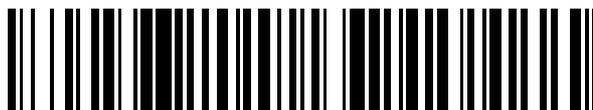


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 713**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7076 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/138 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2007 E 07777211 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 2049127**

54 Título: **Derivados de N-metanocarba para tratar enfermedades cardiacas**

30 Prioridad:

23.05.2006 US 802878 P

09.03.2007 US 893946 P

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

14.01.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF CONNECTICUT (100.0%)
UConn Health - MC6400, 400 Farmington Avenue
Farmington, CT 06032, US**

72 Inventor/es:

**LIANG, BRUCE TSAN;
PAPPANO, ACHILLES y
SHEN, JIAN-BING**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 526 713 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

Derivados de N-metanocarba para tratar enfermedades cardiacas

Esta solicitud reivindica las ventajas de las Solicitudes de Patente de Estados Unidos números de serie 60/802.878 presentada el 23 de mayo de 2006 y 60/893.946 presentada el 9 de marzo de 2007.

- 5 El Gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre esta invención de conformidad con los Institutos Nacionales de Salud, número de concesión RO1-HL48225.

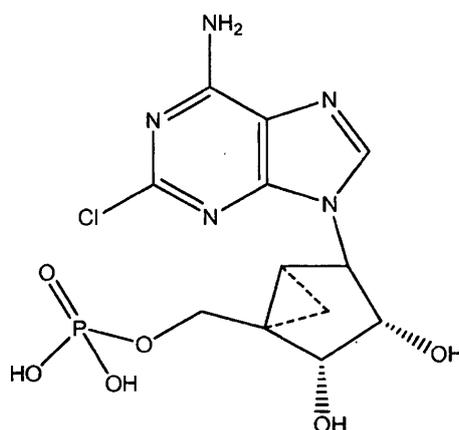
Antecedentes

Los receptores de nucleótidos de purina, conocidos como receptores purinérgicos P2, median en una serie de efectos biológicos potentes y posiblemente importantes en el sistema cardiovascular. Los canales iónicos P2X son canales de receptores activados por ATP extracelular, mientras que los receptores P2Y son receptores acoplados a la proteína G. En conjunto, representan dos subfamilias de los receptores de nucleótidos P2. Estudios anteriores han mostrado que el ATP extracelular puede causar una corriente iónica en miocitos ventriculares cardíacos murinos, de rata y de cobaya. El receptor que media en esta corriente parece ser un receptor P2X, siendo el receptor P2X₄ una subunidad importante del mismo. La activación de los receptores P2X conduce a la apertura de un canal catiónico no selectivo permeable a Na⁺, K⁺ y Ca²⁺. La corriente es de entrada con potenciales de membrana negativos, se invierte cerca de 0 mV, y se convierte de salida con potenciales positivos. La activación continua de este canal de receptor con ATP extracelular endógeno, puede asumir una función biológica importante. Esta activación constante con potenciales de membrana de reposo o negativos, produciría una corriente de entrada, mientras que su activación durante porciones despolarizadas del potencial de acción, debería conducir a una corriente de salida. Estas corrientes representan un posible mecanismo iónico por el que el canal P2X cardíaco logra sus efectos biológicos.

Aunque se conoce que la activación de los receptores P2X media en las corrientes de iones, se sabe poco sobre el papel biológico de esta mediación en la corriente de iones. Además, el efecto de agonistas del receptor P2X sobre funciones biológicas de P2X, incluyendo la función cardíaca y la contractilidad, no se entiende. Sigue existiendo una necesidad de aclarar la función de los receptores P2X y de sus agonistas sobre la función cardíaca y la contractilidad.

Compendio

En una realización, un medicamento para uso en el tratamiento de un sujeto mamífero que requiere un tratamiento para la hipertrofia cardíaca, comprende una cantidad de derivado N-metanocarba de AMP de fórmula



- 30 eficaz para el tratamiento de una hipertrofia cardíaca.

En otra realización, un derivado N-metanocarba de AMP de dicha fórmula se emplea en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de un sujeto mamífero que requiere un tratamiento de la hipertrofia cardíaca.

Breve descripción de las Figuras

- 35 La Figura 1 muestra la caracterización de la corriente estimulada con 2-meSATP en ambos miocitos ventriculares, WT y CSQ, medida por pinzamiento del voltaje en la configuración de la célula completa. 2-meSATP (3 μM) inducía una corriente de entrada constante con potenciales negativos y una corriente de salida con potenciales positivos con un potencial de inversión próximo a 0 mV.

- La Figura 2 muestra los efectos sobre la corriente provocada con 2-meSATP (3 μ M) de diversos antagonistas del receptor P2X, PPADS (100 μ M), NF449 (300 nM) y Azul Brillante G (5 μ M).
- La Figura 3 muestra los efectos sobre la esperanza de vida y la hipertrofia cardiaca de la administración crónica de MRS2339 en ratones CSQ. Se utilizó el análisis de Kaplan Meier para determinar la probabilidad de supervivencia en animales CSQ que recibieron vehículo o MRS2339 a través de una mini-bomba Alzet.
- La Figura 4 muestra las áreas de sección transversal de miocitos en ratones tratados con vehículo y MRS2339. El tratamiento crónico con MRS2339 causó una disminución significativa en el área de la sección transversal de las células (P <0,05).
- La Figura 5 muestra que el tratamiento con MRS2339 disminuía la relación entre peso del corazón/peso corporal en ratones CSQ (P<0,05).
- La Figura 6 muestra que MRS2339 (10 μ M) inducía una corriente similar a la provocada por 2-meSATP (3 μ M) en miocitos cardiacos murinos WT. Los datos se mostraron como la densidad de corriente en pA/pF. Los datos eran media \pm SEM de 18 miocitos procedentes de 10 ratones para la corriente inducida con 2-meSATP y 7 miocitos procedentes de 4 ratones para la corriente inducida con MRS2339.
- La Figura 7 muestra que MRS2339 (10 μ M) inducía una corriente similar a la provocada por 2-meSATP (3 μ M) con relaciones I-V idénticas y potenciales de inversión en el miocito cardiaco CSQ. La adición de MRS2339 o 2-meSATP inducía una corriente de entrada sobre las corrientes de membrana que se disipaba después del lavado del agonista.
- La Figura 8 muestra que el potente antagonista selectivo MRS2500 del receptor P2Y₁, no podía bloquear la corriente provocada por 2-meSATP. El receptor P2Y₁ no media en la corriente provocada por 2-meSATP.
- Figura 9. A. 2-meSATP, pero no 2-meSADP, era capaz de inducir una corriente de entrada constante en un miocito cardiaco de ratón adulto (3 meses) mantenida a -80 mV. Ambos agonistas estaban presentes a 3 μ M. La corriente inducida por 2-meSATP se invertía después del lavado del agonista. Las marcas verticales sobre el trazado de la corriente son pinzas para la tensión de rampa de -100 a +50 mV. B. Las relaciones I-V tomadas en a y b (para 2-meSADP) y en a y c (para 2-meSATP) en el panel A, se restaron y las diferencias se representaron gráficamente como una función de la tensión en pA/pF. Los datos se mostraron como medias \pm SEM de 8 miocitos cardiacos WT procedentes de 14 ratones.
- La Figura 10 muestra que MRS2339 carece de efecto vasodilatador en el anillo de aorta de ratón adulto. Segmentos de anillos de aorta torácica de ratones adultos (2-3 meses de edad) de tipo silvestre, se estudiaron en cámaras de órganos. Se determinó la relajación como respuesta a diversas concentraciones indicadas de acetilcolina y MRS2339.
- La Figura 11 muestra que el nivel de receptor P2X₄ se incrementa en los corazones CSQ defectuosos. Se homogeneizaron corazones de ratones WT y CSQ de tres meses, se solubilizaron, se inmunotransfirieron y se cuantificó el nivel relativo de receptor P2X₄.
- La Figura 12 muestra los transitorios con acortamiento de la contracción (CS) y los transitorios Ca²⁺ como respuesta a 2-meSATP (3 μ M) en miocitos cardiacos P2X₄R Tg. Los transitorios CS y Ca²⁺ aumentaron significativamente en comparación con los niveles de basales testigos.
- La Figura 13 muestra los transitorios CS y Ca²⁺ como respuesta a 2-meSATP (3 μ M) en miocitos de ratón adulto. Los transitorios CS y Ca²⁺ aumentaron significativamente en comparación con los niveles basales testigos.
- La Figura 14 es un gráfico del cambio en la fluorescencia en Ca²⁺ con respecto a en CS antes de la exposición al agonista de P2X, 2-meSATP.
- La Figura 15 muestra el contenido en Ca²⁺ del RS cuantificado por la corriente de entrada inducida con cafeína (10 mM) mediada a través del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ por la presencia de 2-meSATP (3 μ M) extracelular.
- La Figura 16 muestra el pico de la corriente de entrada inducida con cafeína (10 mM) mediada a través del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ por la presencia de 2-meSATP extracelular (3 μ M).
- La Figura 17 muestra la corriente de entrada integrada, inducida con cafeína (10 mM) mediada a través del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ por la presencia de 2-meSATP extracelular (3 μ M).
- La Figura 18 muestra un análisis de Kaplan Meier utilizado para determinar la probabilidad de supervivencia en animales P2X₄R Tg (65 ratones) y WT (32 ratones) después de un infarto de miocardio inducido por ligadura de LAD.
- La Figura 19 muestra los efectos de la hiperexpresión específica cardiaca de los receptores P2X₄ sobre LVDP disminuida después de un infarto de miocardio.

La Figura 20 muestra los efectos de la hiperexpresión específica cardiaca de los receptores P2X₄ sobre +dP/dt después de un infarto de miocardio.

La Figura 21 muestra los efectos de la hiperexpresión específica cardiaca de los receptores P2X₄ sobre -dP/dt después de un infarto de miocardio.

- 5 La Figura 22 muestra los efectos de la hiperexpresión específica cardiaca de los receptores P2X₄ sobre la relación peso del corazón/peso corporal después de infarto de miocardio.

La Figura 23 muestra el grosor de LVPW en mm en ratones P2X₄R Tg frente a ratones NTG, 2 meses después de un infarto.

- 10 La Figura 24 muestra el LVID medido en la diástole y la sístole y las diferencias entre LVIDd y LVIDs en ratones P2X₄R Tg frente a ratones NTG, 2 meses después de un infarto.

La Figura 25 muestra el acortamiento sistólico medido como fracción de acortamiento (FS) normalizada para el tamaño del infarto como el producto de FS y el % de infarto en ratones P2X₄R Tg frente a NTG, 2 meses después de un infarto.

- 15 La Figura 26 muestra el aumento de la supervivencia con MRS2339 después de un infarto de miocardio inducido por ligadura de LAD.

La Figura 27 muestra que MRS2339 puede aumentar +dP/dt en los corazones de ratones CSQ intactos.

La Figura 28 muestra que MRS2339 puede aumentar +dP/dt en los corazones de ratones WT intactos.

La Figura 29 muestra que la combinación de MRS2339 y metoprolol, un bloqueador beta-adrenérgico, mejora aún más la supervivencia en ratones binarios P2X₄R/CSQ.

- 20 Las características descritas anteriormente y otras características serán apreciadas y comprendidas por los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas.

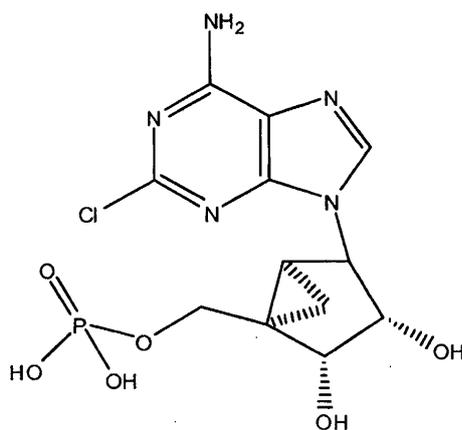
Descripción detallada

- 25 La presente invención se refiere a un agonista del receptor P2X resistente a la nucleotidasa, específicamente un derivado N-metanocarba de AMP, y a métodos de empleo del agonista. En la presente memoria, los inventores han descubierto inesperadamente que los derivados N-metanocarba de AMP son agonistas de los receptores P2X, y no de los receptores P2Y como se creía anteriormente. En esta memoria se incluye el uso del derivado N-metanocarba de AMP conocido como MRS2339, en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de un sujeto mamífero que requiere tratamiento de una hipertrofia cardiaca.

- 30 Un objeto de la presente invención es esclarecer la regulación del receptor P2X cardiaco en la hipertrofia cardiaca. Por ejemplo, basándose en estudios anteriores, no está claro si un aumento de la activación del canal del receptor P2X endógeno es beneficioso o perjudicial en la progresión de la insuficiencia cardíaca. Los inventores han investigado en este documento la regulación de la corriente iónica mediada por el receptor P2X y su papel potencial en la insuficiencia cardíaca, utilizando el modelo de miocardiopatía con calsecuestrina (CSQ) bien establecido. Se descubrió inesperadamente que la administración crónica del derivado N-metanocarba de AMP reduce la hipertrofia cardiaca y aumenta la esperanza de vida. Ventajosamente, el derivado N-metanocarba de AMP es capaz de inducir esta corriente iónica y evitar cualquier acción vasodilatadora. En una realización, la presente invención se refiere al derivado N-metanocarba de AMP y a su uso para tratar la hipertrofia cardiaca en un sujeto humano.

- 40 El agonista del receptor P2X resistente a la nucleotidasa es un derivado N-metanocarba de AMP. Estructuralmente, la restricción del anillo metanocarba en la conformación (N) confiere una resistencia relativa frente a la hidrólisis mediada por la 5'-nucleotidasa de análogos del AMP. La tasa de hidrólisis mediante 5'-ectonucleotidasa de (N) metanocarba AMP de rata era, por ejemplo, solo el 0,14% de la tasa de hidrólisis del AMP.

Específicamente, el agonista del receptor P2X resistente a la nucleotidasa es el derivado N-metanocarba de 2-cloro-AMP (MRS2339), de Fórmula II a continuación:



Fórmula II

También se incluyen métodos en los que el agonista del receptor P2X resistente a la nucleotidasa es una sal farmacéuticamente aceptable de la Fórmula II.

