

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 836**

51 Int. Cl.:

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 31/137 (2006.01)

A61K 31/138 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2005 E 05735674 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 1755581**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para el tratamiento de afecciones miocárdicas**

30 Prioridad:

23.04.2004 AU 2004902179

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

24.08.2015

73 Titular/es:

**NORTHERN SYDNEY LOCAL HEALTH DISTRICT
(100.0%)**

**NSLHD Executive Office, Building 51, Royal North
Shore Hospital, Reserve Road
St. Leonards, NSW 2065, AU**

72 Inventor/es:

**RASMUSSEN, HELGE H. y
BUNDGAARD, HENNING**

74 Agente/Representante:

VÁZQUEZ FERNÁNDEZ-VILLA, Concepción

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el
folleto original publicado por la Oficina
Europea de Patentes**

ES 2 543 836 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

Procedimientos y composiciones para el tratamiento de afecciones miocárdicas

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a procedimientos para el tratamiento de afecciones caracterizadas por anomalías de niveles iónicos en células miocárdicas, tales como iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . La presente invención también se refiere a procedimientos de tratamiento de insuficiencia cardíaca e hipertrofia miocárdica. La invención también se refiere a compuestos y composiciones útiles en el tratamiento de mamíferos, en particular, seres humanos, que tienen una afección caracterizada por anomalías de niveles iónicos en células miocárdicas, tales como iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , incluyendo insuficiencia cardíaca e hipertrofia miocárdica.

10 Antecedentes

Existen varias afecciones que afectan a seres humanos y otros animales que se caracterizan por anomalías de niveles iónicos en células miocárdicas, tales como iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Dichas afecciones incluyen insuficiencia cardíaca, hipertrofia miocárdica y miocardiopatía hipertrofica.

15 En los países industrializados, la prevalencia de la insuficiencia cardíaca sintomática es de aproximadamente un 2%. En los Estados Unidos ~5 millones de personas están tratadas para esto, y se estima que 50-60 millones de americanos (~20%) están en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca (Gheorghiadu *et al.*, 2003). Este grupo incluye personas que padecen una o más de las principales causas de desarrollo de insuficiencia cardíaca, es decir, arteriopatía coronaria, diabetes, hipertensión o valvulopatía.

20 La insuficiencia cardíaca (HF), o insuficiencia cardíaca congestiva, representa un síndrome clínico complejo caracterizado por anomalías de la función ventricular izquierda y regulación neurohormonal. En términos generales, es una afección caracterizada por una reducción en la capacidad de bombeo del corazón, que compromete altera la perfusión del cuerpo, de forma inicial típicamente durante el esfuerzo, y con un empeoramiento de la HF también en reposo. La reducción en la capacidad de bombeo se puede deber a una reducción en la fuerza contráctil del músculo cardíaco, el miocardio (insuficiencia sistólica), o debido al relleno alterado del corazón, es decir, relajación miocárdica alterada (insuficiencia diastólica). La HF se desarrolla debido a un amplio espectro de factores etiológicos y fisiopatológicos y varía considerablemente en el cuadro clínico inicial.

25 En general, los síntomas observados en la HF son disnea de esfuerzo, molestias torácicas, ortopnea, reducción de la capacidad de ejercicio, retención de líquidos que provocan la ganancia de peso, anorexia y náuseas, cansancio y debilidad, y en síntomas del sistema nervioso central en fases avanzadas, caquexia y reducción en la longevidad. Sin embargo, incluso una disminución grave en la función de bombeo puede estar asociada con ninguno o sólo pocos síntomas.

30 Las anomalías neurohormonales características de la HF incluyen aumento en los niveles séricos y tisulares de angiotensina II, catecolaminas, en particular norepinefrina (noradrenalina), aldosterona, endotelina y péptidos natriuréticos. Abordar estas anomalías ha sido el fundamento de ensayos clínicos de tratamiento farmacológico. Los fármacos que antagonizan el efecto de la angiotensina II (bloqueantes del receptor) o que evitan su síntesis, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), antagonistas de la aldosterona y bloqueantes de p-adrenorreceptores reducen significativamente la morbilidad y la mortalidad en la HF. Los ensayos de bloqueantes de receptores de la endotelina y de fármacos diseñados para elevar los niveles de péptidos natriuréticos no han mostrado beneficios.

40 En la hipertrofia miocárdica, el incremento en la masa ventricular es análogo a la hipertrofia miocitaria, es decir, un incremento en el tamaño de las células del corazón. Clínicamente, la hipertrofia miocárdica a menudo se diagnostica por electrocardiografía o por ecocardiografía que muestra un incremento en el grosor de la pared ventricular. Sin embargo, si el corazón, también está dilatado, la hipertrofia se puede presentar con paredes ventriculares normales o incluso finas. Con mayor frecuencia, la hipertrofia se desarrolla como un mecanismo de compensación que ayuda a que el corazón haga frente a un incremento en la carga de trabajo, por ejemplo, debido a valvulopatía o hipertensión arterial. La hipertrofia miocárdica también se puede desarrollar debido a anomalías en los genes que codifican las proteínas contráctiles en el miocito (Bundgaard *et al.*, 1999). Esta entidad patológica está asociada con una morbilidad considerable y una alta tasa de mortalidad.

50 En un reciente metanálisis de las implicaciones de pronóstico de hipertrofia miocárdica, Vakili *et al.* (2001) informó de que la hipertrofia miocárdica predice de forma consistente un alto riesgo de morbilidad así como de mortalidad, independientemente de las covariables examinadas, sin una clara diferencia con relación a la raza, presencia o ausencia de hipertensión o coronariopatía, o entre muestras clínicas y epidemiológicas. Estos resultados aclaran la fuerte relación entre la hipertrofia ventricular y los resultados adversos y destacan la importancia clínica de su detección. Un metanálisis de los resultados de la atención médica de esta afección concluyó que la regresión de la hipertrofia ventricular izquierda durante el tratamiento antihipertensivo está asociada con una marcada reducción en el riesgo de enfermedad cardiovascular posterior (Verdecchia *et al.*, 2003).

El documento WO 02/094820 se refiere a sales cristalinas de 2-(4-{2-[2-hidroxi-3-(2-tiofen-2-il-fenoxi)-propilamino]-2-metil-propil}-fenoxi)-nicotinonitrilo. Las sales del documento WO 02/094820 se describen como agonistas de receptores adrenérgicos beta 3 que pueden incrementar la lipólisis y el gasto calórico en las células y, por lo tanto, son útiles, por ejemplo, para tratar la diabetes de tipo 2 y/o la obesidad.

- 5 De acuerdo con el documento US 2004/053852, la desensibilización de receptores que controlan la enfermedad se previene inhibiendo las proteínas cinasas G receptoras. Esto tiene aplicabilidad, por ejemplo, para pacientes con insuficiencia cardíaca o con un dispositivo cardíaco ventricular izquierdo o una bomba cardíaca después de una intervención quirúrgica o a punto de someterse a una intervención quirúrgica y con un alto riesgo de sufrir una complicación cardíaca o con opiáceos o adictos a opiáceos o con fibrosis quística o artritis reumatoide.
- 10 El documento WO 00/18389 describe un procedimiento de uso de un agonista de receptores adrenérgicos beta 2 que activa de forma selectiva las proteínas GS en el tratamiento de cardiopatías. Más en particular, el documento WO 00/18389 describe un procedimiento de uso de fenoterol o una sal de adición de ácido del mismo para activar las beta 2AR proteínas GS de forma selectiva en el tratamiento de insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica, envejecimiento cardíaco y similares.
- 15 El documento WO 02/087508 describe neбиволол nitrosado y/o nitrosilado, metabolitos nitrosados y/o nitrosilados de neбиволол y composiciones que comprenden al menos un neбиволол nitrosado y/o nitrosilado y/o al menos un metabolito nitrosado y/o nitrosilado de neбиволол, y opcionalmente, al menos un dador de óxido nítrico y/o al menos un antioxidante o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o al menos un compuesto usado para tratar una cardiopatía o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o al menos un compuesto nitrosado usado para tratar cardiopatías.
- 20

Acoplamiento de excitación-contracción en el corazón

En respuesta a la acción cardíaca, los iones Ca^{2+} potenciales entran en la célula desde el exterior y "desencadenan" la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS). El Ca^{2+} interacciona con proteínas contráctiles de la célula e inicia la contracción del corazón.

- 25 La relajación del corazón depende de la retirada de Ca^{2+} . Esto se produce por la recaptación de Ca^{2+} en el RS y por la extrusión a través de la membrana celular. La extrusión de Ca^{2+} a través de la membrana celular se produce principalmente por medio de un mecanismo de intercambio que transporta Ca^{2+} fuera en intercambio por Na^+ que se transportan dentro.

- 30 Las anomalías en la conducción celular de Ca^{2+} durante el acoplamiento de excitación-contracción están implicadas en la patogenia de HF e hipertrofia miocárdica. El aumento en los niveles intracelulares de Na^+ en HF e hipertrofia miocárdica está asociado con una disminución en la fuerza motriz electroquímica que extrude el Ca^{2+} en el intercambio por Na^+ . Los niveles altos de Na^+ también pueden ser responsables de las anomalías en la contracción.

- 35 El transporte "en subida" de los iones de Ca^{2+} fuera de las células, contra su gradiente electroquímico, depende de la energía almacenada en un gradiente electroquímico dirigido opuestamente para Na^+ . El gradiente de Na^+ transmembranario, a su vez, se mantiene por la bomba Na^+-K^+ , la única ruta exportadora para Na^+ . La bomba transporta 3 iones de Na^+ fuera de las células en intercambio por 2 iones K^+ que se transportan dentro.

- 40 La mortalidad en la HF es extremadamente alta y se incrementa con la edad y comorbilidades. En un estudio de 38.000 pacientes con una primera hospitalización por HF, la mortalidad en un año fue de un 33,1 % (Jong P *et al*, 2002). La mortalidad en 5 años global para todos los pacientes después de que se establezca el diagnóstico de HF, es de un ~50 %. A pesar de un progreso marcado en la atención farmacológica de HF, la mortalidad en 5 años sólo ha bajado de un 60-70 % en el periodo de 1950-1969 a un 50-60 % en el periodo de 1990-1999 (Levy D, 2002). Por tanto, la morbilidad y la mortalidad, todavía son muy altas en la insuficiencia cardíaca a pesar de la administración de fármacos disponibles en la actualidad con probada eficacia.

- 45 Al igual que para la situación con insuficiencia cardíaca, mientras que existen tratamientos disponibles para otras afecciones caracterizadas por anomalías de los niveles iónicos celulares, cada uno de los tratamientos disponibles sufre una o más desventajas y se beneficiaría de la disponibilidad de procedimientos de tratamiento mejorados.

- 50 En consecuencia, existe una necesidad de mejora en los procedimientos para el tratamiento de afecciones caracterizadas por anomalías de niveles iónicos en células miocárdicas, en particular anomalías celulares de iones Na^+ , K^+ o Ca^{2+} . En un enfoque particular, existe una necesidad de mejora en los procedimientos para el tratamiento de HF e hipertrofia miocárdica, y una mejora en los agentes y regímenes de tratamiento para la HF e hipertrofia miocárdica.

Sumario de la invención

- 55 La presente invención tiene como objetivo proporcionar una mejora en las composiciones para su uso en el tratamiento de afecciones caracterizadas por anomalías de niveles iónicos de células miocárdicas, en particular anomalías celulares de iones Na^+ , K^+ o Ca^{2+} y así aliviar sustancialmente las carencias de los tratamientos actuales

para dichas afecciones. En particular, la presente invención tiene como objetivo proporcionar una mejora en las composiciones para su uso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca sintomática y así aliviar sustancialmente las carencias de los tratamientos actuales.

