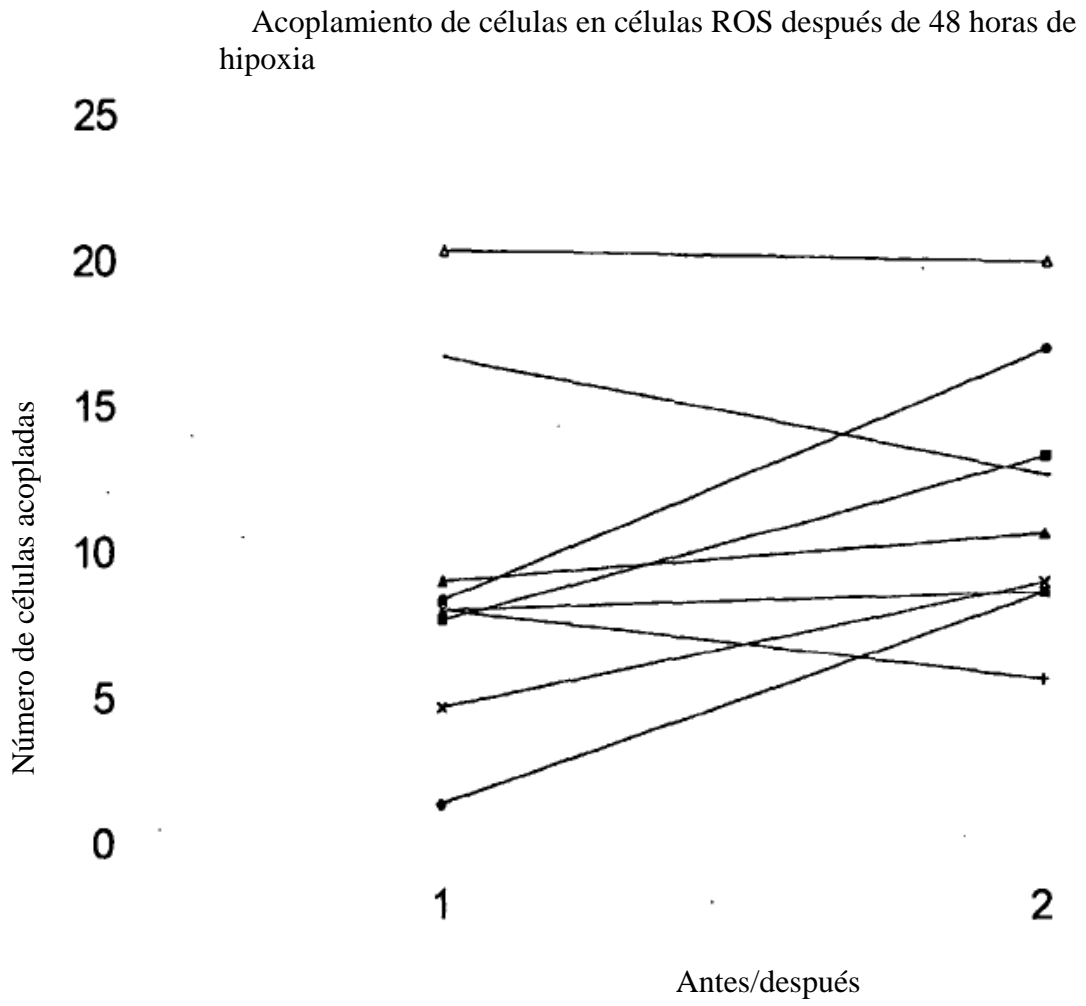


Figura 12

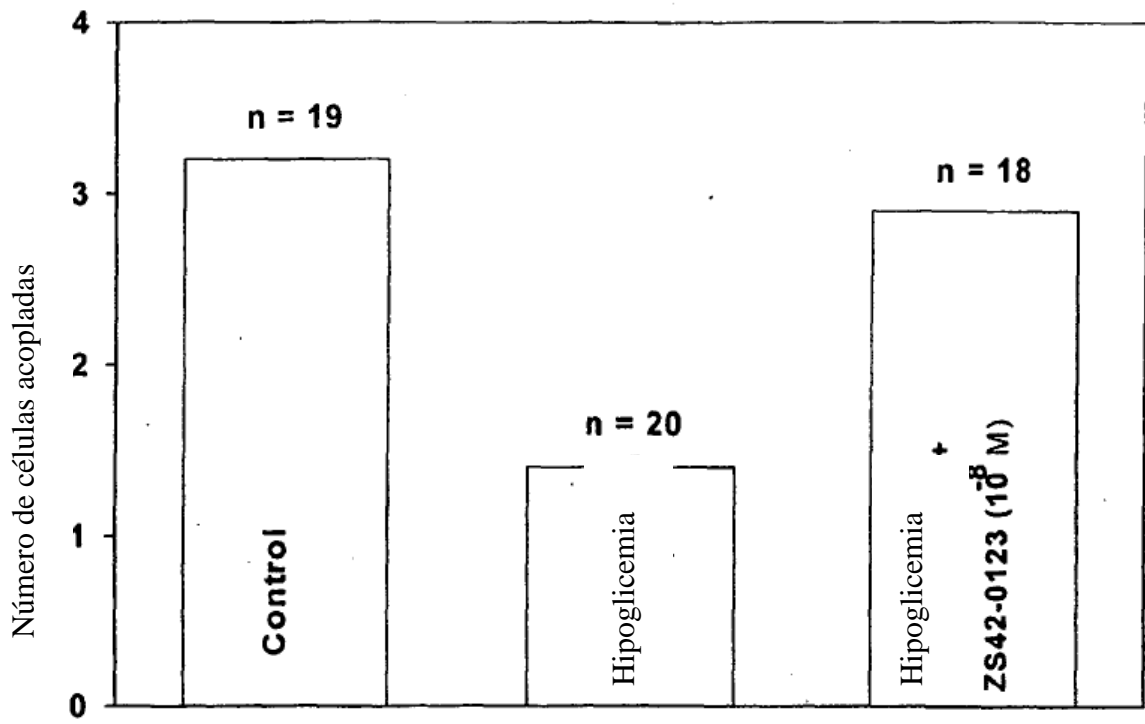


Figura 13