- 5 El derivado N-metanocarba de AMP, de acuerdo con la fórmula II, tiene afinidad hacia los receptores P2X. La afinidad hacia el receptor P2X del derivado N-metanocarba de AMP se puede determinar mediante la respuesta a la dosis de incrementos en la contractilidad. Los cambios en la contractilidad se pueden medir como cambios en la longitud del sarcómero y en transitorios Ca^{2+} , registrados a partir de miocitos aislados individuales utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia.
- 10 Datos anteriores sugieren que un aumento de la expresión o de la activación del receptor P2X cardíaco pueden ejercer un papel beneficioso en la hipertrofia cardíaca y la insuficiencia. Con el fin de aclarar la regulación de la corriente cardíaca de P2X en miocitos cardíacos deficientes y el efecto de agonistas del receptor P2 resistente a la nucleotidasa sobre la corriente cardíaca de P2X, se empleó el modelo CSQ de hipertrofia e insuficiencia cardíaca grave. Los ratones CSQ son un modelo de insuficiencia cardíaca grave que está causada por una hiperexpresión de la proteína calsequestrina que se une al Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. El modelo CSQ de ratón se caracteriza por una miocardiopatía dilatada agresiva seguida de muerte prematura a las 16 semanas de edad. Ratones transgénicos CSQ muestran muchas de las características de la miocardiopatía humana, incluyendo el agrandamiento cardíaco, una función contráctil disminuida y una señalización anormal del receptor β -adrenérgico. Los ratones CSQ son por lo tanto un sistema de modelo aceptado para estudiar la patogénesis y la progresión de la hipertrofia cardíaca y la insuficiencia cardíaca resultante de una homeostasis anormal del Ca^{2+} .

Se estudiaron los efectos de un agonista de P2X conocido en ratones CSQ, para determinar si un agonista de P2X podría afectar a las corrientes de membrana en miocitos ventriculares. El agonista de P2X, 2-metiliosina trifosfato (2-meSATP), inducía una corriente de membrana en miocitos ventriculares aislados a partir de ratones de tipo silvestre y ratones CSQ. La relación entre corriente y voltaje (I-V) y el potencial de inversión eran similares en ambos tipos de miocitos cardíacos. Sin embargo, la densidad de la corriente provocada por 2-meSATP era mayor en los miocitos CSQ que en los de tipo silvestre. Aunque los miocitos CSQ son hipertrofos y más grandes, la corriente se normalizó frente a la mayor capacidad de los miocitos CSQ como densidad de corriente en pA/pF. Estos datos sugieren que la corriente de P2X se regula al alza en los miocitos cardíacos de los ratones CSQ. Aunque no se sabe si el nivel de la proteína del receptor P2X cardíaco se incrementa y es la causa de la mayor densidad de corriente en los miocitos CSQ, el nivel de una de las subunidades conocidas, la del receptor P2X₄, se incrementó en esos miocitos. Puesto que la identidad exacta de las otras subunidades de P2X de este receptor P2X cardíaco natural no es conocida, el nivel de estas otras subunidades también puede estar regulado a la baja en los corazones CSQ defectuosos. Sin embargo, la mayor densidad de corriente mediada a través del receptor P2X endógeno y los niveles más altos de su subunidad P2X₄, sugieren una regulación al alza de este receptor en el miocito cardíaco defectuoso.

35 Además, la caracterización de la corriente provocada por 2-meSATP en el miocito cardíaco murino de tipo silvestre mostraba una falta de inhibición de la corriente con 2-meSATP mediante guanosina-5'-O-(2-tiodifosfato) (GDP β S) que estaba presente a una concentración conocida para bloquear el intercambio GDP/GTP, lo que cuestiona un papel de la proteína G en la mediación de esta corriente. Este hallazgo, junto con las observaciones de que el agonista de P2Y, 2-meSADP, no podía producir ninguna corriente y que el antagonista selectivo de P2Y₁, MRS2500 ((1' R, 2' S, 4' S, 5' S)-4-(2-yodo-6-metilamino-purin-9-il)-1-[(fosfato)-metil]-2-(fosfato)biciclo[3.1.0]hexano) no podía bloquear la corriente inducida por 2-meSATP o MRS2339, indican notablemente que no existe una función del receptor P2Y acoplado a la proteína G en la inducción de esta corriente. Se utilizaron tres antagonistas selectivos adicionales del receptor P2X. NF449 (ácido 4,4',4'',4'''-(carbonilbis(imino-5,1,3-bencenotriilbis(carbonilimino)))tetraquis-benceno-1,3-disulfónico) es selectivo para los receptores P2X₁ naturales de rata frente a los receptores P2X₃ y P2Y₁ naturales de conejillo de indias, o frente a los receptores P2Y₂ humanos naturales en células HEK293. NF449 también es

selectivo para receptores P2X₁ humanos recombinantes frente a P2X₇, expresados en oocitos de *Xenopus*. Aunque la selectividad de NF449 para los receptores P2 murinos naturales no se conoce, se puede deducir a partir de los datos utilizando NF449, que el receptor P2X₁ homomérico es parte improbable del receptor P2 cardíaco natural que media en la corriente inducida con 2-meSATP. A 5 mM, el ácido piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico (BBG) puede bloquear el receptor P2X₇ de rata y humano, pero no bloqueará los receptores P2X₃, P2X_{2/3}, P2X₄ o P2X_{1/5} de rata. Se puede inhibir parcialmente el receptor P2X₂ de rata o el receptor P2X₄ humano. A esta concentración, el BBG casi puede suprimir la corriente mediada por el receptor P2X₅ humano. Dado que no hay datos sobre el efecto de BBG sobre ninguno de los receptores P2X murinos, no se puede excluir definitivamente un papel de los receptores homoméricos P2X₅ y P2X₇ en la mediación de la corriente 2-meSATP en el miocito murino. Que los antagonistas de los receptores P2X (PPADS) pueden bloquear la mayoría de la corriente provocada por 2-meSATP, es coherente con un papel del receptor P2X₄ como una subunidad del receptor P2X natural que es mediador de esta corriente. Esta conclusión también es coherente con nuestros hallazgos previos que mostraban una sensibilidad parcial de la corriente frente al antagonismo mediante suramina.

Con el fin de investigar el papel del receptor P2X cardíaco natural en la insuficiencia cardíaca, MRS2339 se administró a ratones CSQ. Cuando se administraba crónicamente *in vivo* a los ratones CSQ defectuosos, MRS2339 reducía la hipertrofia cardíaca, tal y como se muestra por una disminución en el tamaño de los miocitos y la relación entre el peso del corazón/peso corporal, y por una supervivencia prolongada. Sin estar ligado a una teoría, se cree que la activación del receptor P2X cardíaco es importante en el efecto beneficioso observado con MRS2339. En primer lugar, el efecto antihipertrófico de la hiperexpresión específica de miocitos del receptor P2X₄ es similar a la de la administración *in vivo* de MRS2339. Los efectos saludables de MRS2339 y la hiperexpresión específica de miocitos del P2X₄R en el mismo modelo animal de insuficiencia cardíaca, son casi idénticos con reducciones en el tamaño de los miocitos y la relación entre el peso del corazón/peso corporal, así como la prolongación de la esperanza de vida. En segundo lugar, este agonista de P2 era capaz de inducir una corriente similar a la provocada por el agonista de P2X 2-meSATP, no solo en los miocitos cardíacos WT, sino también en los miocitos cardíacos CSQ. Durante la administración de este agonista resistente a la 5'-nucleotidasa, probablemente el receptor P2X cardíaco fue activado en algún grado *in vivo*. En tercer lugar, este agonista está desprovisto de cualquier efecto vasodilatador a una concentración tan alta como 10 μM, mientras que la acción vasodilatadora de la acetilcolina fue sorprendente y se demostraba fácilmente en la misma preparación de anillo vascular. La falta de cualquier efecto vasodilatador *in vitro* indica que no hay ninguna descarga vascular como causa de los efectos beneficiosos de este agonista en los animales con insuficiencia cardíaca. Sin embargo, como no se conoce la presión arterial en los animales CSQ, una posible disminución de la presión arterial inducida con MRS2339, puede haber contribuido al efecto beneficioso observado.

El mecanismo por el cual la corriente P2X cardíaca consigue su efecto beneficioso en la insuficiencia cardíaca, es desconocido. La corriente de entrada con potenciales negativos puede aumentar la carga de calcio del RS y mejorar el rendimiento del corazón con insuficiencia. La corriente de salida con potenciales positivos puede mejorar la repolarización durante la fase 1 o 2, y acortar de este modo la duración del potencial de acción con la consiguiente disminución de la afluencia de calcio y la reducción de estímulo para la hipertrofia cardíaca. La duración del potencial de acción y su manipulación han sido implicados en el desarrollo o la modulación de la hipertrofia cardíaca.

En general, el receptor P2X de miocitos cardíacos se regula al alza en el modelo CSQ de hipertrofia e insuficiencia cardíaca. La administración crónica *in vivo* del agonista de P2X, MRS2339, puede rescatar el fenotipo hipertrófico de los animales CSQ y prolongar su longevidad. Este efecto beneficioso parece estar mediado por la activación del receptor P2X cardíaco regulado al alza. Los datos implican que el aumento de la corriente de P2X de miocitos cardíacos puede revertir o atenuar la hipertrofia y la insuficiencia cardíacas y sugiere que los agonistas en este canal de receptor controlado con nucleótidos, representan una nueva diana terapéutica.

El derivado N-metanocarba de AMP, conocido como MRS2339, se utiliza en el tratamiento de la hipertrofia cardíaca. La hipertrofia cardíaca es un engrosamiento del músculo cardíaco (miocardio), que da como resultado una disminución del tamaño de la cámara del corazón, incluyendo los ventrículos izquierdo y derecho. Las alteraciones de la función del Ca²⁺ son conocidas por estar asociadas con la hipertrofia cardíaca.

Además, se estudió el mecanismo de mejora de la contractilidad mediado por el receptor P2X y el papel de este receptor en la progresión de la insuficiencia cardíaca después de un infarto inducido por ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). La activación de los receptores P2X cardíacos es capaz de mejorar el estado contráctil del miocito y del corazón intacto. Poco se sabe sobre el mecanismo de aumento de la contractilidad mediado por el receptor P2X o de la función biológica de este receptor. Empleando como modelo ratones transgénicos con hiperexpresión específica cardíaca de receptores P2X₄, los datos actuales muestran que un aumento de la carga de Ca²⁺ en el retículo sarcoplásmico (RS) es el mecanismo del incremento de la contractilidad mediado por el receptor P2X y que este canal de receptor es capaz de aumentar la supervivencia y mejorar la función cardíaca después de un infarto de miocardio.

El ATP extracelular liberado desde los nervios simpáticos, las plaquetas activadas, las células endoteliales o las células cardíacas pueden ejercer una serie de efectos cardiovasculares. Estos efectos están mediados a través de los receptores P2Y acoplados a la proteína G o los canales de los receptores P2X controlados por un ligando. En el corazón, la activación del receptor P2X de miocitos cardíacos o su hiperexpresión, puede causar un aumento de la contractilidad. Entre la subfamilia del receptor P2X, el receptor P2X₄ es una subunidad importante del receptor P2X

de miocitos cardiacos. Los miocitos cardiacos aislados a partir de ratones transgénicos con hiperexpresión específica cardiaca del receptor P2X₄, se han desarrollado como modelo para investigar el mecanismo de mejora de la contractilidad. Una variedad de líneas de prueba sugieren que el mecanismo de este estado contráctil mejorado es el resultado de un aumento de la carga de Ca²⁺ en el RS a través de este canal de receptor, mediante ATP extracelular. En primer lugar, la activación del receptor P2X₄ hiperexpresado a través del agonista de P2X, 2-meSATP, causaba un aumento del Ca²⁺ intracelular. Este aumento en transitorio Ca²⁺ celular estaba asociado temporalmente con el aumento de la contractilidad de los miocitos. En segundo lugar, la activación del canal de receptor en miocitos transgénicos (Tg) P2X₄R aumentaba la corriente de entrada I_{Na/Ca} inducida con cafeína, en presencia de 2-meSATP extracelular. Este aumento de la corriente I_{Na/Ca} no era debido a un aumento de la densidad de I_{Na/Ca} en el miocito Tg, ya que este último tiene una densidad I_{Na/Ca} basal similar a la de los miocitos no transgénicos (NTG). En cambio, el aumento de la corriente I_{Na/Ca} era el resultado de un aumento del almacenamiento de Ca²⁺ en el RS. En tercer lugar, la relación entre el cambio en el acortamiento contráctil (CS) y el del Ca²⁺ intracelular, era la misma antes y después de la aplicación del agonista de P2X. Las pendientes eran prácticamente idénticas. Estos datos mostraron que la activación de un receptor P2X₄ hiperexpresado no cambiaba la sensibilidad frente a Ca²⁺ celular, lo que indica que no existe la posibilidad de que un aumento de la sensibilidad de Ca²⁺ fuera el mecanismo para el incremento de la contractilidad inducida por el receptor. En cuarto lugar, un estudio previo demostró que la activación de los receptores P2X cardiacos naturales o hiperexpresados no tenía efecto sobre la corriente del canal de Ca²⁺ de tipo L, descartando un aumento de la actividad de los canales de tipo L como una causa del aumento de la contractilidad de los miocitos, a través de los receptores P2X. Finalmente, el aumento inducido por el agonista de la contractilidad de los miocitos Tg no se asoció con ningún aumento del AMP cíclico, lo que es coherente con una falta de efecto de la activación del receptor P2X sobre el canal de Ca²⁺ de tipo L.

Como se ha explicado anteriormente, existe una función beneficiosa de protección del receptor P2X cardiaco en el modelo CSQ de miocardiopatía e insuficiencia cardiaca. El rescate del fenotipo de insuficiencia cardiaca CSQ mediante la hiperexpresión específica cardiaca de los receptores P2X₄ puede ser el resultado de un almacenamiento y una función mejorados de Ca²⁺ en el RS mediado por el receptor P2X. No se sabe si el receptor P2X cardiaco también puede tener un efecto favorable sobre la insuficiencia cardiaca en relación con otras etiologías. Los datos actuales mostraban que animales Tg P2X₄R tienen una supervivencia incrementada después de un infarto de miocardio inducido por ligadura de LAD. Todas las muertes ocurrieron al cabo de 7-8 días después de la ligadura de LAD. Excluyendo las muertes asociadas con una lesión aguda procedente de cirugía, traumatismo o anestesia, tuvieron lugar significativamente menos muertes en los ratones Tg P2X₄R que en los ratones NTG. La mejoría en la supervivencia de la hiperexpresión del receptor P2X cardiaco era el resultado de un efecto protector durante este breve período posterior al infarto. El efecto sobre la supervivencia no estaba asociado con una disminución del tamaño del infarto en los animales Tg P2X₄R ya que tanto los corazones Tg como NTG tienen tamaños similares del infarto. Se observó una alteración de la supervivencia posterior al infarto, poco o mucho después de la ligadura de LAD. El beneficio temprano de la supervivencia proporcionado por una hiperexpresión del receptor cardiaco P2X₄, puede ser secundario a un efecto beneficioso sobre la función cardiaca durante el periodo inmediatamente posterior al infarto. De acuerdo con este concepto, los animales Tg mostraron una función cardiaca mejorada con una LVDP significativamente más elevada, +dP/dt y -dP/dt a los 7 días después del infarto. La relación entre el peso del corazón/peso corporal y el área de la sección transversal de los miocitos cardiacos eran inferiores en los animales Tg que en los NTG, proporcionando una evidencia adicional de un efecto beneficioso del receptor P2X cardiaco sobre la progresión de la insuficiencia cardiaca en este modelo de miocardiopatía isquémica. Es sugerente que una disminución de la hipertrofia cardiaca estuviera asociada con un rendimiento contráctil cardiaco mejorado en los ratones Tg P2X₄R. Una asociación entre la reducción de la hipertrofia compensatoria y un mejor rendimiento de LV también se observó en ratones que hiperexpresaban sintasa de óxido nítrico y en ratones que recibieron alopurinol o el inhibidor de la cinasa Rho, fasudil, después de la ligadura de LAD. Por el contrario, otros han observado una asociación entre el aumento de la hipertrofia con una dilatación y una disfunción del LV en ratones Tg que hiperexpresan la acetiltransferasa de histona p300. La asociación entre el efecto antihipertrófico de la hiperexpresión del receptor P2X₄ y su efecto sobre la mejora contráctil, proporciona una base para la teoría de que la hipertrofia compensatoria, como la que se produce después del infarto, puede no ser necesaria ni beneficiosa.