5 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento por los inventores de que un receptor de superficie celular miocárdica, el adrenorreceptor β_3 , activa la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de membrana y está asociado con la extrusión de Na^+ de las células miocárdicas.

10 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agonistas selectivos del adrenorreceptor β_3 que tienen actividad estimuladora preferencial hacia el adrenorreceptor β_3 para su uso en el tratamiento de un ser humano que padece insuficiencia cardíaca sintomática, el uso, comprendiendo el uso además el uso de uno o más bloqueantes β .

15 También se describe en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de un individuo que padece insuficiencia cardíaca sintomática, comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agonistas selectivos del adrenorreceptor β_3 , que tienen actividad estimuladora preferencial hacia el adrenorreceptor β_3 , para dicho individuo, comprendiendo además el procedimiento administrar uno o más β bloqueantes a dicho individuo.

El individuo puede ser un individuo que padezca uno o más síntomas clínicos de insuficiencia cardíaca sintomática.

En un aspecto específico de la invención, el agonista selectivo del adrenorreceptor β_3 se selecciona de grupos de agonistas del adrenorreceptor β_3 ariletanolaminas, ariloxipropanolaminas, trimetoquinoles.

20 En un aspecto específico de la invención, el agonista selectivo del adrenorreceptor β_3 se puede seleccionar del grupo que consiste en BRL37344, N-5984, (R)-N-[4-[2-[[2-hidroxi-2-(piridin-3-il)etil]amino]etil]fenil]-4-[4-(4-trifluorometilfenil)tiazol-2-il]bencenosulfonamida (L-796568), (R)-N-[4-[2-[[2-hidroxi-2-(3-piridinil)-etil]amino]etil]fenil]-1-(4-octiltiazol-2-il)-5-indolinsulfonamida (L-755507), L-770,644, L-766,892, L-757,793, LY-377604, SR 58611 A, y series de agonistas beta 3 2-(3-indolil) alquilamino-1-1(3-clorofenil)etanolos.

25 En un aspecto específico de la invención, el agonista selectivo del adrenorreceptor β_3 comprende además actividad antagonista β_1 .

En un aspecto específico de la invención, el agonista selectivo del adrenorreceptor β_3 comprende además actividad antagonista β_2 .

En un aspecto específico de la invención, el β bloqueante es un antagonista del adrenorreceptor β_1 .

30 En un aspecto específico de la invención, el β bloqueante se puede administrar a dicho individuo antes de, simultáneamente con o después de la administración del uno o más agonistas selectivos del adrenorreceptor β_3 .

El procedimiento puede comprender estabilizar al menos parcialmente a dicho individuo antes de la administración de dicho agonista selectivo del adrenorreceptor β_3 .

El procedimiento puede comprender el comienzo de un agonista selectivo de adrenorreceptor β_3 como enfoque farmacológico inicial en el tratamiento.

35 Dicha estabilización puede comprender el tratamiento con uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de la ECA, antagonistas de la aldosterona y antagonistas del adrenorreceptor β .

40 También se describe en el presente documento el uso de uno o más agonistas selectivos del adrenorreceptor β_3 que tienen actividad estimuladora preferencial hacia el adrenorreceptor β_3 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un individuo que padece insuficiencia cardíaca sintomática, que comprende además el uso de uno o más β bloqueantes.

También se describe en el presente documento uno o más agonistas selectivos del adrenorreceptor β_3 que tienen actividad estimuladora preferencial hacia el adrenorreceptor β_3 para su uso en el tratamiento de un individuo que padece insuficiencia cardíaca sintomática, comprendiendo el uso además el uso de uno o más β bloqueantes.

45 Se describe además en el presente documento una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca sintomática, comprendiendo la composición uno o más agonistas selectivos del adrenorreceptor β_3 que tienen actividad estimuladora preferencial hacia el adrenorreceptor β_3 junto con uno o más adyuvantes, excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, comprendiendo el uso además el uso de uno o más β bloqueantes.

50 La composición farmacéutica puede comprender uno o más agonistas selectivos del adrenorreceptor β_3 y uno o más antagonistas del adrenorreceptor β_1 y/o β_2 , junto con uno o más adyuvantes, excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

También se describe un procedimiento para la extrusión de Na^+ de una célula o células miocárdicas, comprendiendo el procedimiento poner en contacto dicha(s) célula(s) con uno o más agonistas selectivos del adrenergico receptor β_3 . El procedimiento puede comprender la estimulación con una bomba Na , K . El procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*.

5 Definiciones

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento incluye dentro de su significado una cantidad suficiente pero no tóxica de un compuesto o composición para su uso en la invención para proporcionar el efecto terapéutico deseado. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro dependiendo de factores tales como la especie que se trata, la edad y estado general del sujeto, comorbilidades, la gravedad de la afección que se trata, el agente particular que se administra y el modo de administración y así sucesivamente. Por tanto, no es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, una "cantidad eficaz" apropiada se puede determinar por un experto en la técnica usando solo procedimientos rutinarios.

En el contexto de esta memoria descriptiva, la clase general de receptores conocida como "adrenorreceptores beta (β)" es relevante. En este contexto, se entiende que "adrenorreceptor beta" o "adrenorreceptor β " tienen su significado estándar en la técnica que, establecido en general, incluye adrenorreceptores β_1 , adrenorreceptores β_2 , adrenorreceptores β_3 , que son receptores para catecolaminas en circulación (adrenalina y noradrenalina y derivados de las mismas).

De forma similar, se entenderá que el término "adrenorreceptores β_3 " tiene su significado habitual en la técnica que, establecido en general, incluye receptores conocidos por terminologías alternativas que incluyen adrenorreceptor β atípico, receptor de adrenorreceptores β_3 , receptor adrenérgico β_3 y receptor de adrenalina β_3 .

En el contexto de esta memoria descriptiva, un agonista es cualquier sustancia, agente o fármaco que estimule la actividad fisiológica de un receptor celular que, normalmente, se puede estimular por una sustancia reguladora natural o endógena. Se debe entender que, en el contexto de esta memoria descriptiva, el término "agonista" incluye agonistas parciales en los que la sustancia, agente o fármaco puede ser solo parcialmente tan eficaz como una sustancia reguladora endógena. Se entenderá que, en el contexto de esta memoria descriptiva, el término "agonista" incluye cualquier sustancia, agente o fármaco que actúa directamente sobre un receptor, incluyendo los que tienen afinidad por un receptor, y cualquier sustancia, agente o fármaco, que puede actuar indirectamente sobre un receptor, tal como a través de una o más sustancias intermedias o rutas, para estimular la actividad del receptor.

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "agonista de β_3 " y "agonista del adrenorreceptor β_3 " incluye dentro de su alcance cualquier agente que pueda activar un adrenorreceptor β_3 , en particular cualquier agente que pueda activar un adrenorreceptor β_3 humano.

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "selectivo", cuando se usa en el contexto de un agonista del adrenorreceptor β o antagonista del adrenorreceptor β_3 , quiere decir que el agonista o antagonista tiene actividad preferencial, pero no necesariamente única, hacia uno o más de los adrenorreceptores β_1 , β_2 o β_3 . Por ejemplo, un agonista selectivo del adrenorreceptor β_3 tiene una actividad estimuladora preferencial el adrenorreceptor β_3 . Por ejemplo, un antagonista selectivo del adrenorreceptor β_1 tiene efecto inhibitorio preferencial hacia el adrenorreceptor β_1 .

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término " β bloqueante" quiere decir cualquier sustancia, agente o fármaco que tiene actividad inhibitoria o antagonista hacia un adrenorreceptor β_1 y/o un adrenorreceptor β_2 .

En el contexto de esta memoria descriptiva, "insuficiencia cardíaca" (HF) incluye insuficiencia cardíaca tanto crónica como aguda. Por tanto, por ejemplo, se espera que el procedimiento de la invención sea adecuado para el tratamiento de una insuficiencia cardíaca crónica y para el tratamiento de insuficiencia cardíaca aguda. También se entenderá que, en el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "insuficiencia cardíaca" incluye insuficiencia cardíaca sintomática e insuficiencia cardíaca asintomática, y por lo tanto incluye la susceptibilidad a insuficiencia cardíaca aguda o crónica. También se entenderá que, en el contexto de esta memoria descriptiva, el término "insuficiencia cardíaca" incluye insuficiencia cardíaca sistólica e insuficiencia cardíaca diastólica.

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "paciente" incluye seres humanos e individuos de cualquier especie de importancia social, económica o de investigación, incluyendo pero sin limitarse a miembros del género ovino, bovino, equino, porcino, felino, canino, primates, roedores.

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "combinado con" y términos similares tales como "conjuntamente con" cuando se usan con relación a un régimen terapéutico quieren decir que cada uno de los fármacos y otros agentes terapéuticos, tales como agonistas y antagonistas, se usan en el tratamiento de un individuo y que cada uno de los fármacos y otros agentes terapéuticos en el régimen terapéutico "combinado" se pueden administrar al individuo simultáneamente con uno o más de los otros agentes en el régimen terapéutico, o se puede administrar a un individuo en un momento diferente a uno o más de otros agentes en el régimen terapéutico. Esto es, el término "combinado con" y términos similares tales como "conjuntamente con" cuando se usan con relación a un régimen terapéutico pueden querer decir que uno cualquiera o más de los fármacos u otros agentes se

pueden combinar físicamente antes de su administración al paciente, y se entenderá que el término también incluye la administración de los uno o más fármacos y otros agentes terapéuticos como agentes separados no en combinación física anterior.

- 5 En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "que comprende" quiere decir "incluyendo principalmente, pero no de forma necesariamente única". Además, las variaciones de la palabra "comprendiendo", tales como "comprenden" y "comprende", tienen de forma correspondiente significados variados.

Abreviaturas

En el contexto de esta memoria descriptiva, "HF" es una abreviatura para insuficiencia cardíaca.

En el contexto de esta memoria descriptiva, "SR" es una abreviatura para retículo sarcoplásmico.

- 10 En el contexto de esta memoria descriptiva, "CHF" es una abreviatura para insuficiencia cardíaca congestiva.

En el contexto de esta memoria descriptiva, "LV" es una abreviatura para ventricular izquierda.

En el contexto de esta memoria descriptiva, "I_p" es una abreviatura para la corriente transmembranosa celular medible generada por la bomba Na,K en situaciones experimentales usando una técnica de pinzamiento zonal de membrana.

- 15 En el contexto de esta memoria descriptiva, "NMG.Cl" es una abreviatura para N-metil-D-glucamina.

En el contexto de esta memoria descriptiva, "ESPVR" es una abreviatura para la relación de presión-volumen telesistólica ventricular izquierda.

En el contexto de esta memoria descriptiva, "PKA" es una abreviatura para proteína cinasa activada por cAMP.

- 20 En el contexto de esta memoria descriptiva, "H-89" es una abreviatura para el diclorhidrato de (N-[2-(p-bromocinnamylamino)etil]-5-isoquinolinsulfonamida.

Leyendas de las figuras

La **figura 1** demuestra los efectos del agonista selectivo del adrenorreceptor β_3 BRL 37344 sobre la corriente mediada por la bomba Na,K miocárdica a concentraciones de agonista de 1 nM, 10 nM y 100 nM.