Actividad de fosfatasa alcalina en hOB

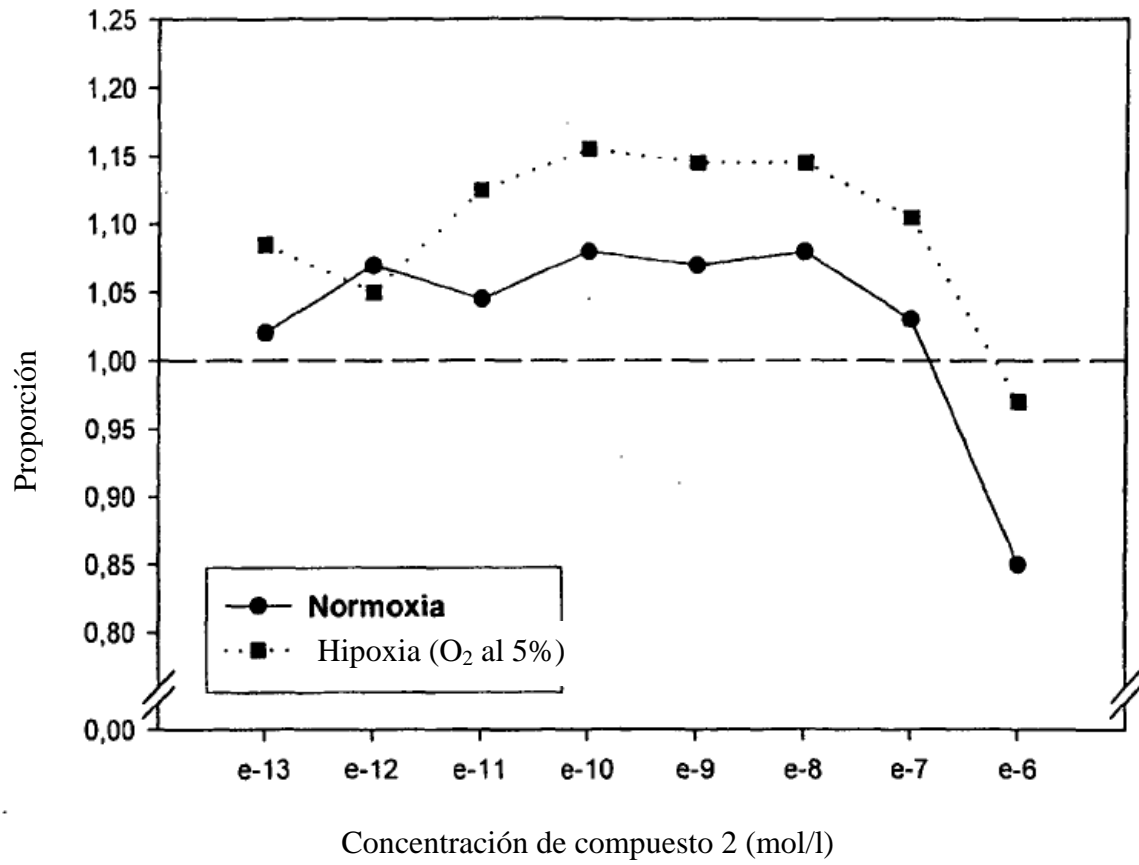


Figura 14

Acoplamiento de colorante LY