El efecto beneficioso de la hiperexpresión del receptor cardiaco P2X₄ también era evidente 2 meses después del infarto. Tanto el engrosamiento sistólico de la pared no infartada (LVPW) como la disminución de la dimensión interna del ventrículo izquierdo en sístole, eran mayores en corazones Tg que en corazones NTG, mediante ecocardiografía. Las mediciones de la contracción mejorada se obtuvieron incluso cuando el tamaño del infarto era mayor en los corazones Tg que en los corazones NTG. Con la preparación de corazón aislado *in vitro* en funcionamiento, no se pudo detectar una función contráctil global ventricular izquierda, mejorada en los animales Tg frente a animales NTG después del infarto, 2 meses después de la ligadura. La razón de la diferencia entre las mediciones ecocardiográficas del corazón realizadas *in vivo* e *in vitro* no está clara. Sin embargo, existen varias explicaciones posibles. En primer lugar, la medición *in vivo* puede ser más sensible para detectar una mejora de la función contráctil que en el método *in vitro*. En segundo lugar, un aumento del rendimiento contráctil derivado del receptor P2X₄ hiperexpresado puede llegar a ser menos evidente durante la progresión de una remodelación adversa. Solo un método más sensible podía detectar una diferencia en la función cardiaca. En tercer lugar, el tamaño relativamente grande del infarto provocó una reducción significativa de la función cardiaca. Aunque los corazones Tg mostraban una función contráctil basal incrementada en los estudios actuales y anteriores, el aumento de la contractilidad no puede aumentar el miocardio viable restante que se contrae, para manifestar una función general significativa mediante el método *in*

vitro. Sin embargo, los efectos beneficiosos del receptor P2X sobre la función contráctil cardíaca y la hipertrofia durante el período temprano posterior al infarto son probablemente responsables de la supervivencia temprana mejorada. Un apoyo continuado del rendimiento contráctil cardíaco a través del receptor P2X cardíaco, mantenía los efectos saludables tempranos durante una remodelación de insuficiencia cardíaca isquémica.

- 5 El aumento de $-dP/dt$ o la tasa de relajación del músculo cardíaco en animales transgénicos que hiperexpresan el receptor P2X₄, sugiere que la activación del receptor P2X cardíaco se puede utilizar para tratar una insuficiencia cardíaca diastólica. Al igual que la hiperexpresión del receptor P2X₄, el tratamiento con los derivados N-metanocarba de AMP se puede emplear en individuos que requieren un tratamiento de la insuficiencia cardíaca diastólica. La insuficiencia cardíaca diastólica está causada cuando el corazón no se puede relajar totalmente, por lo que no se
10 llena de sangre de forma adecuada. Al aumentar la tasa de relajación del músculo cardíaco, los derivados N-metanocarba de AMP mejorarán la función cardíaca en individuos con insuficiencia cardíaca diastólica.

- En general, el receptor P2X de miocitos cardíacos representa una nueva vía a través de la cual un canal iónico de la superficie celular controlado por un ligando, puede incrementar el almacenamiento de Ca^{2+} en el RS y mejorar el rendimiento contráctil. El aumento de la expresión del receptor P2X cardíaco puede rescatar el fenotipo de insuficiencia cardíaca después de un infarto de miocardio. Este efecto beneficioso parece estar mediado por el aumento,
15 inducido por el receptor de P2X, del rendimiento contráctil y la disminución de la hipertrofia cardíaca. El estudio demostró una nueva vía que surge a partir de un canal iónico en la superficie celular para tener un beneficio terapéutico rescatando una insuficiencia cardíaca.

El derivado N-metanocarba de AMP se utiliza para tratar a un mamífero tal como un ser humano.

- 20 En una realización, el derivado N-metanocarba de AMP se coadministra con un agente adicional tal como, por ejemplo, un bloqueador beta-adrenérgico del receptor, un bloqueador del receptor de la angiotensina o un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.

- Para la administración oral, la preparación farmacéutica puede estar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se puede presentar como un producto farmacológico para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las composiciones farmacéuticas pueden estar
25 en forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno fosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica.
30

Las preparaciones para administración oral se pueden formular de forma adecuada para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración bucal, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

- 35 Para la administración por inhalación, las composiciones se administran convenientemente en forma de una presentación como pulverización de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos, por ejemplo de gelatina,
40 para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

- Las composiciones se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, por inyección de bolo o infusión continua a través de una inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Las composiciones pueden estar en formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos, antes de su uso.
45

- 55 Las composiciones se pueden formular en forma de cremas, lociones, pomadas o tinturas, por ejemplo, que contienen bases convencionales, tales como hidrocarburos, vaselina, lanolina, ceras, glicerina o alcohol. Las composiciones también se pueden formular en forma de composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases convencionales para supositorios tales como manteca de cacao u otros

glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, las composiciones también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con materiales polímeros o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de administración o excipientes para fármacos hidrófilos.

Las composiciones se pueden presentar, si se desea, en un envase o un dispositivo dispensador que puede contener una o varias formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El envase pueden comprender, por ejemplo, una lámina metálica o de plástico, tal como un envase de burbuja. El envase o el dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

La cantidad de derivado N-metanocarba de AMP que se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables para producir una forma de dosificación única, variará dependiendo del hospedador tratado y del modo de administración particular. La cantidad terapéuticamente eficaz específica para un paciente en particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que experimenta la terapia. En algunos casos, pueden ser más adecuados niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo mencionado anteriormente, mientras que en otros casos dosis aún mayores se pueden emplear sin causar ningún efecto secundario perjudicial, siempre que tales niveles de dosis más elevadas se dividan primero en varias dosis pequeñas para administrar a lo largo del día. Las concentraciones de los compuestos descritos en el presente documento, que se encuentran en las composiciones terapéuticas, variarán dependiendo de una variedad de factores, incluyendo la dosificación del fármaco que se va a administrar, las características químicas (por ejemplo, hidrofobicidad) de los compuestos empleados y la vía de administración. En términos generales, el derivado N-metanocarba de AMP se puede proporcionar en una solución tampón acuosa fisiológica (por ejemplo, 1 cc) que contiene aproximadamente 0,2% p/v de compuesto para administración oral. Los intervalos típicos de dosis son aproximadamente 285 µg/kg de peso corporal por día en tres dosis divididas; un intervalo de dosis preferido es desde aproximadamente 42 µg/kg a aproximadamente 171 µg/kg de peso corporal por día. La dosificación preferida del fármaco que se va a administrar es probable que dependa de variables tales como el tipo y el grado de progresión de la enfermedad o el trastorno, el estado de salud general del paciente en particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado y la formulación del excipiente del compuesto y su vía de administración, así como otros factores, incluyendo la biodisponibilidad, que a su vez está influenciada por varios factores. Por ejemplo, si el compuesto se metaboliza en el hígado o se excreta en la bilis, algunos de los compuestos activos absorbidos desde el tracto gastrointestinal serán inactivados por el hígado antes de que puedan llegar a la circulación general y ser distribuidos a sus sitios de acción. No se cree que el derivado N-metanocarba de AMP estará sujeto a esta pérdida de primer paso. Además, debido a que este compuesto es polar y soluble en agua, se espera que tendrá un pequeño volumen de distribución, y por lo tanto se eliminará fácilmente a través del riñón. Por otra parte, la unión del presente compuesto a proteínas plasmáticas puede limitar su concentración libre en los tejidos y en su lugar de acción, ya que solo el fármaco no unido es el que equilibra a través de los sitios del receptor de membrana. Se prevé que el resto fosfato del presente compuesto pueda facilitar la unión del compuesto a las albúminas del plasma, que a su vez influyen en la cantidad de compuesto libre disponible para activar los receptores purinérgicos P2 de las células musculares. Sin embargo, se espera que dicha unión a proteínas plasmáticas no limite generalmente la secreción tubular renal de biotransformación, ya que estos procesos reducen la concentración de fármaco libre y esto está seguido rápidamente por la asociación de este complejo de fármaco-proteína. Otro factor que afecta a la biodisponibilidad es la distribución del compuesto en los tejidos. Dado el tamaño relativamente pequeño del compuesto y su solubilidad en agua, se prevé que el compuesto tendrá una segunda fase de distribución de fármaco relativamente rápida. Esta distribución se determina tanto por el flujo sanguíneo en el tejido particular del órgano, tal como el corazón, así como por la tasa con la que se difunde el compuesto en el compartimiento intersticial desde la circulación general a través del endotelio capilar altamente permeable (excepto en el cerebro). Debido a la hidrofilia relativa del compuesto, se prevé que no habrá ningún depósito tisular de grasa o de otros tejidos significativos que podrían estar considerados en una tercera fase de distribución-acumulación.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no restrictivos:

Ejemplos

55 Materiales y Métodos I

Aislamiento de miocitos ventriculares cardíacos adultos a partir de ratones WT y CSQ

Ratones que mostraban el modelo CSQ de miocardiopatía e insuficiencia cardíaca graves se criaron y se mantuvieron por métodos conocidos en la técnica. Los ratones transgénicos (TG) CSQ fueron proporcionados originalmente por el Dr. Larry Jones (Krannert Institute of Cardiology, Indiana University School of Medicine, Indiana), y desarrolla-

ron hipertrofia seguido de un fenotipo de insuficiencia cardíaca letal, con muerte a la edad de aproximadamente 3 meses. Los miocitos ventriculares se obtuvieron a partir de ratones de 3 meses de edad de tipo silvestre (WT) y ratones CSQ de ambos sexos (26 WT, 47 TG) mediante un procedimiento de disociación enzimática. Brevemente, los corazones fueron extirpados rápidamente a partir de ratones que habían sido anestesiados con pentobarbital y tratados con 1000 unidades de heparina. La aorta se canuló y el corazón se perfundió en un aparato Langendorff con solución oxigenada (95% de O₂/5% de CO₂) exenta de Ca²⁺ (37°C) durante 5 minutos a una velocidad de 2,5 ml/min. La composición de la solución era: NaCl 126 mM, KCl 4,4 mM, MgCl₂ 1,0 mM, NaHCO₃ 18 mM, glucosa 11 mM, HEPES 4 mM y BDM 3 mM (2,3-butanodiona monoxima) (pH 7,3 ajustado con NaOH). A continuación, la solución de perfusión se cambió a la que contenía CaCl₂ 25 µM y liberasa (70 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals, Inc.) durante 8-10 minutos. Las células se sedimentaron por gravedad durante 10-15 minutos y el sedimento se resuspendió en solución Tyrode que contenía Ca²⁺ 200 µM (que contenía BDM 3 mM), se dejó sedimentar durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se suspendió con solución Tyrode que contenía: NaCl 135 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,0 mM, MgCl₂ 1,0 mM, HEPES 10 mM y dextrosa 10 mM (pH 7,4 ajustado con NaOH). Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22-23°C) y se completaron 4-6 horas después del aislamiento de los miocitos.

Métodos celulares electrofisiológicos

La técnica de pinzamiento zonal ("patch-clamp") de células completas se utilizó para estos experimentos. Los electrodos se prepararon a partir de pipetas de borosilicato de vidrio (1,2 mm i.d.) con un procedimiento de extracción de dos etapas y se llenaron con solución de la pipeta. La pipeta se conectó a través de un alambre de Ag-AgCl a la etapa de toma de señal de un amplificador (List EPC-7, Medical Systems, Greenvale, NY) controlada por un ordenador y un programa informático Axon pClamp[®]. Para los experimentos de pinzamiento de voltaje, los electrodos se llenaron con una solución que contenía: aspartato de cesio 135 mM, NaCl 5 mM, Mg₂ATP 5 mM, HEPES 10 mM y EGTA 10 mM (pH 7,3 ajustado con CsOH) con o sin GDPβS 2 mM. Las resistencias de los electrodos eran 2-4 MΩ. En cuanto se estableció un contacto eléctrico, el medio de superfusión se cambió a una solución Tyrode modificada (el KCl 5,4 mM se omitió y se añadió CsCl 10 mM y ouabaina 5 µM a la solución Tyrode para bloquear las corrientes de K⁺ y la corriente de la bomba de Na/K, respectivamente). En la cuantificación de la corriente inducida por el agonista de P2, la solución Tyrode contenía la concentración indicada de cada agente. Al estudiar el efecto de un antagonista del receptor P2, el agonista y el antagonista se aplicaron conjuntamente a las concentraciones indicadas. El protocolo de pinzamiento de voltaje usado era un protocolo de tensión de rampa desde -100 mV de potencial de mantenimiento a +50 mV. El protocolo de rampa se aplicó a las células a intervalos de 20 s durante 1 minuto. Se promediaron tres trazas de corriente desde -100 mV a 50 mV para construir la relación I-V.

Inmunotransferencia

Se aislaron los corazones de ratones WT y CSQ de tres meses de edad, se secaron con papel secante, se pesaron y se homogeneizaron en tampón enfriado con hielo que contenía sacarosa 0,25 M, MOPS 10 mM, pH = 7,2 (16 ml por gramo de peso) utilizando un homogeneizador de tejidos (PowerGen Modelo 125, Fisher Scientific, Inc., Pittsburgh, PA). Después de solubilizar en tampón de la muestra, se llevaron a cabo el SDS-PAGE y la inmunotransferencia como se conoce en la técnica. Veinticinco µg de proteína homogeneizada se sometieron a electroforesis en cada pista del gel, usando 8% de poliacrilamida y se transfirieron a nitrocelulosa. Para la detección del receptor P2X₄, se empleó anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra una secuencia C-terminal única del receptor P2X₄ de rata (Alomone, Jerusalén, Israel), que reaccionaba de forma cruzada tanto con los receptores P2X₄ humanos como de ratón. La membrana se incubó con anticuerpo Ig anti-conejo acoplado a peroxidasa (1:5000) y se reveló con un kit ECL-Plus[®] (Amersham). El nivel de la proteína P2X₄R se cuantificó a través de un GelDoc 2000 de BioRad usando el "Discovery Series Quantity One" versión 4.5.2 (BioRad, Hercules, CA). La cantidad de proteína en cada banda era proporcional a la suma de la intensidad de todos los píxeles dentro del límite de la banda, multiplicada por el área de cada píxel. Se cargaron cantidades iguales de proteína en cada pista del gel, lo que se confirmó posteriormente mediante tinción Ponceau S de la transferencia y examinando con un anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad, contra los extremos carboxi de una amplia gama de isoformas de actina, como las β-actinas y las α-actinas (Actin, 1-19: sc-1616) (idéntica en humanos, rata y ratón).