- 25 La **figura 2** demuestra los efectos del agonista selectivo del adrenorreceptor β_3 BRL 37344 sobre la corriente mediada por la bomba Na,K miocárdica a una concentración de agonista de 100 nM en ausencia y presencia del bloqueante β_1/β_2 nadolol a 1 μ M.

La **figura 3** demuestra los efectos del agonista selectivo del adrenorreceptor β_3 BRL 37344 sobre la corriente mediada por la bomba Na,K miocárdica a una concentración de agonista de 10 nM en ausencia de Na⁺ extracelular (NaCl se reemplaza por NMG.Cl).

- 30 La **figura 4** demuestra los efectos de la catecolamina natural, noradrenalina (NA), en corriente mediada por la bomba Na,K miocárdica a una concentración de agonista de 10 nM en ausencia y presencia de nadolol (1 μ M; un bloqueante β_1/β_2) y en ausencia y presencia de H-89 (0,5 μ M; un inhibidor de PKA).

- 35 La **figura 5** demuestra los efectos de la activación selectiva de la ruta de mensajero intracelular acoplada al adrenérgico β_1/β_2 , PKA, usando el análogo de cAMP 6-Bnz-cAMP (100 μ M) en ausencia y presencia de H-89 (0,5 μ M).

La **figura 6** demuestra los efectos de la administración de BRL 37344 en el modelo de insuficiencia cardíaca de oveja (Huang *et al.*, 2004), antes y después de la inducción de insuficiencia cardíaca, usando la relación de presión-volumen telesistólica ventricular izquierda (ESPVR) como un índice de rendimiento cardíaco.

Descripción detallada de la invención y mejor modo

- 40 La invención se describirá ahora con más detalle, incluyendo, a modo de ilustración, con respecto a los ejemplos que siguen.

- 45 La presente invención es un enfoque farmacológico completamente nuevo para la atención a los pacientes, en especial pacientes humanos, con afecciones caracterizadas por anomalías de niveles iónicos de células miocárdicas, en particular anomalías de iones Na⁺, K⁺ o Ca²⁺ celulares. La presente invención proporciona un enfoque farmacológico completamente nuevo para la atención a los pacientes con insuficiencia cardíaca sintomática (HF).

La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de los inventores de que un receptor de superficie celular miocárdica, el adrenorreceptor β_3 , activa la bomba Na⁺-K⁺ de membrana para extrudir el Na⁺ de las células. Puesto

que el Na^+ miocitario cardíaco está implicado en la fisiopatología de insuficiencia cardíaca, el descubrimiento permite un diseño racional de un nuevo enfoque farmacológico para el tratamiento de HF usando fármacos activadores de adrenorreceptores β_3 (agonistas de β_3).

5 Todas las células, incluyendo los miocitos cardíacos, se caracterizan por una diferencia en el potencial eléctrico entre el interior de la célula y el exterior, separada por la membrana celular. La membrana celular en los miocitos cardíacos se denomina sarcolema. Durante los ciclos cardíacos, el potencial de membrana se somete a cambios cíclicos cambiando de forma transitoria el interior de un potencial negativo en el estado de reposo a un potencial positivo. Este cambio en el potencial de membrana se denomina potencial de acción cardíaca. Los acontecimientos durante el potencial de acción cardíaca son cruciales para la contracción miocitaria y, por tanto, para la función de bombeo del corazón. La interacción entre el potencial de acción cardíaca y la contracción a menudo se denomina "acoplamiento de excitación-contracción".

10 El cambio en el potencial de membrana durante el potencial de acción cardíaca activa los canales especializados en la membrana para que se vuelva de forma transitoria permeable a los iones Ca^{2+} . Los iones entran en la célula desde un área de alta concentración en el exterior a uno de concentración baja en el interior. El Ca^{2+} que entra sirve como "desencadenante" para liberar el Ca^{2+} almacenado en las estructuras intracelulares llamadas el retículo sarcoplásmico (RS). El Ca^{2+} que entra por medio de los canales o se libera del RS se combina para interaccionar con proteínas contráctiles de la célula e iniciar la contracción del corazón.

15 La relajación del corazón es tan importante como la contracción. La relajación depende de la retirada de Ca^{2+} . Esto se produce por una recaptación dependiente de la energía de Ca^{2+} en el RS y por su extrusión desde el interior de la célula al medio externo circundante, a través de la membrana celular. La extrusión de Ca^{2+} a través de la membrana celular se produce por medio de una bomba de Ca^{2+} dependiente de la energía y por medio de un mecanismo de intercambio de Na^+ - Ca^{2+} que transporta el Ca^{2+} fuera en intercambio por Na^+ que se transportan dentro. En la mayoría de las especies de mamíferos, incluyendo el hombre, el intercambio de Na^+ - Ca^{2+} es cuantitativamente la ruta más importante para la extrusión de Ca^{2+} .

20 Las anomalías en la conducción celular de Ca^{2+} durante el acoplamiento de excitación-contracción son esenciales en la patogenia de HF. Típicamente, existe un retraso en el descenso en Ca^{2+} intracelular después del incremento transitorio que inicia la contracción. Se han propuesto muchos mecanismos, incluyendo anomalías en la función y/o abundancia de las proteínas de membrana que median en la recaptación de Ca^{2+} en el RS o el intercambio con Na^+ a través de la membrana del sarcolema.

25 Recientemente se ha demostrado que un aumento en los niveles intracelulares de Na^+ (y por tanto una disminución en la fuerza motriz electroquímica que extrude Ca^{2+} en intercambio por Na^+) es una anomalía esencial en la HF. Esto se aplica tanto a animales con HF inducida experimentalmente como a seres humanos con el estado clínico. El aumento en los niveles intracelulares de Na^+ puede ser una causa principal de conducción celular anormal de Ca^{2+} debido al papel del gradiente de Na^+ transmembranario en la extrusión celular de Ca^{2+} por medio del intercambio de Na^+ - Ca^{2+} .

30 Por tanto, los niveles de Na^+ altos pueden ser responsables de las anomalías en la contracción y pueden activar la programación génica presente de forma más temprana en la vida y contribuir a un crecimiento miocitario cardíaco anormal y a una remodelación cardíaca adversa. Aunque la presencia de niveles de Na^+ intracelular altos en HF e hipertrofia miocárdica está ahora ampliamente aceptada, el mecanismo para el incremento es incierto. Se ha propuesto la potenciación del flujo de entrada de Na^+ así como la disminución del flujo de salida de Na^+ .

El papel de las bombas de Na^+ y Na^+ , K^+ miocárdicas en la HF

35 Como se describe anteriormente, el transporte "en subida" de iones de Ca^{2+} fuera de las células, contra su gradiente electroquímico, depende de la energía almacenada en gradiente electroquímico dirigido opuestamente para Na^+ (concentración alta en el exterior, concentración baja en el interior). El gradiente de Na^+ transmembranario, a su vez, se mantiene por la bomba Na^+ - K^+ , la única ruta exportadora para Na^+ . La bomba transporta 3 iones de Na^+ fuera de las células en intercambio por 2 iones K^+ que se transportan dentro. Es un proceso dependiente de la energía que depende de la hidrólisis de ATP, por su funcionamiento, por tanto, a menudo se denomina Na^+ - K^+ -ATPasa.

40 Se ha reconocido el papel de la bomba Na^+ - K^+ en el acoplamiento de excitación-contracción durante aproximadamente 45 años. El ejemplo más conocido de su implicación se refiere al efecto de glucósidos cardíacos, por ejemplo, digoxina. Este grupo de fármacos son inhibidores muy específicos de la bomba Na^+ - K^+ . La exposición de tejido cardíaco normal a glucósidos cardíacos provoca un incremento en el Na^+ intracelular, un incremento en el Ca^{2+} y, por tanto, una potenciación en la contractilidad. Este esquema ha formado la base para el uso de los glucósidos cardíacos en el tratamiento de la HF. Sin embargo, sólo ligeros incrementos inducidos por glucósidos en Na^+ intracelular potencian la contracción, y un incremento en Na^+ intracelular de unos pocos mM más allá de los niveles "normales" empieza teniendo un efecto adverso sobre la contracción. Como se describe anteriormente, el Na^+ intracelular ya está aumentado en la HF y no es probable que incrementos adicionales sean beneficiosos. De acuerdo con esto, aunque el tratamiento con glucósidos cardíacos puede ser beneficioso en términos de mejora sintomática temporal, no mejora la supervivencia en la HF e incluso tiene un efecto adverso sobre la mortalidad en

algunos subconjuntos de pacientes.

La presente invención se refiere a medidas con el potencial para provocar la estimulación de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en la HF y otras afecciones. Antes de la presente invención, el uso de agonistas selectivos del adrenoceptor β_3 no se había explorado como potencial activador de bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$.

5 Adrenoceptores β_3

Los adrenoceptores β_3 se expresan en muchos tejidos, incluyendo el corazón, y están presentes en muchas especies incluyendo seres humanos. Antes de la presente invención, el interés clínico y farmacológico primario en adrenoceptores β_3 se ha relacionado con un papel potencial de agonistas de adrenoceptores β_3 ("activadores") en el tratamiento de obesidad y diabetes mellitus de tipo II, basado en hallazgos en roedores de que los agonistas de adrenoceptores β_3 inducen un incremento en la tasa metabólica, un efecto lipolítico y un incremento en la sensibilidad a la insulina.

Los estudios en tejido cardíaco aislado, incluyendo tejido de seres humanos, han establecido que los agonistas selectivos del adrenoceptor β_3 median en un efecto inótrope negativo, es decir, una disminución en la contractilidad. Esto está en marcado contraste con los agonistas de los receptores β_1 y β_2 que median en la inotropía positiva, es decir, un incremento en la contractilidad. El mecanismo para el efecto inótrope negativo de los adrenoceptores β_3 no se ha establecido firmemente, pero se ha sugerido que está mediado por el bloqueo de los canales de calcio.

Los adrenoceptores β_3 se regulan por incremento con el desarrollo de la HF. Se ha sugerido que los adrenoceptores β_3 tienen efectos adversos sobre la progresión de la HF. Gauthier *et al.* (1998), sugirieron por tanto que las rutas mediadas por adrenoceptores β_3 activados por catecolamina pueden dar lugar a disfunción miocárdica. También se ha propuesto que el efecto inótrope negativo mediado por adrenoceptores β_3 está inadecuado y agrava la disfunción sistólica, en particular con HF grave (Moniotte *et al.*, 2001). Cheng *et al.* (2001) sugieren que el adrenoceptor β_3 contribuye a la progresión de disfunción cardíaca en la HF. Morimoto *et al.* (2004) informaron de que el bloqueo del adrenoceptor β_3 en un modelo de disfunción cardiomiocitaria en insuficiencia cardíaca mejoró la contracción y relajación ventricular izquierda (LV) y que la estimulación del adrenoceptor β_3 por los niveles altos de catecolaminas en la HF contribuye a una alteración en la contracción y relajación LV. Morimoto *et al.* proponen que las implicaciones clínicas de sus resultados incluyen que el bloqueo del adrenoceptor β_3 puede proporcionar un procedimiento farmacológico de soporte inótrope para el corazón defectuoso y que el bloqueo del adrenoceptor β_3 crónico puede tener efectos favorables en la HF.

En vista del papel de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en la contracción cardíaca (se espera que la inhibición de la bomba tenga un efecto inótrope positivo, se espera que la estimulación de la bomba tenga un efecto inótrope negativo), los presentes inventores sometieron a prueba la hipótesis de que el adrenoceptor β_3 está ligado a la activación de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Los inventores describen en el presente documento que, sorprendentemente, el adrenoceptor β_3 puede mediar en un incremento en la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ sarcolémica en miocitos cardíacos aislados. Esta es la primera demostración de un efecto de los adrenoceptores β_3 sobre la regulación de la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ miocárdica.