en hOB después de DDT
 (13 μM).
 Efecto de ZS42-0123 (10^{-8}M)

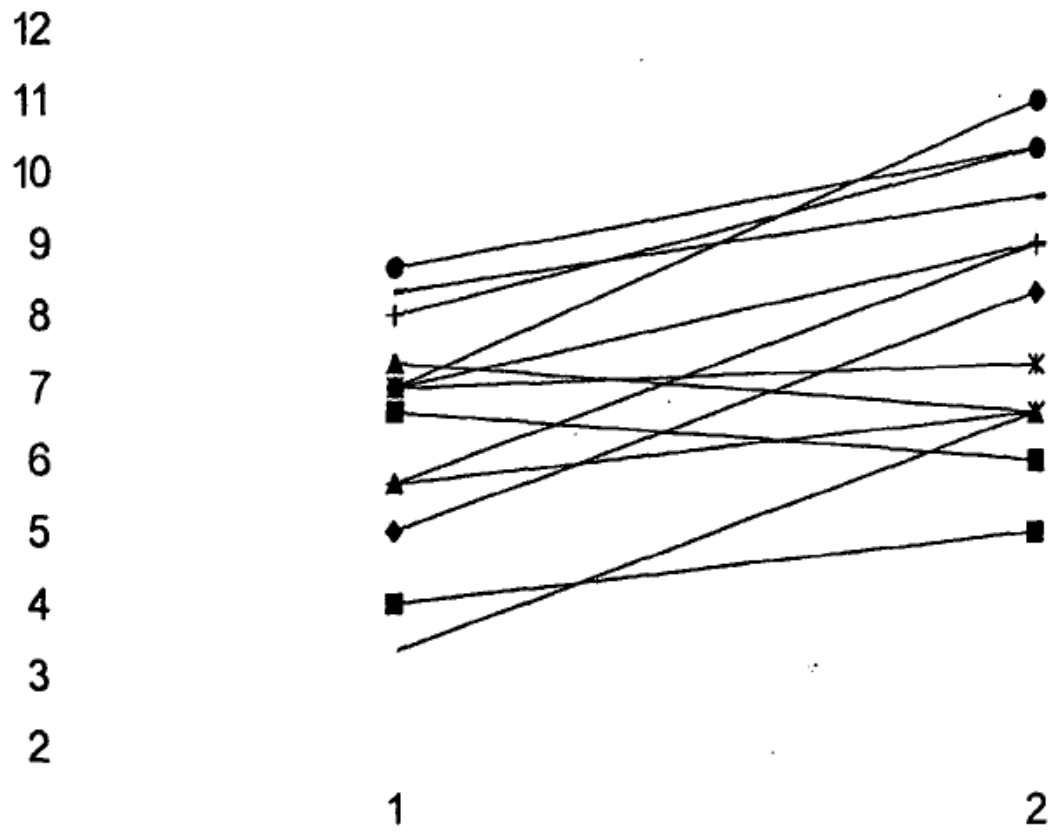


Figura 15