Cuantificación del área de la sección transversal de los miocitos

El área de la sección transversal de los miocitos cardíacos se cuantificó por métodos conocidos en la técnica. Los corazones extirpados se fijaron en paraformaldehído al 4%, y se marcaron con aglutinina de germen de trigo conjugada con fluoresceína. Las microfotografías fueron tomadas en la pared ventricular medio izquierda como se ha descrito anteriormente. Las imágenes de la sección transversal de las células que mostraban consistentemente formas redondas, fueron capturadas con Macrofire[®] PictureFrame (Optronics, Goleta, CA) y el área de la sección transversal se midió con ImageProPlus[®] (MediaCybernetics, Silver Spring, MD). Típicamente, se determinaron y promediaron de 50 a 100 áreas de sección transversal por corazón.

MRS2339 y reactividad vascular

Aortas torácicas fueron extirpadas rápidamente de ratones de 8 a 10 semanas de edad de tipo silvestre (C57 BL6), se cortaron en anillos de 3 mm. Después de una constricción previa con fenilefrina (1 µM), se añadieron concentra-

ciones crecientes de acetilcolina o MRS2339 de manera acumulativa para lograr una curva de concentración-respuesta. El % de relajación se determinó como el % de disminución en la tensión del anillo (gramo) en comparación con la tensión antes de la adición de acetilcolina o MRS2339. Los datos se muestran como media \pm SEM.

Fármacos y Soluciones

- 5 2-Metiltoadenosina 5'-trifosfato (2-meSATP), Azul Brillante G (B. Blue G o BBG; ácido piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico y 2-metiltoADP (2-meSADP) se obtuvieron a partir de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). NF449, ácido 4,4',4''-4'''-[carbonilbis(imino-5,1,3-benzotriil-bis(carbonilimino))]tetrakis-1,3-bencenodisulfónico, era de Tocris Bioscience (Ellisville, MO). Tanto 2-meSATP como 2-meSADP se disolvieron justo antes de cada experimento. Las soluciones madre se prepararon en solución salina tamponada con fosfato, pH = 7,4, y se añadieron a la solución Tyrode para obtener las concentraciones deseadas. El derivado (N)-metanocarba de 2-cloroAMP, MRS2339 ((1' S, 2' R, 3' S, 4' R, 5' S)-4-(6-amino-2-cloro-9H-purin-9-il)-1-[fosforiloximetil]biciclo[3.1.0]hexano-2,3-diol)) y el antagonista del receptor P2Y₁, MRS2500 ((1' R, 2' S, 4' S, 5' S)-4-(2-yodo-6-metilamino-purin-9-il)-1-[(fosfato)-metil]-2-(fosfato)-biciclo[3.1.0]hexano)) se sintetizaron como se conoce en la técnica. Estos dos agentes purinérgicos P2 se caracterizaron en detalle anteriormente. MRS2339 se disolvió en solución salina tamponada con fosfato, pH = 7,4 a 3,3 μ M (200 μ l de volumen total), se filtró para esterilizar para la administración *in vivo* a 6 μ l por día durante 28 días mediante una minibomba osmótica (Alzet) implantada en los ratones CSQ. La longevidad de los animales a los que se había administrado MRS2339 o vehículo se determinó y la diferencia en la supervivencia se analizó mediante la prueba de rango logarítmico.

Datos

- 20 A menos que se indique lo contrario, los datos fueron proporcionados como media \pm error estándar de la media. Se utilizó la prueba t de Student para muestras apareadas o no apareadas para evaluar los efectos de las intervenciones experimentales; P < 0,05 se consideró como estadísticamente significativa.

Ejemplo 1: La corriente extracelular estimulada con 2-meSATP era mayor en los miocitos cardiacos CSQ que en los WT

- 25 La activación de un receptor P2X se estudió mediante la aplicación de 2-meSATP (3 μ M) durante 3-5 minutos a las células obtenidas a partir de ratones TG CSQ y de ratones WT, utilizando el protocolo de pinzamiento para la tensión de células completas. El pinzamiento para la tensión de rampa era de -100 a +50 mV. Una corriente extracelular estimulada con 2-meSATP se observó en los miocitos cardiacos WT (Figura 1), en consonancia con los resultados anteriores. La misma concentración de 2-meSATP (3 μ M) provocó una corriente similar que mostraba una relación lineal entre -100 y +50 mV y se invertía de entrada a salida en aproximadamente 0 mV en los miocitos cardiacos de corazones CSQ (Figura 1), de forma idéntica a lo que se encontró en el miocito cardiaco WT. Los miocitos CSQ eran más sensibles que los miocitos WT después de la exposición a 2-meSATP en la inducción de una corriente. En las células que mostraban una corriente inducida como respuesta a 2-meSATP, la amplitud de la corriente estimulada con 2-meSATP era significativamente mayor en las células procedentes de corazones CSQ que de corazones WT a -100 mV (Figura 1, P < 0,05). A -100 mV, la corriente estimulada por 2-meSATP era $-1,28 \pm 0,15$ pA/pF en miocitos CSQ (\pm SE, n = 15 células procedentes de 7 ratones) y $-0,91 \pm 0,09$ pA/pF en miocitos WT (N = 18 células procedentes de 10 ratones) (P < 0,05). Del mismo modo, a -90 mV y -80 mV, la corriente provocada por 2-meSATP también era mayor en miocitos CSQ que en miocitos WT (P < 0,05). Que la corriente estimulada con 2-meSATP mostrara una dependencia del voltaje similar y un potencial de inversión en miocitos cardiacos WT y CSQ, es consistente con la presencia de la misma corriente P2X en ambos miocitos WT y CSQ.

- Se llevó a cabo una caracterización farmacológica adicional de la corriente provocada por 2-meSATP. Se determinó la corriente provocada por 2-meSATP (3 μ M) de varios antagonistas de receptores P2X, PPADS (100 μ M), NF449 (300 nM) y azul brillante G (5 μ M). La pinza para la tensión de rampa oscilaba desde -100 a +50 mV. Los datos eran la media \pm SEM. PPADS: 4 células (de 6 ratones); NF449: 5 células (8 ratones); B. Azul G: 5 células (6 ratones). Los datos resumidos en la Figura 2 mostraban que PPADS era capaz de inhibir parcialmente la corriente inducida con 2-meSATP, mientras que el antagonista selectivo de P2X₁, NF449, o el antagonista selectivo de P2X₅ o P2X₇, Azul Brillante G (BBG) tenía muy poco efecto inhibitor sobre esta corriente. Los datos son consistentes con la teoría de que los receptores P2X₁, P2X₅ o P2X₇ homoméricos no están involucrados en la mediación de la corriente provocada por 2-meSATP.

- 50 Ejemplo 2: Función de la corriente cardíaca P2X en la insuficiencia cardiaca: efecto beneficioso de un agonista del receptor P2 resistente a la nucleotidasa en los ratones CSQ

- Mientras que la corriente P2X cardiaca aumenta en los miocitos defectuosos, su función moduladora de la progresión de la insuficiencia cardiaca es desconocida. Para adquirir conocimientos sobre esta cuestión, un agonista del receptor P2 resistente a la nucleotidasa, MRS2339, un derivado (N)-metanocarba de 2-cloroAMP, se sintetizó y se administró a los animales CSQ a través de una mini-bomba. MRS2339 se infundió como una solución estéril 3 μ M, con una tasa de aproximadamente 6 μ l por día durante 28 días. El método de prueba de rango logarítmico fue utilizado para analizar las curvas de supervivencia (P = 0,02). En comparación con los ratones CSQ (14 ratones) inyectados con vehículo, los ratones tratados con MRS2339 (15 ratones) tenían una esperanza de vida significativamente

más larga (prueba de rango logarítmico, $p = 0,02$; la mediana de la esperanza de vida era 115 días en los animales tratados con MRS2339 frente a los 73 días de los animales tratados con vehículo) (Figura 3). La mejora de la supervivencia estaba asociada con una reducción de la hipertrofia de los miocitos cardíacos, tal y como se reflejaba por un área de sección transversal menor en los ratones tratados con MRS2339 ($281 \pm 15 \mu\text{m}^2$, SE, $n = 6$ ratones), en comparación con los ratones tratados con vehículo ($358 \pm 28 \mu\text{m}^2$, $n = 6$ ratones, Figura 4) ($P < 0,05$). Del mismo modo, los animales tratados con MRS2339 mostraron una relación menor entre el peso del corazón/peso corporal (tratados con MRS2339: $10,5 \pm 1,38$, $n = 9$ corazones frente a testigos: $12,56 \pm 2,2$, $n = 23$ corazones, $P < 0,05$) (Figura 5). Todos los datos se proporcionaron como media \pm SD. Estos datos mostraron que este análogo de nucleótido, cuando se administra *in vivo*, puede rescatar el fenotipo hipertrófico cardíaco del ratón CSQ.

10 Ejemplo 3: Derivado N-metanocarba de 2-cloroAMP induce una corriente similar a P2X en el miocito cardíaco CSQ

Puesto que la hiperexpresión específica de miocitos cardíacos del receptor P2X₄ en los ratones CSQ también reducía la relación entre el peso del corazón/peso corporal y la hipertrofia de los miocitos cardíacos, un posible mecanismo por el cual MRS2339 podía rescatar el fenotipo hipertrófico de los ratones CSQ es su activación del receptor P2X en los miocitos cardíacos de estos animales. De hecho, este agonista del receptor P2 resistente a la nucleotidasa puede producir una corriente con una relación I-V similar e invertir el potencial como el agonista de P2X, 2-meSATP, tanto en miocitos cardíacos WT (Figura 6) como CSQ (Figura 7). Los miocitos ventriculares cardíacos se prepararon a partir de corazones WT y la corriente se midió por pinzamiento de voltaje en la configuración de célula completa (Figura 6). Los datos se mostraron como la densidad de corriente en pA/pF. Los datos eran media \pm SEM de 18 miocitos procedentes de 10 ratones para la corriente inducida con 2-meSATP y 7 miocitos procedentes de 4 ratones para la corriente inducida con MRS2339. Los miocitos ventriculares cardíacos se prepararon a partir de corazones CSQ y los efectos de MRS2339 y 2-meSATP sobre la corriente se midieron mediante pinzamiento de voltaje en la configuración de célula completa (Figura 7). La pinza para la tensión de rampa era de -100 a +50 mV. Las células se mantuvieron a -80 mV con protocolo de pinza para la tensión de rampa. Los datos se mostraron como la densidad de corriente en pA/pF. Los datos eran la media \pm SEM de 15 miocitos procedentes de 7 ratones para la corriente inducida con 2-meSATP y 8 miocitos procedentes de 5 ratones para la corriente provocada por MRS2339.

MRS2339 se caracterizó inicialmente como un agonista débil del receptor P2Y₁. Sin embargo, el antagonista potente selectivo del receptor P2Y₁, MRS2500, no podía bloquear la corriente provocada por 2-meSATP (Figura 8) o por MRS2339 (datos no mostrados). Los miocitos ventriculares cardíacos se prepararon a partir de corazones WT y el efecto de MRS2500 ($1 \mu\text{M}$) sobre la corriente provocada por 2-meSATP se midió por pinzamiento de voltaje en la configuración de célula completa. 2-meSATP estaba presente a $3 \mu\text{M}$. La pinza para la tensión de rampa era desde -100 a +50 mV, como se ha descrito en Métodos I. La corriente provocada por 2-meSATP era similar si MRS2500 estaba presente o no. Los datos se mostraban como densidad de corriente en pA/pF y eran la media \pm SEM de 4 miocitos de 4 ratones. Estos datos indican que no existe un papel del receptor P2Y₁ en la mediación del efecto de corriente cardíaca de 2-meSATP o MRS2339. El que 2-meSATP sea en algunos sistemas un antagonista del receptor P2Y₁, pero que fuera un agonista potente en la inducción de esta corriente, cuestiona adicionalmente un papel del receptor P2Y₁ en la mediación de esta corriente. Es posible que 2-meSATP sea degradado a 2-meSADP, lo que a su vez podría provocar una corriente a través de su activación de los receptores P2Y₁, P2Y₁₂ o P2Y₁₃, si estos receptores P2Y estaban de hecho presentes en el miocito cardíaco murino. Sin embargo, 2-meSADP $3 \mu\text{M}$ no inducía ninguna corriente en miocitos que mostraban una respuesta completa a 2-meSATP $3 \mu\text{M}$ (Figura 9), cuestionando adicionalmente un papel del receptor P2Y en la mediación del efecto de corriente de 2-meSATP. Por último, la presencia de GDP β S en la solución de la pipeta no afectaba a la capacidad de 2-meSATP para provocar la corriente (corriente sin GDP β S: $-0,908 \pm 0,09$ pA/pF y $1,1 \pm 0,175$ pA/pF a -100 y +50 mV, respectivamente, $n = 18$ miocitos procedentes de 22 ratones; corriente con GDP β S: $-0,877 \pm 0,198$ pA/pF y $0,85 \pm 0,193$ pA/pF a -100 y +50 mV, respectivamente, $n = 5$ miocitos procedentes de 7 ratones) ($P > 0,05$). Del mismo modo, la adición de GDP β S en la pipeta tampoco disminuía la corriente provocada por MRS2339. A -100 mV, la densidad de corriente era $-0,73 \pm 0,15$ pA/pF en ausencia de GDP β S ($n = 7$ células); con GDP β S, la densidad de corriente era $-0,66 \pm 0,10$ pA/pF ($n = 3$ células, $P > 0,1$ frente a sin GDP β S). A +50 mV, tampoco había ninguna diferencia en la densidad de corriente, si se había añadido GDP β S o no. Los datos cuestionan un papel de la proteína G o de los receptores P2Y acoplados a proteína G en la inducción de esta corriente.