Esta estimulación mediada por adrenoceptor β_3 de la bomba Na,K incrementará el flujo de salida celular de Na^+ . Puesto que la elevación en los niveles de Na^+ miocitario cardíaco es una señal distintiva de insuficiencia cardíaca e hipertrofia miocárdica, dicha estimulación de flujo de salida de Na^+ puede ser beneficiosa. Como apoyo a esta propuesta, los tratamientos eficaces bien documentados con inhibidores de la ECA y antagonistas de la aldosterona están asociados con la estimulación de la bomba Na-K en miocitos cardíacos (Hool, LC *et al.*, Am J Physiol 271:C172-180, 1996, Mihailidou AS *et al.*, Circ Res 86: 37-42, 2000). Los efectos de estos grupos de fármacos tienen la propiedad en común de contrarrestar los efectos inhibidores de las hormonas naturales angiotensina II y aldosterona en la bomba Na-K. La presente invención describe un nuevo procedimiento mediado por receptores de estimulación de forma directa de la bomba en lugar de evitar meramente la inhibición. Los efectos del procedimiento pueden ser aditivos a los de los tratamientos ya existentes. Inicialmente, una disminución en los niveles de Na^+ intracelular puede provocar cierto deterioro en la contractilidad miocárdica. Sin embargo, cualquier posible deterioro inicial debe estar seguido de una mejora en paralelo con una reducción gradual en la concentración de Na^+ intracelular. Por tanto, el descubrimiento de la estimulación de la bomba Na,K miocárdica por agonistas selectivos del adrenoceptor beta 3 proporciona un enfoque farmacológico completamente nuevo para el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca o hipertrofia miocárdica usando fármacos activadores del adrenoceptor beta 3 (agonistas selectivos del adrenoceptor beta 3).

En consecuencia, en el presente documento se describe el uso de uno o más agonistas selectivos del adrenoceptor β_3 en el tratamiento de HF o hipertrofia miocárdica.

55 Agonistas selectivos del adrenoceptor β_3

Los agonistas selectivos del adrenoceptor β_3 son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los grupos de agonistas del adrenoceptor β_3 ariletanolaminas, ariloxipropanolaminas, trimetoquinolinas incluyendo, pero sin limitarse a, BRL37344,, N-5984, (R)-N-[4-[2-[[2-hidroxi-2-(piridin-3-il)etil]amino]etil]fenil]-4-(4-

trifluorometilfenil)tiazol-2-il]bencenosulfonamida (L-796568), (R)-N-[4-[2-[[2-hidroxi-2-(3-piridinil)-etil]amino]etil]fenil]-1-(4-octiltiazol-2-il)-5-indolinsulfonamida (L-755507), L-770 644, L-766 892, L-757 793, LY-377604, SR 58611 A, también se contemplan en la invención.

5 Se apreciará que el procedimiento de la invención contempla el uso de cualquier agonista selectivo del adrenoceptor β_3 adecuado y que en el presente documento se establecen grupos y compuestos específicos a modo de ejemplificación y no a modo de limitación.

También se puede usar cualquier forma de sal (sal de ácido o de base) e hidrato, polimorfo, etc., de esos agentes.

10 El agonista del adrenoceptor β_3 puede ser selectivo, incluyendo, pero sin limitarse a, BRL37344, y compuestos selectivos divulgados en la patente de los EE. UU. N.º 6,686,372 para Crowell *et al.* titulada "Selective β_3 adrenergic agonists".

También son conocidos en la técnica los compuestos que tienen actividad agonista del adrenoceptor β_3 y actividad antagonista del adrenoceptor β_1 y/o β_2 . En el presente documento se describe el uso de dichos compuestos en el tratamiento de HF o hipertrofia miocárdica.

15 El uso de bloqueo de adrenoceptor β , en la HF (a través del uso de antagonistas del adrenoceptor β_1 y/o β_2) ya está firmemente establecido como beneficioso en el tratamiento de la HF. En el presente documento se describe el uso de un agonista selectivo del adrenoceptor β_3 en el tratamiento de HF o hipertrofia miocárdica. También se espera que un régimen terapéutico combinado, que comprende el uso de un agonista selectivo del adrenoceptor β_3 junto con uno o más antagonistas del adrenoceptor β_1 y/o β_2 puede proporcionar una mejora en el resultado terapéutico.

20 En consecuencia, en el presente documento se proporciona un procedimiento para el tratamiento de HF o hipertrofia miocárdica en el que se administra uno o más agonistas selectivos del adrenoceptor β_3 a un individuo conjuntamente con uno o más antagonistas del adrenoceptor β_1 y/o β_2 . Los antagonistas del adrenoceptor β en este aspecto de la invención pueden ser los que tienen un papel establecido en el tratamiento de la HF.

Antagonistas del adrenoceptor β_1 y/o β_2

25 Los compuestos y agentes que tienen actividad antagonista del adrenoceptor β_1 y/o β_2 son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, alprenolol, amosulalol, atenolol, betaxolol, bethanidine, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bufuralol, bunitrolol, bupranolol, butafilolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, dil-evalol, epanolol, indenolol, labetalol, mepindolol, meti-pranolol, metoprolol, moprolol, nadolol, nebivolol, nipradilol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, pronethalol, propranolol, sotalol, sulfinalol, talinolol, tertatolol, tilisolol, timolol, toliprolol, y similares. Los antagonistas del adrenoceptor β_3 también se describen en la patente de los EE. UU. N.º 4,678,786 para Roe *et al.* titulada "Pharmaceutical compositions having p-adrenoceptor antagonist activity employing pyridazine derivatives", Los antagonistas del adrenoceptor β se describen más completamente en la literatura, tal como en Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (9ª edición), McGraw-Hill, 1995; y en *The Merck Index*, (13ª edición), Merck & Co., WhiteHouse Station, N.J., EE. UU., 2004.

35 El antagonista del adrenoceptor β_1 y/o β_2 puede ser cualquier antagonista del adrenoceptor β relativamente no selectivo incluyendo, pero sin limitarse a, alprenolol, oxprenolol, sotalol y timolol. El antagonista del adrenoceptor β_1 y/o β_2 del adrenoceptor puede ser un antagonista del adrenoceptor β_1 selectivo, incluyendo, pero sin limitarse a, nebivolol, atenolol, bisopronol, betaxolol, metoprolol, practolol y CGP20712A. El antagonista del adrenoceptor β puede ser un antagonista del adrenoceptor β_2 selectivo, incluyendo, pero sin limitarse a, ICI118551.

40 El antagonista del adrenoceptor β_1 y/o β_2 , en cantidades terapéuticas puede tener una afinidad relativamente baja, o ninguna afinidad, por el adrenoceptor β_3 y así, deja el adrenoceptor β_3 relativamente desbloqueado. Un antagonista de este tipo incluye, pero no se limita a, metoprolol.

45 Se apreciará que el procedimiento de la invención contempla el uso de cualquier agente adecuado que tiene actividad antagonista del adrenoceptor β_1 y/o β_2 y que en el presente documento se establecen grupos y compuestos específicos a modo de ejemplificación y no a modo de limitación.

Se apreciará que la referencia a los agentes incluye todas las formas de sal (sal de ácido o de base) e hidratos, polimorfos, etc., de esos agentes.

Simpaticolíticos de acción central

50 También es conocido en la técnica el uso de simpaticolíticos de acción central en el tratamiento de la HF. Se espera que el uso combinado de agonistas selectivos del adrenoceptor β_3 con un simpaticolítico de acción central también pueda proporcionar una mejora en el resultado terapéutico para el tratamiento de la HF.

En consecuencia, en el presente documento se describe un procedimiento para el tratamiento de HF o hipertrofia miocárdica en el que se administra uno o más agonistas selectivos del adrenoceptor β_3 a un individuo en un

tratamiento de combinación con uno o más simpaticolíticos de acción central. Los simpaticolíticos de acción central son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los enumerados en The Merck Index, (13ª edición), Merck & Co., Whitehouse Station, N.J., EE. UU., 2004.

Régimen de tratamiento

5 El régimen de tratamiento más apropiado para cualquier paciente particular se puede determinar por el médico responsable y dependerá de una variedad de factores, incluyendo: el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto o agente empleado; la composición empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración; la tasa de secuestro del agente o compuesto; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el
10 tratamiento, junto con otros factores relacionados bien conocidos en medicina.

En base a las expectativas teóricas, los presentes inventores prevén que se puede experimentar un efecto inótrupo negativo clínicamente significativo si los agonistas selectivos del adrenergico β_3 se van a administrar a pacientes con HF. Como tal, la afección de un paciente puede empeorar de forma transitoria antes de que su afección mejore, como es el caso con el comienzo del tratamiento con bloqueo del adrenergico β e inhibidores de la ECA en la
15 HF.

En el modelo animal de insuficiencia cardíaca ejemplificado en el presente documento (véase el ejemplo 6) no se observó ningún empeoramiento inicial.

En consecuencia, en el procedimiento y, donde sea deseable reducir el empeoramiento real o anticipado transitorio de la afección del paciente, se puede usar el tratamiento con uno o más agonistas selectivos del adrenergico β_3 en un paciente ya estabilizado con tratamiento convencional tal como con inhibidores de la ECA, incluyendo pero sin limitarse a captopril, enalapril y lisonopril, antagonistas de la aldosterona y antagonistas del adrenergico β_1 y/o β_2 . Además, la práctica clínica de "comenzar con poco e ir lento" ("starting low and going slow") del tratamiento con antagonista también se puede seguir para el tratamiento con agonista selectivo del adrenergico β_3 .
20

El principio de comenzar con poco e ir lento quiere decir comenzar a una dosis tan baja que los efectos adversos son muy improbables, pero (por otra parte) tampoco se espera ningún efecto beneficioso significativo. Después de un periodo, que puede ser de días o semanas, cuando no se ha observado ningún efecto adverso o sólo efectos adversos menores, se realiza un aumento menor de dosis. Este esquema se continúa hasta que se observen efectos adversos, por ejemplo hipotensión ortostática durante el aumento de dosis de bloqueante beta, o hasta que se alcance una dosis objetivo recomendada. Puede llevar de semanas a meses desde el inicio hasta que se alcanza la
25 dosis objetivo.
30

Se probó que el inhibidor de la ECA, bloqueante beta y antagonista de la aldosterona, tal como espirolactona y eplerenona, son tres clases de fármacos que reducen los síntomas y mejoran la supervivencia en pacientes con HF. Como otro ejemplo de un régimen de tratamiento, la atención farmacológica actual de HF incluye el principio del "tratamiento suplementario". En un régimen de este tipo, el paciente puede comenzar el tratamiento con un inhibidor de la ECA que se puede aumentar hasta un cierto nivel. Después, el tratamiento con un bloqueante beta se puede iniciar (suplementar) y aumentar hasta un cierto nivel y después se inicia el tratamiento con espirolactona. Las afecciones relacionadas con el tratamiento que incorpora el principio del "tratamiento suplementario", también se incluyen en un régimen de tratamiento usando uno o más agonistas selectivos del adrenergico β_3 .
35