50 Ejemplo 4: MRS2339 carece de efecto vasodilatador en una preparación de aorta de ratón

Puesto que MRS2339 es un análogo de nucleótido, puede tener en teoría un efecto vascular a través de la activación de cualquiera de los receptores P2Y o P2X vasculares. Un efecto vasodilatador arterial de MRS2339 descargaría el corazón defectuoso y explicaría potencialmente la disminución de la hipertrofia cardíaca y el aumento de la esperanza de vida de los animales CSQ. Utilizando una preparación de anillo de aorta torácica de ratón adulto, restringida previamente con fenilefrina, la acetilcolina era capaz de causar una relajación dependiente de la dosis de los segmentos de anillo (Figura 10). Se utilizaron siete segmentos de anillo procedentes de tres ratones. Los datos se mostraron como media \pm SEM. La acetilcolina causaba una relajación significativa y pronunciada, mientras que MRS2339 no provocó una relajación. En los mismos anillos de los vasos, MRS2339 no inducía una relajación con el mismo intervalo de concentraciones (10^{-9} a 10^{-5} M). Estos datos cuestionan un efecto vasodilatador de MRS2339 y hacen poco probable que la descarga vascular sea aquí un mecanismo beneficioso.

Ejemplo 5: Aumento de la expresión de receptores P2X₄ cardíacos endógenos en los ratones CSQ

Los receptores P2X₄ son una subunidad importante de los receptores P2X cardiacos naturales. El nivel de expresión proteica de este receptor en los corazones WT y CSQ se determinó por inmunotransferencia. Se cargaron cantidades idénticas de proteína en cada pista para cada anticuerpo utilizado. Los anticuerpos eran específicos del receptor P2X₄. La autorradiografía era típica de cuatro experimentos similares. El nivel de receptor P2X₄ era mayor en los corazones CSQ que en los WT (P<0,05, prueba t). La Figura 11 mostraba que el nivel de receptores P2X₄ cardiacos es mayor en los animales CSQ que en los WT (P <0,05). Los datos están en consonancia con un mayor nivel del receptor P2X natural en el corazón CSQ y pueden proporcionar una explicación para la corriente más elevada estimulada con 2-meSATP en estos miocitos cardíacos defectuosos.

Adicionalmente, los siguientes Ejemplos de Referencia, no de acuerdo con la invención, ilustran el mecanismo de mejora de la contractibilidad mediada por el receptor P2X.

Ejemplos de Referencia

Materiales y Métodos II

Aislamiento de miocitos ventriculares cardíacos de ratón adulto a partir de ratones Tg con receptor P2X₄

Los miocitos ventriculares se obtuvieron a partir de ratones Tg P2X₄R de tres meses de edad, mediante un procedimiento de disociación enzimática, tal y como se conoce en la técnica. Los corazones fueron extirpados rápidamente a partir de ratones que habían sido anestesiados con pentobarbital y tratados con 1000 unidades de heparina. La aorta se canuló y el corazón se perfundió en un aparato Langendorff con solución oxigenada (95% de O₂/5% de CO₂) exenta de Ca²⁺ (37°C) durante 5 minutos a una velocidad de 2,5 ml/min. La composición de la solución era: NaCl 126 mM, KCl 4,4 mM, MgCl₂ 1,0 mM, NaHCO₃ 18 mM, glucosa 11 mM, HEPES 4 mM y BDM 3 mM (2,3-butanodiona monoxima) (pH 7,3 ajustado con NaOH). A continuación, la solución de perfusión se cambió a la que contenía CaCl₂ 25 µM y liberasa (70 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals, Inc.) durante 8-10 minutos. Las células se expusieron a continuación a un aumento gradual de calcio extracelular desde 0,025, 0,2 y luego 1,0 mM, se dejaron sedimentar durante 30 minutos a temperatura ambiente, y finalmente se suspendieron con solución Tyrode que contenía: NaCl 135 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,0 mM, MgCl₂ 1,0 mM, HEPES 10 mM y dextrosa 10 mM (pH 7,4 ajustado con NaOH). Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22-23°C) y se completaron 4-6 horas después del aislamiento de los miocitos.

Estimación del contenido en Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (RS)

El contenido en Ca²⁺ del RS se obtuvo a partir de experimentos con cafeína. Este alcaloide no solo libera Ca²⁺ del RS, sino que también impide su recaptación. Tres estímulos condicionantes de 300 ms (-80 a +50 mV) a 0,2 Hz se aplicaron a las células. Dos segundos después del último estímulo, se aplicó cafeína 10 mM rápidamente con una pipeta de perfusión introducida 50 µm en la célula del ensayo. Con la membrana mantenida a -80 mV, el Ca²⁺ liberado por la cafeína induce una gran corriente de entrada a través del intercambiador Na/Ca. La integración de esta corriente de entrada proporciona una estimación del contenido en Ca²⁺ en el RS. La referencia de la corriente se definió como la medida a ~2500 ms desde la corriente pico y se utilizó para la integración de una corriente transitoria. Después de una prueba testigo con cafeína, se aplicó 2-meSATP (3 µM) durante 3 minutos y la cafeína se perfundió de nuevo rápidamente. Los datos se tomaron solo a partir de aquellas células que se habían podido mantener durante el período testigo, en presencia de 2-meSATP y después del lavado. La corriente de entrada a través del intercambiador Na/Ca, inducida con cafeína se ha utilizado anteriormente para estimar el contenido en Ca en el RS en miocitos ventriculares de ratón adulto.

Ligadura de LAD e inducción de un infarto de miocardio

La ligadura de LAD en ratones anestesiados se llevó a cabo usando procedimientos similares a los descritos previamente en la técnica. Ratones adultos WT (BL6) o Tg P2X₄R de 12-14 semanas de edad de ambos sexos fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg) por vía intraperitoneal. Bajo un microscopio de disección, los ratones se colocaron en posición supina sobre una almohadilla térmica para mantener la temperatura corporal a 37°C. Después de una intubación endotraqueal, la cánula se conectó a un pequeño ventilador para roedores (Aparato Hugo Sachs-Harvard, MiniVent Tipo 845, Holliston, MA) con aire ambiente con un volumen sistólico de 0,3 ml a una velocidad de 160 por min. Se realizó una toracotomía intercostal izquierda y el infarto de miocardio fue producido mediante la ligación de la arteria coronaria descendente anterior con una sutura de nilón de 8-0, 2 mm por debajo del borde de la aurícula izquierda, cerca de la salida de la arteria. La ligación se consideró exitosa cuando la pared anterior izquierda se volvió pálida y la ligación pretendía inducir un infarto con un tamaño del 30-40%. Los animales se utilizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por "Institutional Review Board at University of Connecticut School of Medicine".

Mediciones de la función cardiaca intacta, área de la sección transversal de miocitos, nivel de AMP cíclico y tamaño del infarto

Diversos parámetros de la función cardiaca intacta, como la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (LVDP), las tasas de contracción y relajación (±dP/dt), se determinaron cuantitativamente usando el modelo de corazón en funcionamiento como se ha descrito en la técnica. En resumen, la aorta se canuló con un catéter de calibre 20, colo-

5 cado aproximadamente 2 mm por encima de la ostia coronaria y una columna de tampón KHS producía una presión hidrostática constante de 55 mmHg. La abertura de la vena pulmonar se conectó a través de un catéter PE-50 a un depósito de tampón KHS que mantenía un flujo de "retorno venoso" en la aurícula izquierda de aproximadamente 5 ml/min en el estado de reposo. La presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (LVDP) era la diferencia entre las presiones LV sistólica y diastólica. La frecuencia cardíaca basal se determinó en ausencia de estimulación.

10 El área de la sección transversal de un miocito cardíaco se cuantificó de acuerdo con un método descrito previamente. Las microfotografías fueron tomadas en la pared ventricular medio-izquierda como se ha descrito anteriormente. Las imágenes de las células en sección transversal fueron capturadas con Macrofire® PictureFrame (Optronics, Goleta, CA) y el área de la sección transversal se midió con ImageProPlus® (MediaCybernetics, Silver Spring, MD). Típicamente, por cada corazón se determinaron y promediaron 100 áreas de sección transversal.

15 El AMP cíclico se determinó con un kit de inmunoensayo enzimático (EIA, kit Direct Biotrak EIA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El método ha sido utilizado para estimar el nivel de AMPc en miocitos ventriculares cardíacos dispersos de mamífero. Brevemente, miocitos Tg P2X₄R de 3 meses se aislaron y se sembraron en una placa de 96 pocillos recubierta con laminina, a una densidad de 1000 células/pocillo, se equilibró durante 1 hora a 37°C, se incubó con solución salina tamponada con fosfato (pH = 7,4) o con 2-meSATP 10 µM durante 10 minutos, y se procesó para la acetilación y la posterior EIA del AMPc. Los niveles de AMPc se normalizaron con respecto a las proteínas en cada pocillo individual.

20 El tamaño del infarto se cuantificó como se conoce en la técnica. Después de la fijación en formol al 10%, el ventrículo izquierdo se cortó en cinco secciones transversales desde el ápice hacia la base. Las secciones se incluyeron en parafina, se cortaron en rodajas de 4 µm y se tiñeron con Masson tricrómico para medir el área de fibrosis (miocardio infartado). Las longitudes de las superficies endocárdicas y epicárdicas infartadas y no infartadas se trazaron con un analizador de imágenes planímetro (ImageProPlus®). El tamaño del infarto se calculó como la relación entre la longitud del infarto y la circunferencia del endocardio y del epicardio.

Ecocardiografía

25 La ecocardiografía transtorácica se realizó empleando un transductor lineal de 30 MHz de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Vevo 660 Sistema de formación de imágenes de alta resolución de VisualSonics, Toronto, Canadá). Los ratones fueron anestesiados con isoflurano al 1% usando un vaporizador. Se midieron los diámetros diastólicos finales del ventrículo izquierdo (LVEDD) y sistólicos finales del ventrículo izquierdo (LVESD), el grosor de la pared posterior y septal diastólico final y sistólico final.

30 Determinación del acortamiento de la contracción y transitorios de calcio en miocitos cardíacos aislados.

35 El acortamiento de la contracción de miocitos (CS) por cambios en la longitud del sarcómero y transitorios Ca²⁺ se registró a partir de miocitos aislados individuales, utilizando microscopía invertida de epifluorescencia con el programa informático Ionoptix y una cámara (Ionoptix, Milton, MA, EE.UU.). Los miocitos se colocaron en una cámara de perfusión fijados a la platina del microscopio invertido (Zeiss IM). Las células se perfundieron con solución Tyrode a 25°C. Los miocitos se estimularon con campos con series constantes de estímulos a las frecuencias indicadas. Se determinó la longitud del sarcómero dentro de la ventana determinada por el usuario. El acortamiento de la contracción se determinó como la diferencia entre la longitud sistólica pico y la longitud diastólica máxima. Los transitorios Ca²⁺ se midieron utilizando el colorante radiométrico, fura-2 AM. Los miocitos se cargaron con 2 mM de fura-2 AM durante 20 minutos a 25°C. Las células se separaron de la solución que contenía fura-2-AM mediante sedimentación y resuspensión en solución Tyrode exenta de fura-2 que contenía Ca²⁺ 0,1 mM durante 20 minutos para la desesterificación. Los transitorios Ca²⁺ se registraron como la relación entre la fluorescencia a 510 nm como respuesta a la excitación entre 340 y 380 nm. Los transitorios Ca²⁺ se digitalizaron y se analizaron. Los transitorios Ca²⁺ y la CS se midieron simultáneamente en los mismos miocitos.

Fármacos y soluciones

45 2-Metiloadenosina 5'-trifosfato (2-meSATP) y ATP se obtuvieron a partir de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). Fura-2 AM se obtuvo de Molecular Probes (Eugene, OR) y se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para medir la concentración de calcio intracelular. Las soluciones madre se prepararon en solución salina tamponada con fosfato, pH = 7,4, y se añadieron a la solución Tyrode para obtener las concentraciones deseadas. El kit cyclicAMPc EIA era de GE Healthcare (Piscataway, NJ). La estructura artificial transgénica P2X₄R se generó subclonando un fragmento Hind III de 1,8 kb del ADNc del receptor P2X₄ humano (hP2X₄R) en el sitio Hind III del vector de expresión α-MyHC y se dividió en ratones B6SJL.

Datos

55 A menos que se indique lo contrario, los datos fueron proporcionados como media ± error estándar de la media. Se utilizó la prueba t de Student para muestras apareadas o no apareadas para evaluar los efectos de las intervenciones experimentales; P < 0,05 se consideró como estadísticamente significativa.

Ejemplo 6: El aumento de la contractilidad de los miocitos mediado por el receptor P2X cardíaco se asocia con un

aumento concomitante de los transitorios de calcio intracelulares

Miocitos cardiacos Tg P2X₄R mostraron un aumento significativo del grado de acortamiento de la contracción (CS) como respuesta a 2-meSATP extracelular a 0,2, 0,5 y 1,0 Hz (Figura 12) (a 0,2 Hz, basal = 0,087 ± 0,011 μm frente a 2-meSATP = 0,116 ± 0,011 μm, p <0,01 prueba t pareada, n = 9 miocitos de 8 ratones; a 1,0 Hz, basal = 0,038 ± 0,007 μm frente a 2-meSATP = 0,052 ± 0,01 μm, p <0,05). En consonancia con una relación fuerza-frecuencia negativa en los miocitos cardiacos adultos murinos, el grado de CS se redujo en condiciones basales y de estimulación con 2-meSATP (Figura 13). El aumento mediado por el receptor P2X de la CS estaba asociado con un aumento de los transitorios de calcio intracelulares, determinado como proporciones de fluorescencia a varias frecuencias de estimulación (Figuras 12 y 13) (a 0,2 Hz, proporción de fluorescencia basal = 0,66 ± 0,12 frente a la proporción en presencia de 2-meSATP = 0,81 ± 0,13, P<0,01, prueba t emparejada, 9 miocitos; a 1,0 Hz, basal = 0,45 ± 0,081 frente a 2-meSATP = 0,51 ± 0,08, P<0,05). El gráfico del cambio de la fluorescencia de calcio frente al de CS en ausencia de agonista de P2X, era superponible al gráfico obtenido en presencia del agonista (Figura 14). La pendiente sin 2-meSATP extracelular (0,21 ± 0,036) era similar a la que se obtenía con 2-meSATP (0,20 ± 0,02, P> 0,1). Los datos eran la media ± SEM. Los datos sugieren que el aumento inducido por el agonista de la contractilidad de los miocitos no era debido a un aumento de la sensibilidad al calcio intracelular.

Ejemplo 7: Efecto estimulador de 2-meSATP extracelular sobre el contenido en calcio del RS en miocitos Tg P2X₄R

El aumento mediado por el receptor P2X de transitorios de calcio puede ser el resultado de un almacenamiento mejorado del calcio en el RS durante la activación del receptor. Para probar esta hipótesis, se utilizó $I_{Na/Ca}$ de entrada inducida con cafeína para determinar el contenido en calcio del RS en ausencia y presencia de agonista de P2X. La Figura 15 mostraba que la presencia de 2-meSATP extracelular causaba un aumento significativo de la corriente de entrada inducida con cafeína (P <0,05, n = 14 miocitos Tg). El aumento era significativo tanto con la corriente de entrada $I_{Na/Ca}$ pico (Figura 16) como con la integrada (Figura 17) (P <0,05 frente al nivel testigo basal). El efecto del agonista del receptor P2X se dispó después de un lavado. El aumento de la $I_{Na/Ca}$ de entrada mediada con cafeína a través de 2-meSATP en miocitos Tg P2X₄R, no se debía a un incremento de la densidad del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ en el miocito Tg, ya que las corrientes $I_{Na/Ca}$ pico e integrada en condiciones basales exentas de agonista en las células TG (-0,66 ± -0,08 pA/pF y -1,24 ± -0,27 pA *ms/pF respectivamente, n = 14 miocitos) eran similares a las de las células NTG (-0,66 ± -0,09 pA/pF y -1,25 ± -0,28 pA *ms/pF, P> 0,1). Además, la relación entre el peso del corazón/peso corporal y las áreas de sección transversal de los miocitos cardiacos eran similares en células Tg y NTG (datos no mostrados). Este hallazgo cuestionaba la posibilidad de que una variación en el tamaño de los miocitos pudiera haber causado un aumento de la $I_{Na/Ca}$ inducida con cafeína en las células Tg frente a las NTG. El aumento de la $I_{Na/Ca}$ inducida con cafeína a través del agonista de P2X, se debe probablemente a una mayor carga del RS con Ca²⁺ en los miocitos Tg.

El incremento mediado por el receptor P2X de la contractilidad de los miocitos o de transitorios de calcio se produjo en ausencia de cualquier acumulación de AMP cíclico (AMPC) en el miocito P2X₄R Tg. 2-meSATP no causó ningún aumento en el nivel de AMP cíclico intracelular en las células Tg (basal: 3,97 ± 0,33 pmol/mg de proteína frente a 2-meSATP a 10 μM: 3,18 ± 0,45 pmol/mg, P> 0,1; isoproterenol: 16,6 ± 1,53 pmol/mg, p <0,05 frente a basal o 2-meSATP, n = 12 determinaciones de miocitos de tres ratones Tg). Para la comparación, 2-meSATP tampoco estimuló ninguna acumulación de AMPC en los miocitos cardiacos de tipo silvestre (WT) (datos no mostrados). Un estudio previo mostraba que la activación del receptor P2X cardiaco natural en las células WT o del receptor P2X₄ hiperexpresado en las células Tg, no estimulaba o inhibía el canal de calcio de tipo L. La falta de cualquier efecto estimulador de 2-meSATP sobre la acumulación de AMPC es compatible con su falta de estimulación del canal de calcio tipo L, dado el conocido efecto del AMPC sobre la actividad de los canales de calcio de tipo L. En conjunto, los datos mostraron que la activación del receptor P2X cardiaco puede aumentar la acumulación de calcio en el RS y el nivel de calcio intracelular con un estado contráctil mejorado del miocito, de una manera independiente del AMPC.

Ejemplo 8: Hiperexpresión específica cardiaca del receptor P2X₄ incrementaba la supervivencia después de un infarto de miocardio inducido por una ligadura de LAD

La hiperexpresión del receptor P2X₄ era capaz de prolongar la esperanza de vida y rescatar el modelo de calsecuena de miocardiopatía grave. Este efecto beneficioso se asoció con una mejora mediada por el receptor P2X del rendimiento cardiaco. Puesto que el receptor P2X cardiaco puede inducir un aumento en el contenido de calcio en el RS y causar un rendimiento cardiaco mejorado, el receptor puede tener un papel beneficioso generalizado en diferentes modelos de insuficiencia cardiaca. Esta hipótesis es compatible con las observaciones de que los miocitos cardiacos humanos defectuosos mostraban una disminución del almacenamiento de calcio en el RS y de que el restablecimiento de este contenido estaba correlacionado con la recuperación de la función cardiaca durante la implantación de un dispositivo de asistencia ventricular en los pacientes. Para probar un potencial efecto beneficioso generalizado de la activación de P2X₄R en la insuficiencia cardiaca, se indujo una cardiopatía isquémica mediada por la ligadura de LAD en ratones WT y P2X₄R Tg. Todos los animales que se recuperaron totalmente de la anestesia y que vivieron durante 24 horas fueron analizados para estudiar la supervivencia. La supervivencia postoperatoria se controló durante 4 meses. La supervivencia postinfarto general mejoró más significativamente en los ratones P2X₄R Tg que en los ratones WT (Figura 18). Los tamaños del infarto eran similares en los dos grupos (WT: 38 ± 2% de infarto, n = 25 frente a P2X₄R Tg: 34 ± 1,7%, n = 33, p = 0,12). La mejora de la supervivencia después de un infarto se debió a una menor incidencia de muerte durante los primeros 7-10 días después de la ligadura de LAD.

Ejemplo 9: Mejora del rendimiento cardíaco en ratones P2X₄R Tg después de un infarto de miocardio

Para caracterizar adicionalmente el efecto de la hiperexpresión del receptor P2X₄ después de un infarto, se examinó la función cardíaca en ratones Tg P2X₄R con ligadura de LAD. Siete días después del infarto, los ratones Tg P2X₄R mostraron una presión desarrollada en el ventrículo izquierdo mejorada (LVDP) (Figura 19), +dP/dt (Figura 20) y -dP/dt (Figura 21) en una preparación de corazón aislado en funcionamiento.

El efecto beneficioso de la hiperexpresión del receptor P2X₄ se asoció con una disminución de la relación entre peso del corazón/peso corporal (Figura 22), así como un área reducida de la sección transversal del miocito cardíaco, medida 7 días después del infarto de miocardio (área de miocito WT = $191 \pm 21 \mu\text{m}^2$, SD, n = 18 ratones frente al área de miocito Tg P2X₄R = $142,5 \pm 27 \mu\text{m}^2$, n = 17 ratones, P<0,0001). Por lo tanto, una mejora de la función contráctil estaba asociada con una disminución del nivel de hipertrofia cardíaca a corto plazo, 7 días después del infarto de miocardio.

Se investigó si el rendimiento contráctil cardíaco se mantenía 2 meses después del infarto. Mediciones ecocardiográficas se llevaron a cabo para determinar la función cardíaca *in vivo*. Los parámetros ecocardiográficos de referencia, tales como LVIDd y LVIDS (dimensión interna del ventrículo izquierdo en diástole y en sístole respectivamente), LVPW (grosor de la pared posterior ventricular izquierda) e IVS (grosor del septum), eran similares entre animales Tg P2X₄R y NTG (P > 0,1). Las relaciones de referencia entre el peso del corazón/peso corporal, las áreas de sección transversal de los miocitos cardíacos y las longitudes celulares también eran similares en los ratones Tg frente a NTG (P > 0,1). Estos datos sugieren un fenotipo cardíaco de referencia normal de los animales Tg P2X₄R, lo que es compatible con los hallazgos anteriores. Sin embargo, la FS medida mediante ecocardiografía era significativamente mayor en corazones Tg ($34,3\% \pm 1,5\%$, n = 8 ratones) que en NTG ($29,3\% \pm 1,2\%$, n = 8, p = 0,02), lo que indica una función contráctil sistólica basal mejorada de los ratones Tg.

Dos meses después del infarto, los corazones Tg mostraron un mayor engrosamiento sistólico de LVPW, lo que representa una región no infartada, que los animales NTG (P < 0,05) (Figura 23). Entre los ratones que tenían mediciones ecocardiográficas, el tamaño del infarto era mayor en ratones Tg ($39,9 \pm 2,66$, n = 10) que en NTG ($30,2 \pm 2,4\%$, n = 9, P < 0,05). Por lo tanto, a pesar del mayor tamaño del infarto en los animales Tg P2X₄R con ligadura de LAD, los corazones Tg mostraron una mejoría en el engrosamiento sistólico de la LVPW no infartada. La diferencia absoluta entre la LVIDd y las LVIDs en mm era significativamente mayor en animales Tg que NTG (Figura 24), lo que refleja un mayor grado de disminución de la LVID durante la sístole en los corazones Tg P2X₄R. Cuando la fracción de acortamiento (FS) se normalizaba con el tamaño del infarto mediante la obtención del producto de FS y el % de infarto, los corazones Tg mostraron un mayor acortamiento normalizado (Figura 25). Finalmente, los corazones Tg mostraron una LVIDd similar ($4,59 \pm 0,13$ mm, n = 10) a la de los ratones NTG ($4,46 \pm 0,12$ mm, n = 9, P > 0,1) a pesar de que los corazones Tg habían sufrido un infarto mayor. Aunque los corazones Tg P2X₄R no mostraron un aumento de la LVDP o +dP/dt, 2 meses después del infarto en un modelo aislado *in vitro* de corazón en funcionamiento (datos no mostrados), una mejora del rendimiento contráctil cardíaco *in vivo* en corazones Tg postinfarto, es consistente con su mayor función contráctil basal que se conservó después del infarto.

Ejemplo 10: Supervivencia mejorada con MRS2339 después de un infarto de miocardio inducido con ligadura de LAD

La miocardiopatía isquémica mediada por la ligadura de LAD fue inducida en ratones WT (Figura 26). Dos días después del infarto, se trataron 15 ratones con MRS3229 y se trataron 19 ratones con NS (solución salina normal como vehículo testigo). MRS2339 se infundió como una solución estéril 3 μM , a una tasa de aproximadamente 6 μl por día durante 28 días. En contraste con NS, MRS3229 aumentaba la supervivencia postinfarto hasta más del 95% hasta 60 días después del infarto. El protocolo era similar a los descritos anteriormente, excepto que se indujeron infartos en ratones WT a través de la misma ligadura de LAD y luego fueron tratados con MRS2339 utilizando la misma dosis y vía de administración que en el ejemplo 2. P < 0,05 por la prueba de rango logarítmico.

Ejemplo 11: Medición de las funciones cardíacas en preparaciones de corazón intactas

Después de la inyección de heparina a través de vena de la cola (500 U/kg, iv) y la anestesia con nembutal (125 mg/kg para ratas y 150 mg/kg para ratones, ip) por vía intraperitoneal, se extirpó el corazón con todos los grandes vasos y con los pulmones unidos. A continuación, la aorta se canuló con un catéter de calibre 20, se colocó aproximadamente 2 mm por encima de la ostia coronaria. Según el método de Langendorff, se insertó un globo de látex lleno de agua (tamaño n° 3) en el lumen del ventrículo izquierdo a través de la aurícula izquierda. El extremo distal del catéter fijado al globo se conectó a un transductor de presión para medir la presión intraventricular y \pm dP/dt. El globo se infló hasta una presión diastólica mantenida constantemente de 5-7 mmHg. La perfusión retrógrada a través de la aorta se llevó a cabo mediante una bomba de perfusión que mantenía una columna de solución Krebs-Henseleit (KHS; compuesta, en mM, por NaCl 120, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, EDTA 0,5, NaHCO₃ 25, piruvato 2 y glucosa 11, pH = 7,4, a continuación gasificación con 95% de O₂ - 5% de CO₂ a 37°C) para proporcionar una presión de perfusión coronaria constante de 65 mmHg. La presión de perfusión coronaria fue confirmada con un transductor de presión conectado a través de un puerto lateral a la cánula de perfusión de la aorta. Los fármacos se añadieron en el tampón KHS y se infundieron a través de perfusión retrógrada de la arteria coronaria.

Para el modelo de corazón en funcionamiento, una columna de tampón KHS producía una presión hidrostática constante de 65 mmHg (para ratas) o 55 mmHg (para ratones). La abertura de la vena pulmonar estaba conectada a través de un catéter PE-90 (para ratas) o PE-50 (para ratones) con un depósito de tampón KHS que mantenía un flujo de "retorno venoso" en la aurícula izquierda de aproximadamente 12 ml/min (rata) o 5 ml/min (ratones) en estado de reposo. El retorno venoso se mantuvo mediante un nivel constante de presión hidrostática (7-8 mmHg), produciendo una tasa constante de retorno venoso. A continuación, el tampón KHS de entrada se cambió de perfusión retrógrada a anterógrada y produjo una preparación de corazón en funcionamiento. El perfundido salía del ventrículo izquierdo a través de la cánula de la aorta, que estaba conectada a la columna aórtica de tampón KHS con una presión hidrostática de 55 mmHg (para ratones) o 65 mmHg (para ratas). El flujo aórtico era la cantidad de perfundido que salía de la cánula aórtica medido en milímetros por minuto. El flujo coronario, en milímetros por minuto, se recogió a través de la abertura de la arteria pulmonar. La suma del flujo aórtico y del flujo coronario era el gasto cardíaco. Un catéter de calibre 23 se insertó en el ventrículo izquierdo y su extremo distal se conectó con un transductor de presión para registrar las presiones ventriculares izquierdas y $\pm dP/dt$. La presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (LVDP) era la diferencia entre la presión LV sistólica y diastólica. Un puerto lateral del depósito permitía la infusión directa del agonista beta-adrenérgico, isoproterenol o del agonista del receptor P2X, 2-meSATP, en el tampón KHS que entraba en el ventrículo izquierdo a través de la aurícula izquierda, que luego entraba en la circulación coronaria después de la expulsión en la aorta del líquido de perfusión que contenía el fármaco en la aorta.

Los registros de la presión se canalizaron desde amplificadores que se habían calibrado previamente mediante un simulador/calibrador transductor (Ken Scientific Corp., Litchfield, CT). Las señales se digitalizaron a continuación, a través de una tarjeta de interfaz PCM-DAS 16S/330 (Computer Boards, Inc., Mansfield, MA), que proporcionaba un alto nivel de rendimiento con canales de entrada analógicos y canales digitales. Los datos se analizaron mediante programas informáticos (Workbench para Windows+, Kent Scientific Corp) diseñados para un ordenador compatible con IBM (Dell). Las señales amplificadas y digitalizadas de los transductores se mostraban y analizaban constantemente. La adquisición de datos, la visualización de la señal (presiones LV, $\pm dP/dt$, frecuencia cardíaca), y los programas de análisis de datos se realizaron simultáneamente desde el disco duro del ordenador. Los puntos de datos en cada estado basal y durante la infusión de cada concentración de fármaco, se resumieron como medias \pm SE. Los datos obtenidos con y sin fármaco se analizaron mediante la prueba t pareada para estudiar posibles diferencias estadísticamente significativas. Al comparar los efectos entre los grupos tratados con dos agonistas diferentes o en diferentes estados, se utilizó la prueba t no apareada.

Los datos se obtuvieron para los corazones de ratón CSQ (Figura 27) y WT (Figura 28). MRS2339 aumentaba $+dP/dt$ en los corazones CSQ y WT. Se espera que los derivados N-metanocarba de AMP, tales como MRS2339 también incrementen $-dP/dt$, ya que muchos compuestos que incrementan $+dP/dt$ también aumentan la $-dP/dt$.