Por tanto, la administración de uno o más agonistas selectivos del adrenergico β_3 puede ser como un "tratamiento suplementario", en el que un paciente se puede tratar con un fármaco de cada una de las tres clases inhibidor de la ECA, bloqueante beta y antagonista de la aldosterona, y antes, durante o después de ese tratamiento, el tratamiento con uno o más agonistas selectivos del adrenergico β_3 se puede iniciar, preferentemente usando el principio de comenzar con poco e ir lento. En consecuencia, se apreciará que en este contexto, el término "tratamiento suplementario" se refiere a un entero terapéutico adicional (agonista selectivo del adrenergico β_3); esto no quiere decir que el agonista selectivo del adrenergico β_3 se deba añadir como el último fármaco. El orden y la composición de los fármacos específicos y clases de fármacos en el tratamiento de combinación se puede determinar por el experto en la técnica, y pueden incluir, por ejemplo, cuando el régimen terapéutico implique la administración de cuatro clases de fármacos, el agonista selectivo del adrenergico β_3 puede ser el primer, segundo, tercer o cuarto fármaco que se debe administrar.
40
45

Como otro ejemplo de un régimen de tratamiento, la afección de un paciente se puede estabilizar al menos parcialmente antes de la administración del uno o más agonistas selectivos del adrenergico β_3 . Además, la afección de un paciente se puede estabilizar al menos parcialmente antes del inicio de un procedimiento de la invención. Cualquiera de dichos regímenes de tratamiento se puede denominar como primera estabilización de un paciente.
50

Primera estabilización de un paciente incluye, por ejemplo, cuando no se inicia el tratamiento con inhibidores de la ECA y bloqueantes beta en HF cuando la función cardíaca del paciente está comprometida, típicamente con una presión arterial baja y un gasto cardíaco bajo. Un motivo para posponer el inicio del tratamiento es que estos fármacos pueden empeorar inicialmente la afección induciendo reducciones adicionales en la presión arterial o el
55

gasto cardíaco. Sobre esta base, en primer lugar se estabiliza la afección del paciente, por ejemplo, por optimización del volumen de líquido intravascular (euvolemia), a lo largo de un periodo de, por ejemplo, unos pocos días antes de que se espere que el "empeoramiento menor inicial" se tolere.

5 Las afecciones relacionadas con el inicio de tratamiento con agonistas selectivos del adrenergico receptor β_3 después de la primera estabilización de un paciente pueden ser similares a la situación para el tratamiento con inhibidor de la ECA y bloqueante beta.

10 Como ejemplo adicional de un régimen de tratamiento, un agonista selectivo del adrenergico receptor β_3 puede ser el primer fármaco que se administre en el tratamiento de insuficiencia cardíaca sin ninguna medicación ni estabilización previa. Por ejemplo, el inicio del tratamiento con agonista selectivo del adrenergico receptor β_3 en un paciente únicamente con, o principalmente con, disfunción cardíaca diastólica o en pacientes con hipertrofia miocárdica sin reducir significativamente la función sistólica cardíaca no se espera que induzca ningún efecto secundario inicial.

15 Los compuestos y agentes propuestos para la presente invención se pueden administrar como composiciones terapéuticamente. En una aplicación terapéutica, las composiciones se administran, por ejemplo, a un paciente que ya tiene insuficiencia cardíaca sintomática, en una cantidad suficiente para tratar eficazmente al paciente. También se describen aplicaciones preventivas en las que las composiciones se administran a, por ejemplo, un paciente que tiene hipertrofia miocárdica en una cantidad suficiente para tratar eficazmente al paciente, de este modo al menos ralentizando o evitando la progresión de la enfermedad. La composición debe proporcionar, por tanto, una cantidad del compuesto o agente suficiente para tratar eficazmente al paciente.

20 El nivel de dosis terapéuticamente eficaz para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo: el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto o agente empleado; la composición empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración; la tasa de secuestro del agente o compuesto; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el tratamiento, junto con otros factores relacionados bien conocidos en medicina.

25 Un experto en la técnica sería capaz, por experimentación de rutina, de determinar una cantidad eficaz, no tóxica del agonista selectivo del adrenergico receptor β_3 , y otros agentes cuando sea apropiado, que se requeriría para tratar la afección.

30 En general, se espera que una dosificación eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 0,00001 mg a aproximadamente 1000 mg por kg de peso corporal por 24 horas; típicamente en el intervalo de aproximadamente 0,0001 mg a aproximadamente 1000 mg por kg de peso corporal por 24 horas; típicamente, de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 750 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal por 24 horas. Más típicamente, se espera que un intervalo de dosis eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 25 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal por 24 horas.

40 De forma alternativa, una dosificación eficaz puede ser de hasta aproximadamente 500 mg/m². En general, se espera que una dosificación eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 mg/m², preferentemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 350 mg/m², más preferentemente, de aproximadamente 25 a aproximadamente 300 mg/m², aún más preferentemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 mg/m², incluso más preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 mg/m², e incluso aún más preferentemente de aproximadamente 75 hasta aproximadamente 150 mg/m².

Típicamente, en aplicaciones terapéuticas, el tratamiento podría ser durante la duración del estado de enfermedad.

50 Además, será evidente para un experto en la técnica que la cantidad y espaciado óptimos de las dosificaciones individuales y, cuando se usa el tratamiento de combinación, la cantidad y espaciado óptimos de administración de los diversos agentes del tratamiento de combinación, se determinará por la naturaleza y grado del estado de enfermedad que se está tratando, la forma, vía y sitio de administración, y la naturaleza del individuo particular que se está tratando. Además, dichas condiciones óptimas se pueden determinar por técnicas convencionales.

55 También será evidente para un experto en la técnica que el curso de tratamiento óptimo, tal como, el número de dosis de la composición o composiciones administradas por día durante un número de días definido, se puede comprobar por los expertos en la técnica usando pruebas de determinación de curso de tratamiento convencionales.

Composiciones farmacéuticas

En general, las composiciones adecuadas se pueden preparar de acuerdo con procedimientos que son conocidos por los expertos en la técnica y en consecuencia, pueden incluir un vehículo, diluyente, excipiente y/o coadyuvante farmacéuticamente aceptable.

5 Estas composiciones se pueden administrar por vías estándar. En general, las composiciones se pueden administrar por vía parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraespinal, subcutánea o intramuscular), oral o tópica. Preferentemente, la administración es por la vía parenteral u oral. Más preferentemente, la administración es por la vía oral.

Los vehículos, diluyentes, excipientes y coadyuvantes deben ser "aceptables" en términos de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición y no perjudiciales para el receptor de la misma.

10 Los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables son agua desmineralizada o destilada; solución salina; aceites de origen vegetal tales como aceite de maní, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de cacahuete o aceite de coco; aceites de silicona, incluyendo polisiloxanos, tales como metilpolisiloxano, fenilpolisiloxano y metilfenilpolisiloxano; siliconas volátiles; aceites minerales tales como parafina líquida, parafina blanda o escualano; derivados de celulosa tales como
15 metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio o hidroxipropilmetilcelulosa; alcoholes inferiores, por ejemplo etanol o isopropanol; aralcoholes inferiores; polialquilenglicoles inferiores o alquilenglicoles inferiores, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina; ésteres de ácidos grasos tales como palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo u oleato de etilo; polivinilpirrolidona; agar; carragenina; goma tragacanto o goma arábiga, y vaselina. Típicamente, el vehículo o
20 vehículos formarán de un 10 % a un 99,9 % en peso de las composiciones.

La composición puede incluir agentes que incrementan la biodisponibilidad o la duración terapéutica del compuesto o compuestos activos.

25 Las composiciones de la invención pueden estar en una forma adecuada para su administración por inyección, en forma de una formulación adecuada para ingestión oral (tal como cápsulas, comprimidos, comprimidos oblongos, elixires, por ejemplo), en forma de un ungüento, crema o loción adecuada para administración tópica, en una forma adecuada para su administración como colirio, en una forma de aerosol adecuada para su administración por inhalación, tal como por inhalación intranasal o inhalación oral, en una forma adecuada para su administración parenteral, es decir, inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa.

30 Para la administración como solución o suspensión inyectable, los diluyentes o vehículos no tóxicos parenteralmente aceptables pueden incluir, solución de Ringer, solución salina isotónica, solución salina tamponada con fosfato, etanol y 1,2-propilenglicol.

35 Algunos ejemplos de vehículos, diluyentes, excipientes y coadyuvantes adecuados para uso oral incluyen aceite de maní, parafina líquida, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, alginato de sodio, goma arábiga, goma tragacanto, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, gelatina y lecitina. Además, estas formulaciones oral puede contener agentes saborizantes y colorantes adecuados. Cuando se usa en forma de cápsula, las cápsulas se pueden recubrir con compuestos tales como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo que retrasan la desintegración.

Típicamente, los coadyuvantes incluyen emolientes, emulsionantes, agentes espesantes, conservantes, bactericidas y agentes tamponadores.

40 Las formas sólidas para administración oral pueden contener aglutinantes aceptables en práctica farmacéutica humana y veterinaria, edulcorantes, agentes disgregantes, diluyentes, saborizantes, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes de retraso temporal. Los aglutinantes adecuados incluyen goma arábiga, gelatina, almidón de maíz, goma tragacanto, alginato de sodio, carboximetilcelulosa o polietilenglicol. Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los agentes disgregantes
45 adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma de guar, goma xantana, bentonita, ácido algínico o agar. Los diluyentes adecuados incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato de calcio, silicato de calcio o fosfato de dicalcio. Agentes saborizantes adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, saborizante de cereza, naranja o frambuesa. Los agentes de recubrimiento adecuados incluyen polímeros o copolímeros de ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos,
50 zeína, goma laca o gluten. Los conservantes incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfito de sodio. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato de sodio, cloruro de sodio o talco. Los agentes de retraso temporal adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

55 Las formas líquidas para administración oral pueden contener, además de los agentes anteriores, un vehículo líquido. Los vehículos líquidos adecuados incluyen agua, aceites tales como aceite de oliva, aceite de maní, aceite de sésamo, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de cacahuete, aceite de coco, parafina líquida, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, etanol, propanol, isopropanol, glicerol, alcoholes grasos, triglicéridos o mezclas de los mismos.

5 Las suspensiones para la administración oral pueden comprender además agentes dispersantes y/o agentes de suspensión. Los agentes de suspensión adecuados incluyen carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, alginato de sodio o alcohol acético. Los agentes dispersantes adecuados incluyen lecitina, ésteres de polioxietileno de ácidos grasos tales como ácido esteárico, mono o di-oleato, -estearato o -laurato de polioxietilensorbitol, mono o di-oleato, -estearato o -laurato de polioxietilensorbitano y similares.

Las emulsiones para la administración oral pueden comprender además uno o más agentes emulsionantes. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen agentes dispersantes como se ejemplifica anteriormente o gomas naturales tales como goma guar, goma arábiga o goma tragacanto.

10 Los procedimientos para preparar composiciones para administrar por vía parenteral son evidentes para los expertos en la técnica, y se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 15 ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., incorporado por referencia en el presente documento.

15 Las formulaciones tópicas de la presente invención, comprenden un ingrediente activo junto con uno o más vehículos aceptables, y opcionalmente cualquier otro ingrediente terapéutico. Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas adecuadas para penetrar a través de la piel en el sitio donde se requiere tratamiento, tales como linimentos, lociones, cremas, pomadas o pastas, y gotas adecuadas para su administración en los ojos, oídos o nariz. Las formulaciones adecuadas para administración tópica se pueden proporcionar como un parche transdérmico.

20 Las gotas de acuerdo con la presente invención pueden comprender soluciones o suspensiones oleosas o acuosas estériles. Estas se pueden preparar disolviendo el ingrediente activo en una solución acuosa de bactericida y/o agente fungicida y/o cualquier otro conservante adecuado, e incluyendo opcionalmente un agente tensioactivo. La solución resultante se puede aclarar a continuación por filtración, transferirse a un recipiente adecuado y esterilizarse. La esterilización se puede lograr por: autoclave o manteniendo a 90 °C-100 °C durante media hora, o por filtración, seguida de transferencia a un recipiente por una técnica aséptica. Los ejemplos de agentes bactericidas y fungicidas adecuados para su inclusión en las gotas son nitrato o acetato de fenilmercurio (0,002 %), cloruro de benzalconio (0,01 %) y acetato de clorhexidina (0,01 %). Los disolventes adecuados para la preparación de una solución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

25 Las lociones de acuerdo con la presente invención incluyen las adecuadas para su aplicación en la piel o los ojos. Un colirio puede comprender una solución acuosa estéril que contiene opcionalmente un bactericida y se puede preparar mediante procedimientos similares a los descritos anteriormente con relación a la preparación de gotas. Las lociones o linimentos para su aplicación en la piel también pueden incluir un agente para acelerar el secado y para enfriar la piel, tal como un alcohol o acetona, y/o una crema hidratante tal como glicerol, o aceite tal como aceite de ricino o aceite de cacahuete.

30 Las cremas, pomadas o pastas de acuerdo con la presente invención son formulaciones semisólidas del ingrediente activo por aplicación externa. Se pueden fabricar mezclando el ingrediente activo en forma finamente dividida o en polvo, solo o en solución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con una base grasa o no grasa. La base puede comprender hidrocarburos tales como parafina dura, blanda o líquida, glicerol, cera de abeja, un jabón metálico; un mucílago; un aceite de origen natural tal como aceite de almendra, maíz, cacahuete, ricino u oliva; lanolina o sus derivados, o un ácido graso tal como ácido esteárico u oleico junto con un alcohol tal como propilenglicol o macrogles.

35 La composición puede incorporar cualquier tensioactivo adecuado tal como un tensioactivo aniónico, catiónico o no iónico tal como ésteres de sorbitano o derivados de polioxietileno de los mismos. También se pueden incluir agentes en suspensión tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tal como sílices síliceas, y otros ingredientes tales como lanolina.

40 Las composiciones también se pueden administrar en forma de liposomas. En general, los liposomas se derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas, y se forman por cristales líquidos hidratados mono- o multilaminares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable que pueda formar liposomas. Las composiciones en forma de liposoma pueden contener estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferentes son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Los procedimientos para formar liposomas son conocidos en la técnica, y en relación con esto, se hace referencia específica a: Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33 *et seq.*, del que su contenido se incorpora en el presente documento por referencia.

Ejemplos

55 Los ejemplos están destinados a servir de ilustración de la presente invención y no deben interpretarse como limitativos de la naturaleza general de la divulgación de la descripción a lo largo de la presente memoria descriptiva.

Las figuras 1, 2 y 3 a continuación resumen los experimentos demostrando cómo el agonista selectivo del

adrenorreceptor β_3 BRL 37344 estimula la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de membrana en miocitos cardíacos de conejo aislados. Los experimentos sugieren que la estimulación de la bomba se reduce cuando se usan altas concentraciones del fármaco y que esta inversión de un efecto estimulador de la bomba es probable que se deba a la activación de los adrenorreceptores β_1 y/o β_2 a altas concentraciones de BRL 37344. Los experimentos demuestran que el incremento inducido por BRL 37344 en la actividad de la bomba se debe a la estimulación de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ directa en lugar de a un incremento inducido por BRL 37344 en el flujo de entrada de Na^+ transmembranario y la estimulación de la bomba por un incremento resultante en la concentración de Na^+ intracelular.

Ejemplo 1

Se usó la técnica de pinzamiento zonal de membrana de célula entera (Hamill *et al.*, 1981; Buhagier *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2002) para examinar el efecto de la estimulación del adrenorreceptor β_3 sobre la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en miocitos cardíacos aislados.

Con la técnica de pinzamiento zonal de membrana en célula entera, se suspenden los miocitos en un baño de tejido montado en la fase de un microscopio invertido. Se une una pipeta de vidrio fina a la membrana celular y se aplica una succión moderada para romper la placa de membrana directamente bajo la punta de la pipeta de vidrio. Esto permite que el compartimento intracelular del miocito se perfunda con la solución contenida en la pipeta de placa. También permite el acceso de fármacos y compuestos al compartimento intracelular. Se puede lograr el control de la composición de la solución extracelular en el baño de tejido. La técnica también permite el control del voltaje de membrana y la medida de la corriente de membrana total.

La proporción del intercambio de $3\text{Na}^+ : 2\text{K}^+$ de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ genera una corriente (I_p) que se puede medir como el desplazamiento en la corriente de mantenimiento del miocito fijado en la placa que se induce por el bloqueo de la bomba con ouabaína 100 μM .

En la configuración de célula entera, se perfundió el baño con solución de Tyrode modificada que contenía (en mmol/l) NaCl 140; KCl 5,6; CaCl_2 2,16; MgCl_2 1; NaH_2PO_4 0,44; glucosa 10 y Na-glutamato 9; ácido N-2-hidroxiethyl-piperazin-N'-2-eteno-sulfónico (HEPES) 10. Se ajustó la solución a un pH de $7,40 \pm 0,01$ a 35 °C con NaOH.

Para la medida de I_p , se cambió el sistema a un superperfundido que habitualmente era idéntico a la solución de Tyrode modificada excepto por que estaba nominalmente libre de Ca^{2+} y contenía 0,2 mmol/l de CdCl_2 y 2 mmol/l de BaCl_2 .

Se llenaron pipetas de placa de punta ancha (4-5 μm) con soluciones que contenían (en mmol/l) HEPES 5; MgATP 2; ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 5; KCl 70 mmol/l. Se mantuvo el equilibrio osmótico se mantuvo con 80 mmol/l de cloruro de tetrametilamonio (TMA-Cl). Se ajustaron las soluciones a un pH de $7,05 \pm 0,01$ a 35 °C con 1 mmol/l de TMA-OH. Se identificó la I_p a un potencial de mantenimiento de -40 mV ya que se indujo el desplazamiento en la corriente de mantenimiento por bloqueo de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ con 100 $\mu\text{mol/l}$ de ouabaína 10-15 minutos después de que se hubiera establecido la configuración de célula entera, se informó de I_p normalizada para la capacitancia de membrana y por tanto el tamaño celular. Los detalles de las características y equipo de la pipeta de placa y los criterios para definir I_p se han informado previamente (Buhagiar *et al.*, 1999).

Se determinaron los efectos de diferentes concentraciones de BRL 37344 (Sigma Aldrich) sobre la corriente de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (I_p). La concentración de Na en la solución de pipeta fue de 10 mM, es decir, en un nivel cercano al fisiológico. La figura 1 muestra que en comparación con controles normales, BRL 37344 estimula significativamente la bomba Na,K en los tres niveles de concentración. Al mayor nivel (BRL 37344 100 nM) se observó una actividad menor aparente en comparación con la actividad observada con 10 nM. Esto es probable que se deba a una unión inespecífica de BRL 37344 a adrenorreceptores β_1 y/o β_2 a mayores concentraciones. Se espera que los agonistas de adrenorreceptores β_1 y β_2 inhiban la bomba Na,K miocárdica. Se indican los valores de media, EEM y número de experimentos (n).

Ejemplo 2

Véase la descripción de la técnica de pinzamiento zonal de membrana total de célula entera descrita en el ejemplo 1.

Este experimento examinó si la disminución aparente en la estimulación de la bomba Na,K con exposición a BRL 37344 100 nM en comparación con la estimulación observada con BRL 37344 10 nM puede estar provocada por la estimulación de los adrenorreceptores β_1 y/o β_2 por la mayor concentración de BRL 37344.

El efecto de BRL 37344 100 nM en el superperfundido en ausencia y en presencia del bloqueante del adrenorreceptor β_1 y β_2 combinado nadolol se midió en miocitos.

La figura 2 muestra que el bloqueo de adrenorreceptores β_1 y β_2 con nadolol en presencia de BRL 37344 100 nM incrementó, aunque no muy significativamente, la actividad de la bomba Na,K en comparación a la estimulación observada con BRL 37344 100 nM solo.

Esto sugiere que la estimulación de la bomba Na,K atenuada con la concentración de BRL 37344 alta (véase la

figura 1) fue un resultado de la estimulación de BRL 37344 de los adrenoceptores β_1 y/o β_2 . Estos resultados también confirman que la estimulación de la bomba observada en respuesta al agonista selectivo del adrenoceptor β_3 a las concentraciones menores de 1 nM y 10 nM estaba mediada por β_3 en lugar de los adrenoceptores β_1 y/o β_2 y sugieren que la activación de los adrenoceptores β_1 y/o β_2 puede reducir la actividad de la bomba Na,K. Se indican los valores de media, EEM y número de experimentos (n).

Ejemplo 3

El propósito de este experimento fue el de investigar si la estimulación inducida por el agonista selectivo del adrenoceptor β_3 BRL 37344 de la bomba Na,K está provocada por, o es secundaria a, un incremento en el flujo de entrada de Na^+ en la célula. El incremento en el Na^+ intracelular estimula la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Si el efecto del adrenoceptor β_3 era secundario a un incremento de flujo de entrada de Na^+ en lugar de principalmente la estimulación de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$, entonces se espera que los agonistas selectivos del adrenoceptor β_3 sean perjudiciales en la cardiopatía.

La técnica de pinzamiento zonal de membrana total de célula completa fue similar a la descrita anteriormente excepto por que se eliminó el Na^+ extracelular (se reemplazó NaCl por N-metil-D-glucamina (NMG.Cl)), para descartar cualquier posible flujo de entrada de Na^+ a través de la membrana celular.

La figura 3 muestra que la estimulación inducida por BRL 37344 de la bomba Na,K persistió en ausencia de Na^+ extracelular. Este resultado es consistente con la estimulación que se haya debido a un cambio intrínseco en la función de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en lugar de la debida a un flujo de entrada de Na^+ transsarcolémico inducido por BRL 37344 y, por tanto es consistente con la estimulación de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ directa en lugar de un efecto secundario.

Ejemplo 4

En los ejemplos 1, 2, y 3, se examinó el efecto del agonista adrenérgico β_3 selectivo sintético BRL 37344 sobre la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ sarcolémica. En este ejemplo, se examinó el efecto de la catecolamina natural, noradrenalina (NA). Se usó la técnica de pinzamiento zonal de membrana total de célula entera como se describe en el ejemplo 1.

Se expusieron los miocitos cardíacos aislados a NA 10 nM y se midió la I_p . Como se muestra en la figura 4, la NA indujo un incremento en la I_p . A continuación se examinó el efecto de NA sobre I_p cuando se bloquearon los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 con nadolol. Se expusieron los miocitos a NA 10 nM y a nadolol 1 μM . La figura 4 demuestra que el incremento inducido por NA en I_p persistió en presencia de nadolol. Esto sugiere de forma convincente que el incremento no está mediado por los receptores adrenérgicos β_1/β_2 .

Para obtener un apoyo adicional para esta conclusión, se examinó el efecto de bloqueo de la ruta mensajera intracelular activada clásicamente por los receptores adrenérgicos β_1/β_2 . La activación de los receptores adrenérgicos β_1/β_2 da como resultado la síntesis intracelular de cAMP y la posterior activación de la proteína cinasa activada por cAMP (también conocida como PKA). Se sometieron a pinzamiento los miocitos usando una solución para pipeta de placa que contenía H-89 0,5 μM (diclorhidrato de N-[2-(p-bromocinamilamino)etil]-5-isoquinolinasulfonamida (Calbiochem), un inhibidor de PKA. H-89 a esta concentración suprime mediada por PKA de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ la inhibición de la bomba (William *et al.*, 2003). Como se muestra en la figura 4, el incremento inducido por NA en I_p persistió con el bloqueo de PKA.