Ejemplo 12: El metoprolol incrementa la esperanza de vida en ratones transgénicos binarios receptor P2X₄/CSQ

El metoprolol, un bloqueador de los receptores beta-adrenérgicos, se disolvió en agua potable a una concentración de 2 mg/ml. Ratones transgénicos binarios receptor P2X₄/CSQ fueron alimentados con agua potable normal (n = 8 ratones) o agua potable que contenía metoprolol (n = 8 ratones) (Figura 29). Los ratones tratados con metoprolol mostraron una esperanza de vida media de 491 días, mientras que los ratones tratados con agua potable normal tenían una esperanza de vida media de 231 días. La prueba de rango logarítmico mostró que la diferencia en la supervivencia era altamente significativa con P = 0,0028. Debido a que la hiperexpresión de los receptores P2X₄ rescataba los ratones calsecuestrina de una manera similar a MRS2339, la administración de un bloqueador beta tal como metoprolol con MRS2339 u otro agonista de los receptores P2X, debe aumentar sinérgicamente la esperanza de vida.

Se ha observado en este documento que los derivados N-metanocarba de AMP son agonistas de los receptores P2X, y no de los receptores P2Y como se creía anteriormente. El derivado N-metanocarba de AMP conocido como MRS2339, es útil en el tratamiento de la hipertrofia cardíaca y es particularmente ventajoso ya que puede mejorar el rendimiento contráctil cardíaco, aumentar la supervivencia, funcionar de una manera independiente del AMP cíclico.

El término "o" significa "y/o". Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" han de ser consideradas como expresiones abiertas (es decir, que significan "que incluye, pero no limitado a"). La enumeración de intervalos de valores pretende servir simplemente como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor por separado que está dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor por separado se incorpora en la memoria descriptiva como si fuera enumerado individualmente en el presente documento. Los valores máximos o mínimos de todos los intervalos se incluyen dentro del intervalo y de forma independiente combinable. Todos los métodos descritos en este documento se pueden realizar en un orden adecuado a menos que se indique lo contrario en este documento, o se contradiga claramente por el contexto. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o del lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como"), está destinado únicamente a ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación del alcance de la invención, a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debería interpretarse como una indicación de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la puesta en práctica de la invención, tal como se utiliza en el presente documento.

Los compuestos químicos se describen utilizando la nomenclatura convencional. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

5 Todas las formas (por ejemplo, solvatos, isómeros ópticos, formas enantiómeras, polimorfos, compuestos y sales libres) de un agente activo se pueden emplear solas o en combinación.

10 "Sales farmacéuticamente aceptables" incluye derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto original se modifica volviéndolo inorgánico y orgánico, no tóxico, sales de adición de ácido o base de los mismos. Las sales de los presentes compuestos se pueden sintetizar a partir de un compuesto original que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar formas ácidas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como hidróxido, carbonato o bicarbonato de Na, Ca, Mg o K), o haciendo reaccionar las formas básicas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Tales reacciones se llevan a cabo típicamente en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo, cuando sea posible. Las sales de los presentes compuestos incluyen además solvatos de los compuestos y de las sales de los compuestos.

20 Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, sales ácidas minerales u orgánicas de residuos básicos tales como aminas; y sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales y las sales de amonio cuaternario del compuesto original formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, las sales de ácido no tóxicas convencionales incluyen las obtenidas a partir de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico y nítrico; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, mesílico, esílico, besílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluensulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isetiónico, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ en donde n es 0-4. Listas de sales adecuadas adicionales pueden encontrarse, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., pág. 1418 (1985).

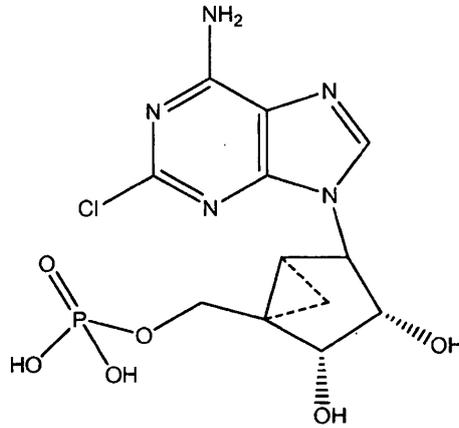
25 Se pueden realizar muchas modificaciones para adaptar una situación o material particular a las enseñanzas de la invención sin apartarse del alcance esencial de la misma. Sin embargo, la invención incluirá todas las realizaciones que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

30

REIVINDICACIONES

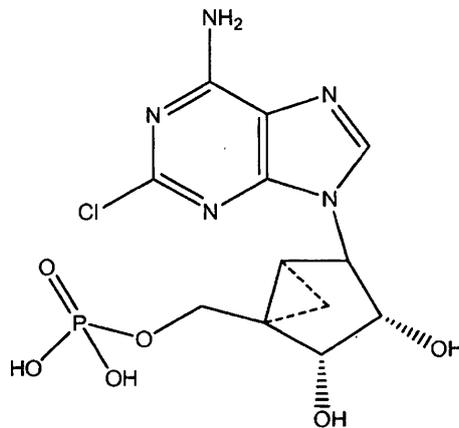
1. Un medicamento para emplear en el tratamiento de un sujeto mamífero que requiere tratamiento de una hipertrofia cardiaca, que comprende

una cantidad de un derivado N-metanocarba de AMP de fórmula



5 eficaz para el tratamiento de la hipertrofia cardiaca.

2. Uso de un derivado N-metanocarba de AMP de fórmula



en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de un sujeto mamífero que requiere tratamiento de una hipertrofia cardiaca.