Ejemplo 5

En otro grupo de experimentos, se investigó el efecto de activar selectivamente las rutas mensajeras intracelulares acopladas al receptor adrenérgico β_1/β_2 . Puesto que es muy difícil activar selectivamente de forma experimental los receptores de membrana adrenérgicos β_1/β_2 con compuestos extracelulares, se eligió activar directamente la ruta intracelular conocida porque se activa por los receptores, es decir, la proteína cinasa activada por cAMP (PKA). El análogo de cAMP 6-Bnz-cAMP activa la PKA.

Se incluyeron 100 μM de 6-Bnz-cAMP en las soluciones de la pipeta de placa que perfundieron el compartimento intracelular. Los miocitos se expusieron al superperfundido de control libre de NA. Como se muestra en la figura 5, el análogo 6-Bnz-cAMP incluido en la solución de pipeta indujo una disminución significativa en I_p . Para determinar que la disminución inducida por 6-Bnz-cAMP en I_p estaba mediada por PKA, también se midió la I_p usando soluciones de pipeta que incluían 6-Bnz-cAMP así como H-89. Se esperaba que este último inhibiera la PKA activada por 6-Bnz-cAMP. Los resultados se incluyen en la figura 5 y demuestran que H-89 (0,5 μM) invirtió la disminución inducida por 6-Bnz-cAMP en I_p .

Tomados conjuntamente, los resultados presentados en el presente documento indican que la activación de los receptores adrenérgicos β_1/β_2 provoca la inhibición de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ mientras que la activación de los receptores adrenérgicos β_3 provoca la estimulación de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Esto proporciona una explicación para la eficacia ya establecida de los bloqueantes de receptores adrenérgicos β_1/β_2 en la insuficiencia cardíaca humana, e identifica al receptor adrenérgico β_3 como un fármaco objetivo totalmente nuevo. Se espera que la estimulación del receptor promueva la exportación de Na^+ desde las células sobrecargadas de Na^+ en la insuficiencia cardíaca, proporcionando de este modo un efecto terapéutico beneficioso.

El papel de los receptores adrenérgicos β_3 está soportado por la incapacidad de bloqueo de β_1/β_2 con nadolol para bloquear la estimulación de la bomba, por la persistencia de la estimulación cuando se bloquean las rutas mensajeras intracelulares activadas clásicamente por receptores β_1/β_2 y por el efecto del agonista selectivo adrenérgico β_3 selectivo BRL 37344 para inducir la estimulación de I_p .

5 Ejemplo 6

Efecto de BRL 37344 sobre el rendimiento cardíaco en el modelo ovino de insuficiencia cardíaca

Para examinar el efecto de la activación aguda del receptor de β_3 se usó un modelo de miocardiopatía isquémica con insuficiencia cardíaca grave inducida por microembolia coronaria repetida en ovejas (Huang, Y *et al.*, Am J Physiol 286: H2141-50, 2004). El modelo es estable y refleja bien la afección humana (Huang *et al.*, 2004).

10 Se administró BRL 37344 por infusión intravenosa durante un periodo de 8 min, comenzando con la dosis más baja del protocolo. Después de 5 min adicionales, se determinaron las relaciones de presión-volumen como se describe (Huang *et al.*, 2004). A continuación, se repitió el procedimiento de forma idéntica usando una dosis mayor de BRL 37344. Se usó la relación de presión-volumen telesistólica ventricular izquierda (ESPVR) como un índice de
15 rendimiento cardíaco. La ESPVR es relativamente independiente de los factores de confusión tales como pre- y poscarga y frecuencia cardíaca, y está aceptada ampliamente como un buen índice de la función ventricular izquierda.

Los resultados se muestran en la figura 6, tanto antes como después de la inducción de insuficiencia cardíaca. La variable independiente en las abscisas indica la dosis en microgramos de BRL 37344 por kg de peso de la oveja. Obsérvese el incremento logarítmico en la dosis. La media de la ESPVR medida en 3 ovejas diferentes antes y
20 después de la inducción de insuficiencia cardíaca grave se muestra en las ordenadas. Un análisis de regresión lineal de una transformación logarítmica de la dosis de BRL 37344 frente a ESPVR indicó una tendencia hacia una pendiente negativa en una oveja normal consistente con un empeoramiento dependiente de la dosis en la función ventricular izquierda. En contraste, la pendiente fue significativamente positiva después de que se hubiera inducido la insuficiencia cardíaca en la oveja, lo que indica una mejora dependiente de la dosis en la función ventricular
25 izquierda con la administración de BRL 37344. Se concluye que la activación de los receptores adrenérgicos β_3 tiene efectos beneficiosos inmediatos en la insuficiencia cardíaca, lo que es consistente con las expectativas de los inventores en base a los resultados presentados en el presente documento para la estimulación *in vitro* de la bomba Na^+-K^+ .

Sumario

30 En general, un cambio en la concentración de Na^+ intracelular tiene efectos opuesto bajo condiciones fisiológicas normales y bajo condiciones de insuficiencia cardíaca. En el corazón normal, un incremento en la concentración de Na^+ intracelular provoca un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y, por tanto, una potenciación de la contractilidad. Sin embargo, sólo ligeros incrementos en el Na^+ intracelular mejoran el rendimiento cardíaco, y un incremento de unos pocos mM más allá de lo "normal" tiene efectos adversos. En la insuficiencia cardíaca, el Na^+
35 intracelular ya está aumentado, e incrementos adicionales afectan al rendimiento. Los presentes inventores describen, por primera vez en el presente documento, un procedimiento para activar directamente la bomba de membrana celular que extrude el Na^+ de las células. Como se apoya por los ejemplos en el presente documento, se espera que esto reduzca el Na^+ hacia la normalidad en las células sobrecargadas de Na^+ y, por tanto, potencia el rendimiento cardíaco. El procedimiento para activar la extrusión de Na^+ de las células implica el uso de uno o más
40 agonistas selectivos del adrenorreceptor β_3 .

Cualquier descripción de los documentos de la técnica anterior en el presente documento, o afirmaciones en el presente documento derivadas de o basadas en esos documentos, no es una admisión de que los documentos o afirmaciones derivadas son parte del conocimiento general común de la técnica relevante en Australia o en cualquier otro lugar.

45 Aunque se ha descrito la invención de la manera y como se detalla anteriormente, se apreciará por los expertos en la técnica que se pueden realizar numerosas variaciones y/o modificaciones incluyendo varias omisiones, sustituciones y/o cambios en la forma o detalle a la invención, como se muestra en los modos de realización específicos sin apartarse del espíritu o alcance de la invención como se ha descrito ampliamente. Los presentes modos de realización, por tanto, se deben considerar en todos los respectos como ilustrativos y no restrictivos.

50 Lista de referencias

Bloom, J. y Claus, T. Drugs Future 1994, 19:23. Buhagiar KA, Hansen PS, Gray DF, Mihailidou AS y Rasmussen HH. Angiotensin regulates the selectivity of the Na^+-K^+ pump for intracellular Na^+ . Am J Physiol 277: C461-C468, 1999.

55 Buhagiar KA, Hansen PS, Kong BY, Clarke RJ, Fernandes C y Rasmussen HH. Dietary cholesterol alters Na^+/K^+ selectivity at intracellular Na^+/K^+ pump sites in cardiac myocytes. Am J Physiol Cell Physiol 286: C398-C405, 2004.

- Bundgaard H, Havndrup O, Andersen PS, Larsen LA, Brandt NJ, Vuust J, Kjeldsen K, Christiansen M. Familial hypertrophic cardiomyopathy associated with a novel missense mutation affecting the ATP-binding region of the cardiac beta-myosin heavy chain. *J Mol Cell Cardiol.* 1999, 31(4):745-50. Cantello, B. y Smith, S., *Drugs Future* 1991, 16:797.
- 5 Cecchi, R., *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.* 1994, 29:259. Cheng HJ, Zhang ZS, Onishi K, Ukai T, Sane DC y Cheng CP. Upregulation of functional be-ta(3)-adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circ Res* 89: 599-606, 2001. Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Brill A, Balligand JL y Le Marec H. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 102: 1377-1384, 1998.
- 10 Gheorghiadu, M. *et al* 2003, Braunwauld, Heart Diseases, 6ª edición.
- Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (9ª edición), McGraw-Hill, 1995.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B y Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100, 1981.
- 15 Hansen PS, Buhagiar KA, Kong BY, Clarke RJ, Gray DF y Rasmussen HH. Dependence of Na⁺-K⁺ pump current-voltage relationship on intracellular Na⁺, K⁺, and Cs⁺ in rabbit cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1511-C1521, 2002.
- Harada, H *et al*, Novel and potent human and rat (53-Adrenergic receptor agonists containing substituted 3-indolylalkylamines, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13 (2003): 1301-1305..
- 20 Hool, LC *et al.*, *Am J Physiol* 271 :C172-180, 1996. Huang, Y., *et al.*, Remodeling of the chronic severely failing ischemic sheep heart after coronary microembolization: functional, energetic, structural, and cellular responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H2141-50, 2004.
- Jong P, Vowinckel E, Liu PP, Gong Y y Tu JV. Prognosis and determinants of survival in patients newly hospitalized for heart failure: a population-based study. *Arch Intern Med* 162:1689-1694, 2002.
- 25 Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, KupkaMJ, HoKK, MurabitoJM y Vasan RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 347: 1397-1402, 2002.
- Mihailidou AS *et al.*, *Circ Res* 86: 37-42, 2000.
- Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C y Balligand JL. Upregulation of beta(3)-adren-oceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 103: 1649-1655,2001.
- 30 Morimoto A, Hasegawa H, Cheng HJ, Little WC y Cheng CP. Endogenous {beta}3-Adrenoceptor Activation Contributes to Left Ventricular and Cardio-myocyte Dysfunction in Heart Failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*: 2004.
- Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y.(1976).
- Remington's *Pharmaceutical Science*, 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa.
- 35 Souza, J., *et al.*, *Curr. Pharm. Des.* 2001, 7:1433.
- The Merck Index, (13ª edición), Merck & Co., White-house Station, N.J., USA, 2004.
- Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J.* 2001 Mar;141(3):334-41.
- 40 Verdecchia P, Angeli F, Borgioni C, Gattobigio R, de Simone G, Devereux RB, Porcellati, C. Changes in cardiovascular risk by reduction of left ventricular mass in hypertension: a meta-analysis. 2003, *Am J Hypertens.* 2003 Nov; 16(11 Pt 1):895-9.
- Weber, A. *Annu. Rep. Med. Chem.* 1998, 33:193.
- Weyer, C, *et al.*, *Diabetes Metab.* 1999, 25:11.
- 45 William, M., Vein, J., y Rasmussen, H. Biphasic effect of atrial natriuretic peptide on the sarcolemmal sodium pump. *Biophys.J. Suppl* 84-2, 191a. 2003. Yanagisawa T, Sato T, Yamada H, Sukegawa J, Nu-noki K. Selectivity and potency of agonists for the three subtypes of cloned human beta-adrenoceptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Tohoku J Exp Med.* 2000 Nov;192(3):181-93.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agonistas selectivos del adrenerreceptor β_3 que tienen actividad estimuladora preferencial hacia el adrenerreceptor β_3 para su uso en el tratamiento de un ser humano que padece insuficiencia cardíaca sintomática, el uso, comprendiendo el uso además el uso de uno o más bloqueantes β_3 .
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el ser humano tiene uno o más síntomas clínicos de insuficiencia cardíaca.
- 10 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agonista selectivo del adrenerreceptor β_3 está seleccionado del grupo que consiste en ariletanolaminas, ariloxipropanolaminas y trimetoquinoles.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agonista selectivo del adrenerreceptor β_3 es BRL37344.
5. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el bloqueante β es nadolol.
- 15 6. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el bloqueante β es un antagonista del adrenerreceptor β_1 y/o β_2 .
7. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el uso de uno o más bloqueantes β es anterior a, simultáneamente con o posterior al uso de los uno o más agonistas selectivos del adrenerreceptor β_3 .
- 20 8. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende además estabilizar al menos parcialmente al ser humano antes del uso de dicho agonista selectivo del adrenerreceptor β_3 .
- 25 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicha estabilización comprende el tratamiento con uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de la ECA, antagonistas de la aldosterona y antagonistas del adrenerreceptor β .