Figura 1

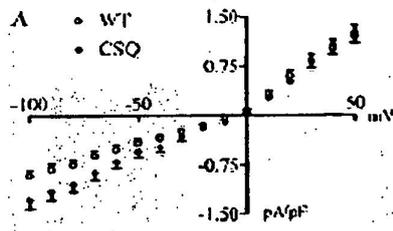


Figura 2

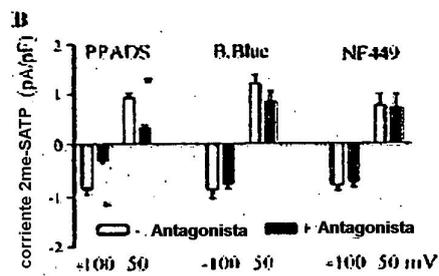


Figura 3

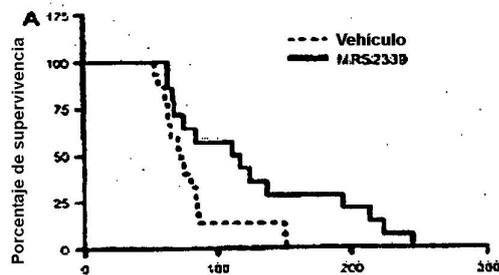


Figura 4

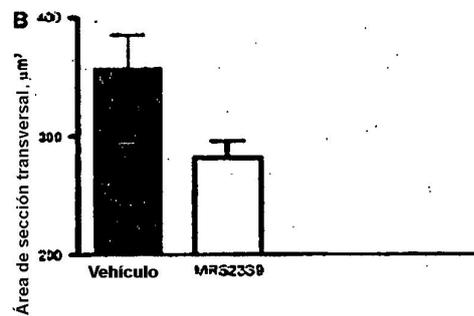


Figura 5

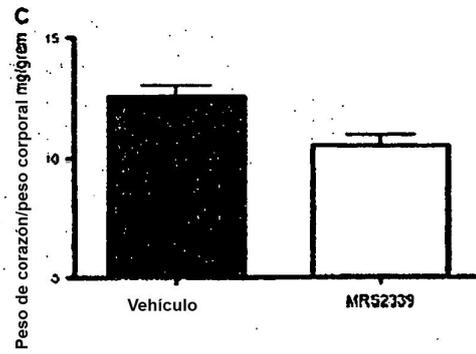


Figura 6

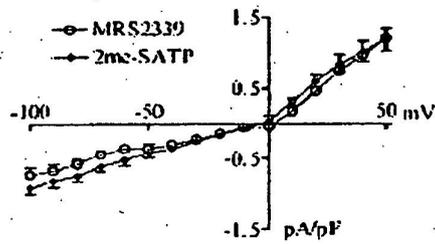


Figura 7

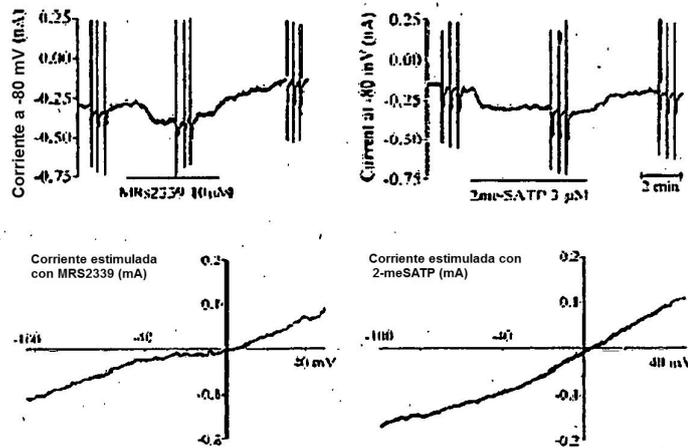


Figura 8

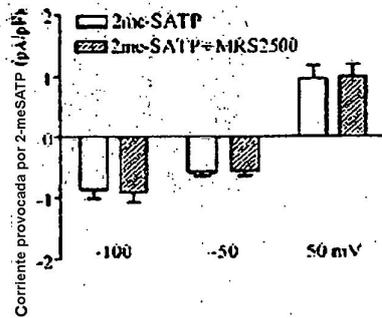


Figura 9

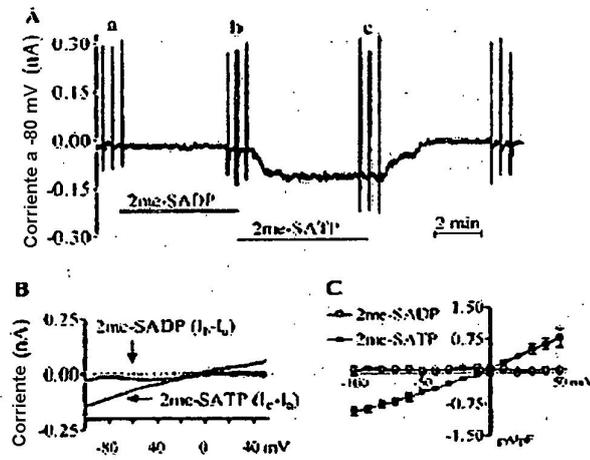


Figura 10

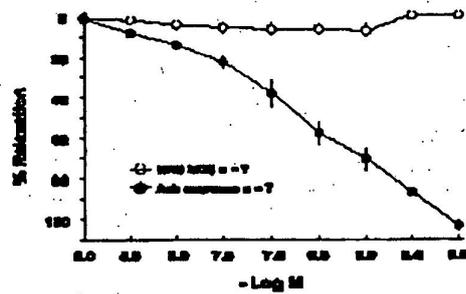


Figura 11

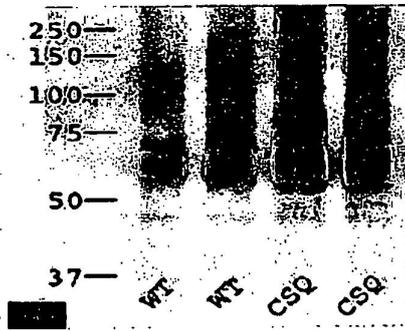


Figura 12

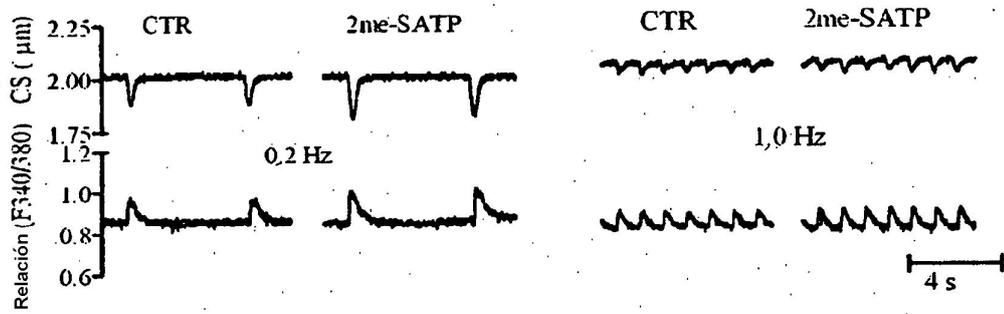


Figura 13

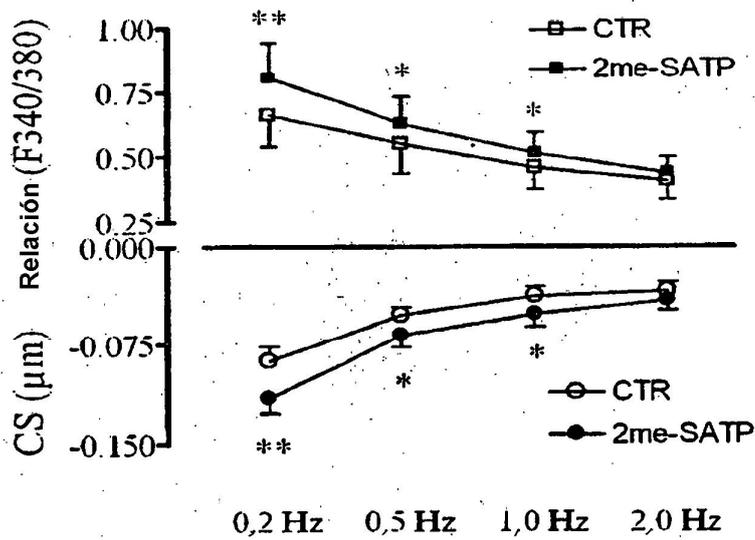


Figura 14

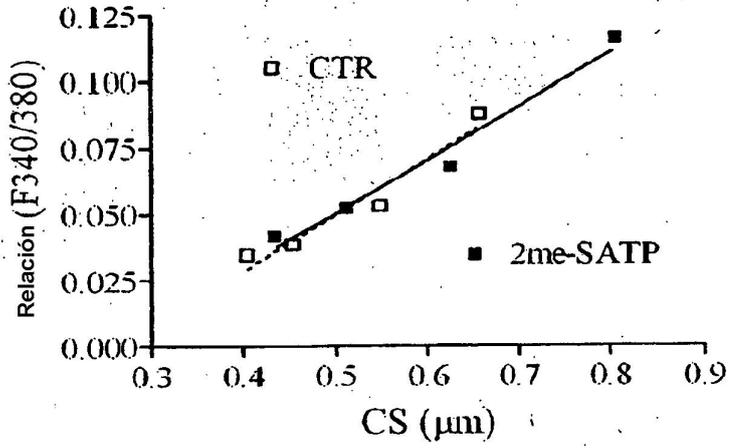


Figura 15

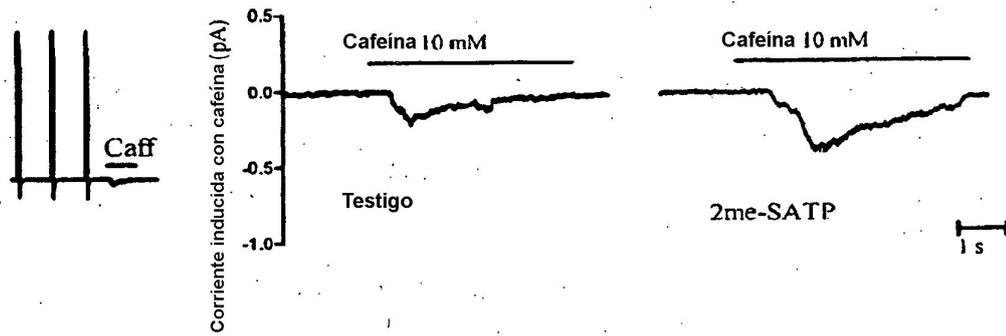


Figura 16

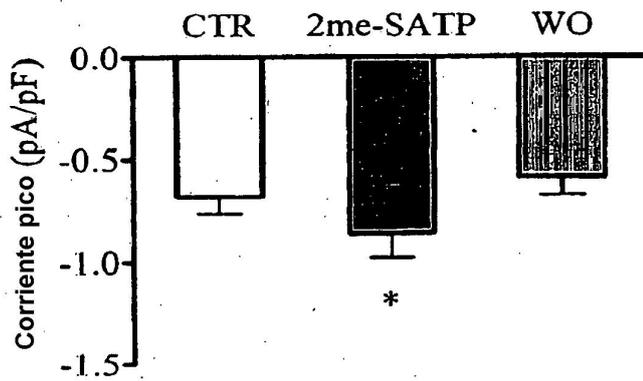


Figura 17

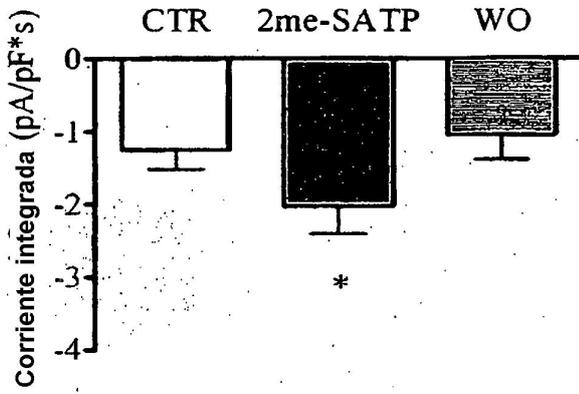


Figura 18

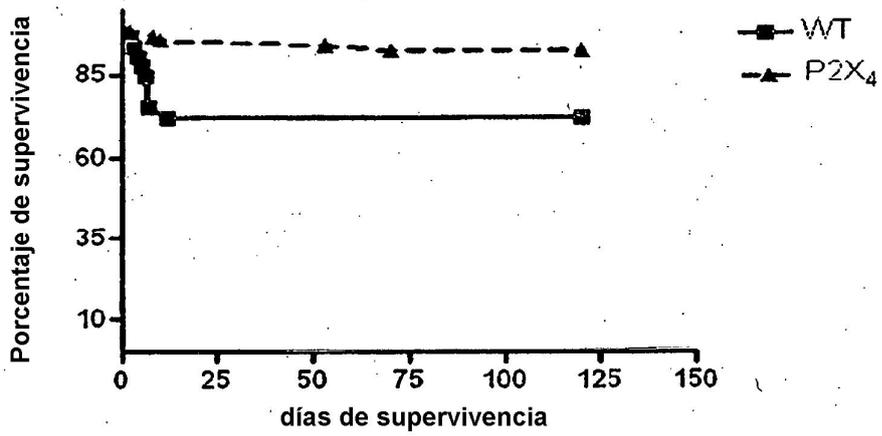


Figura 19

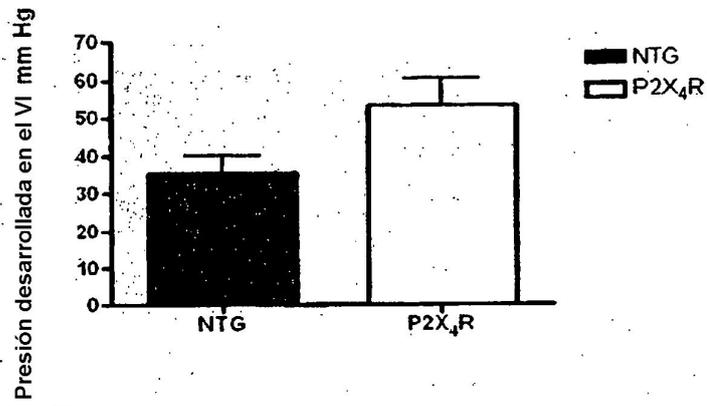


Figura 20

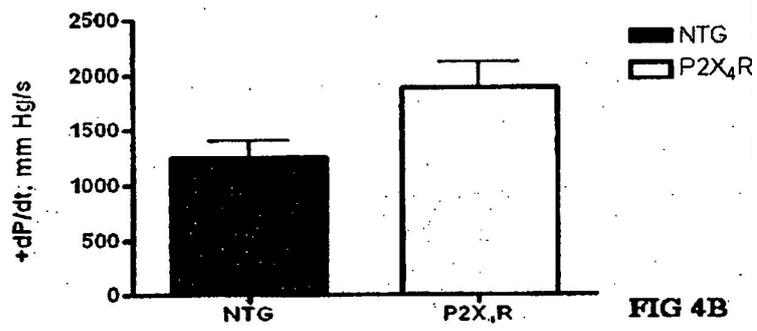


FIG 4B

Figura 21

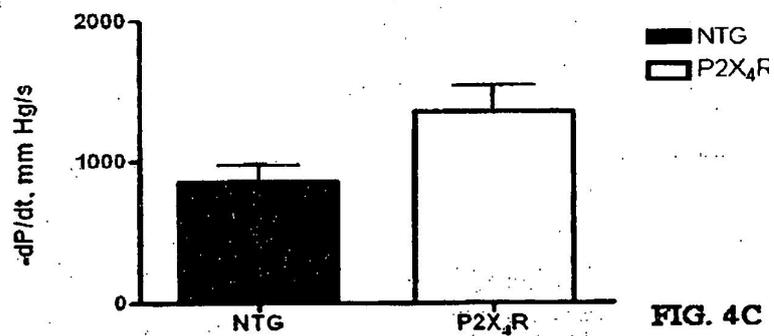


FIG. 4C

Figura 22

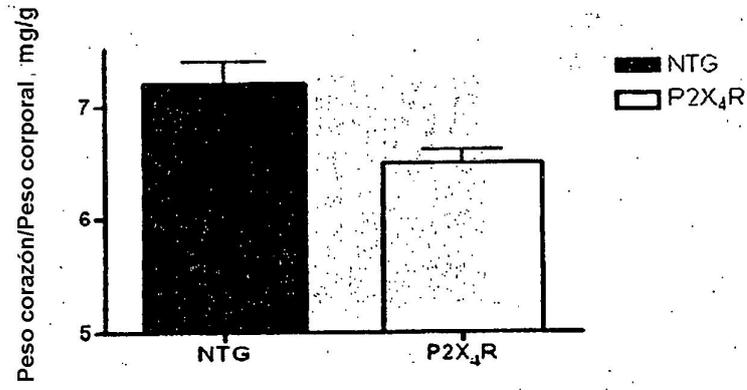


Figura 23

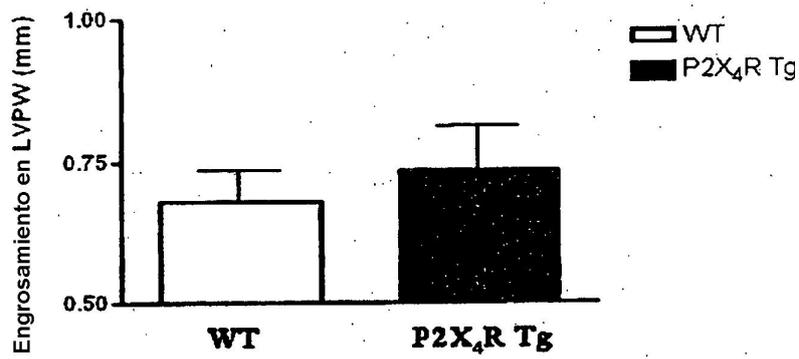


Figura 24

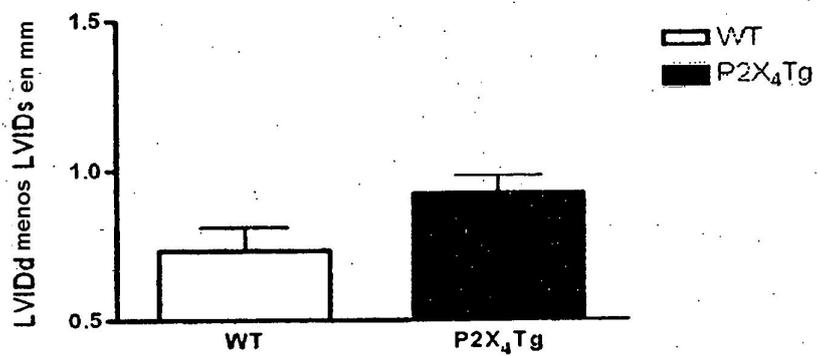


Figura 25

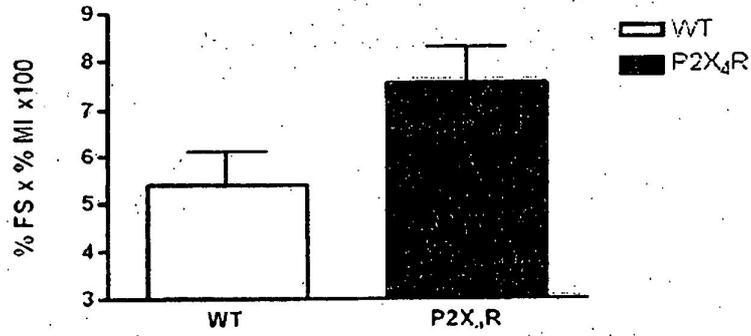


Figura 26

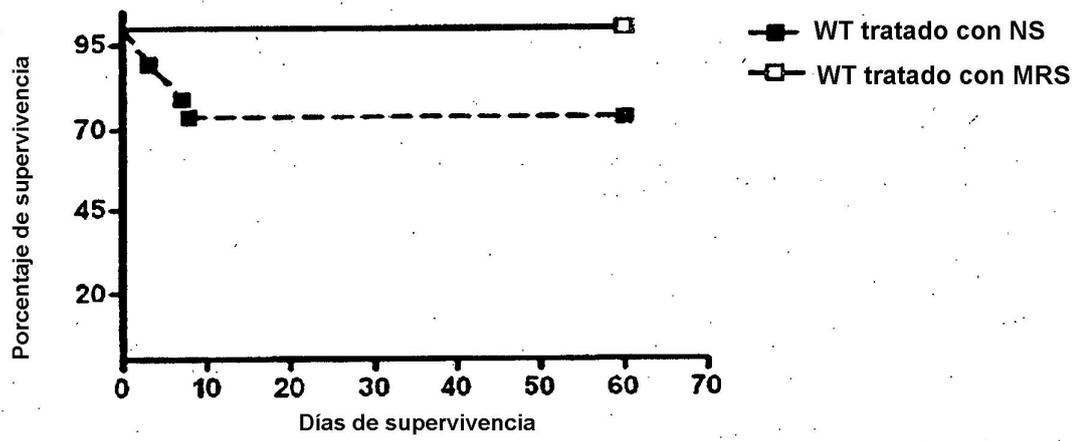


Figura 27

MSR2339 puede incrementar +dP/dt de corazones de ratón CSQ intactos

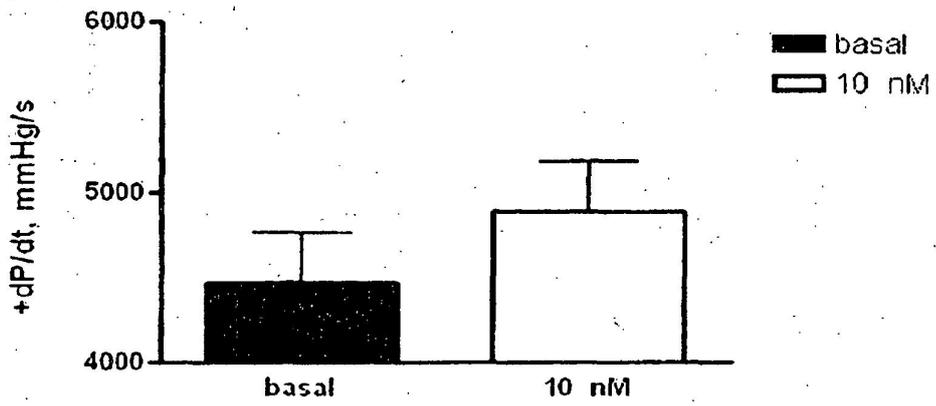


Figura 28

MRS2339 incrementaba +dP/dt en corazones de ratón WT

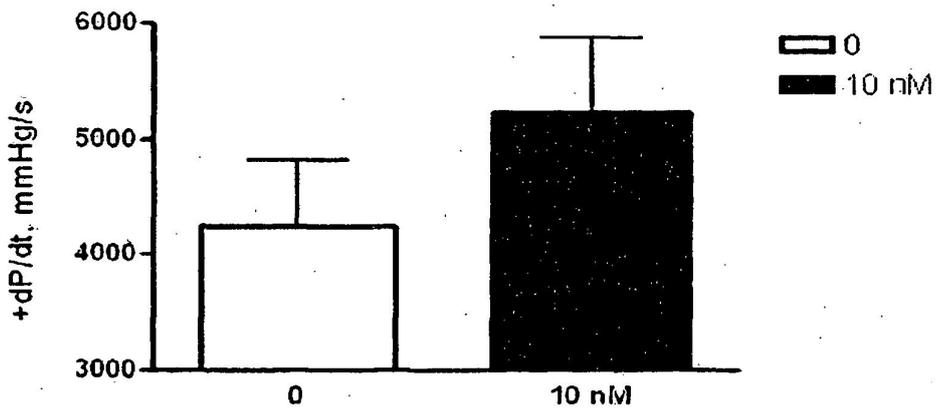


Figura 29

El beta bloqueador metoprolol mejoraba la supervivencia de ratones binarios P2X₄ R/C5Q