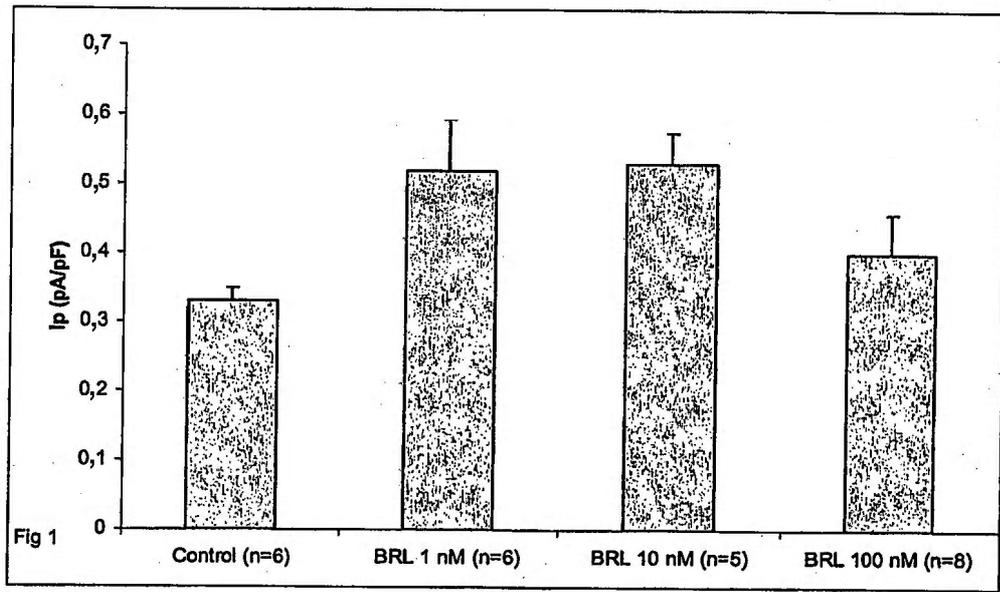


Figura 1

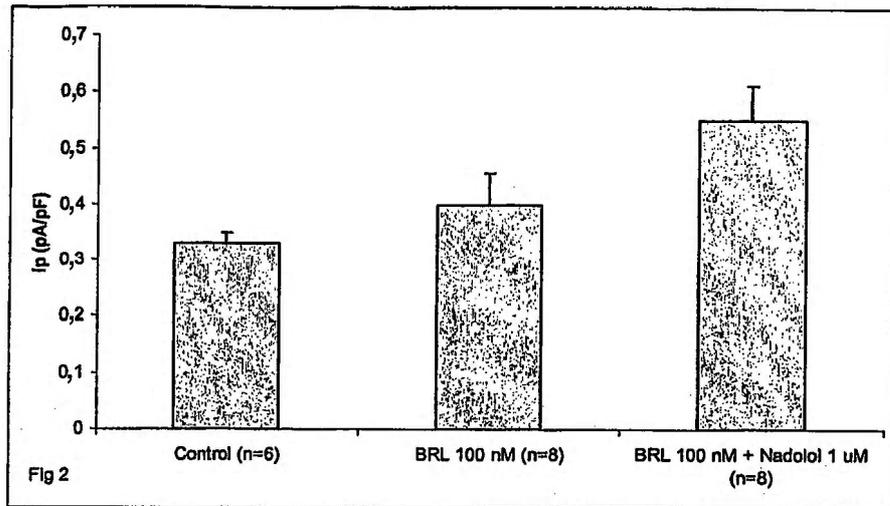


Figura 2

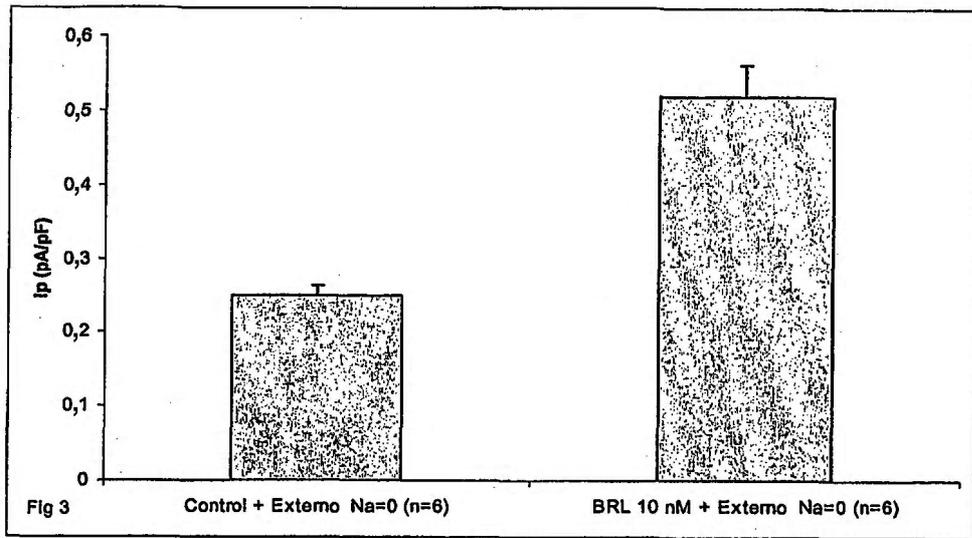


Figura 3

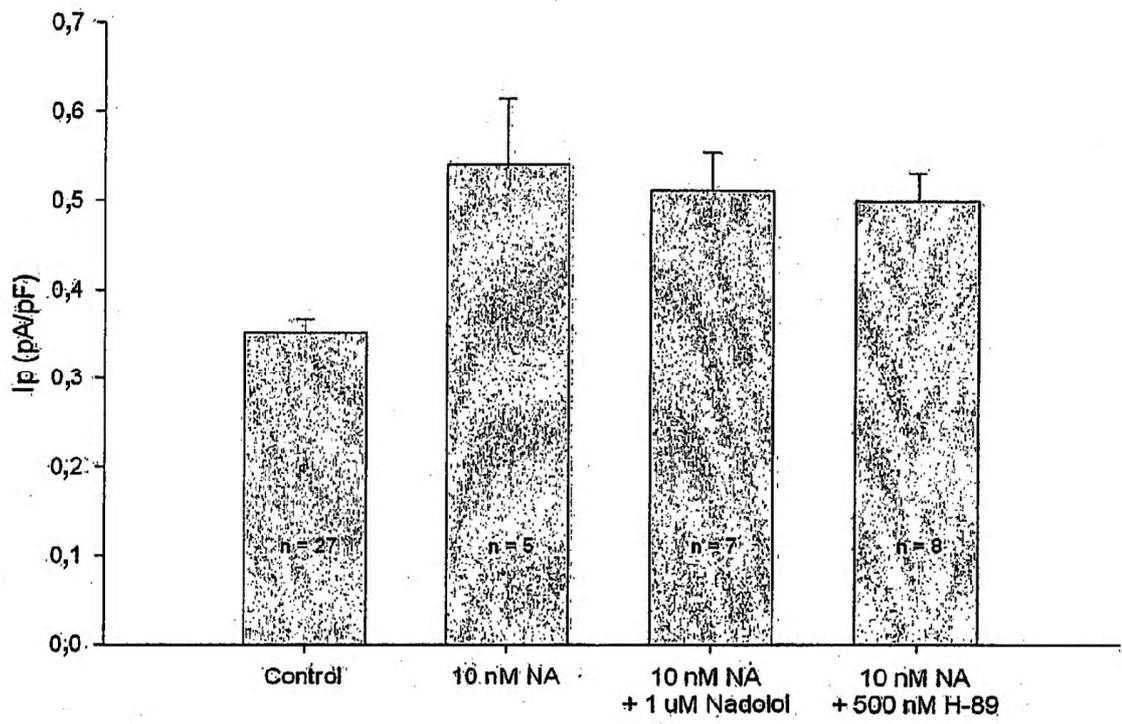


Figura 4

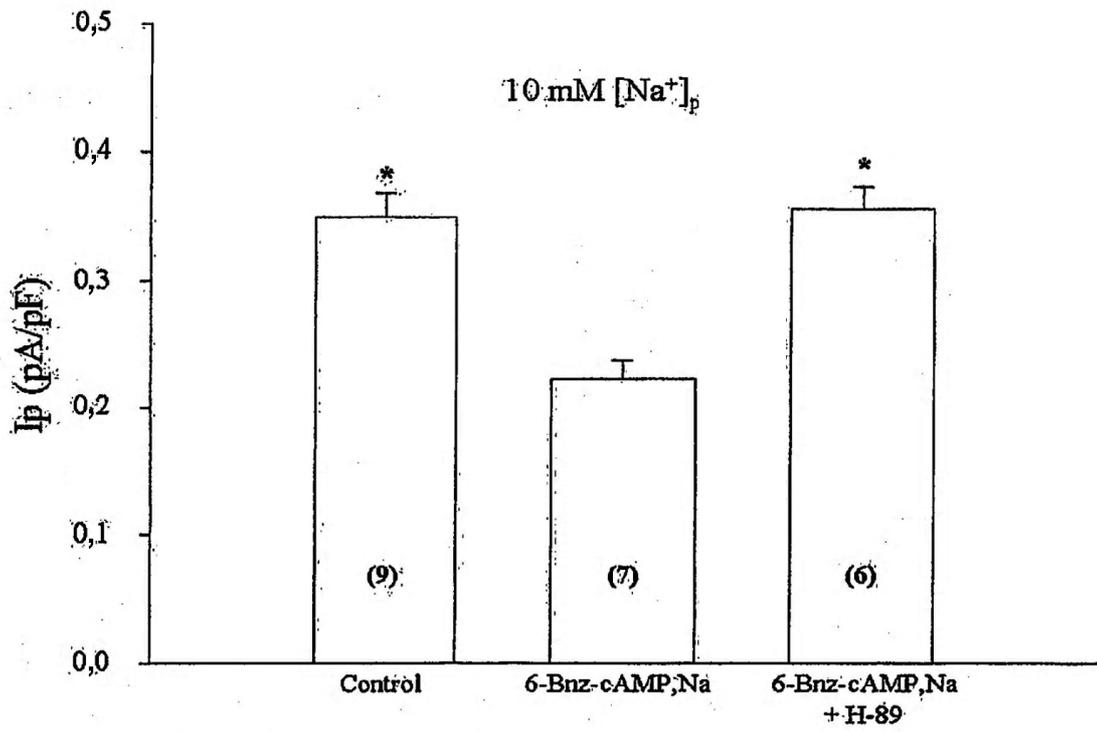


Figura 5

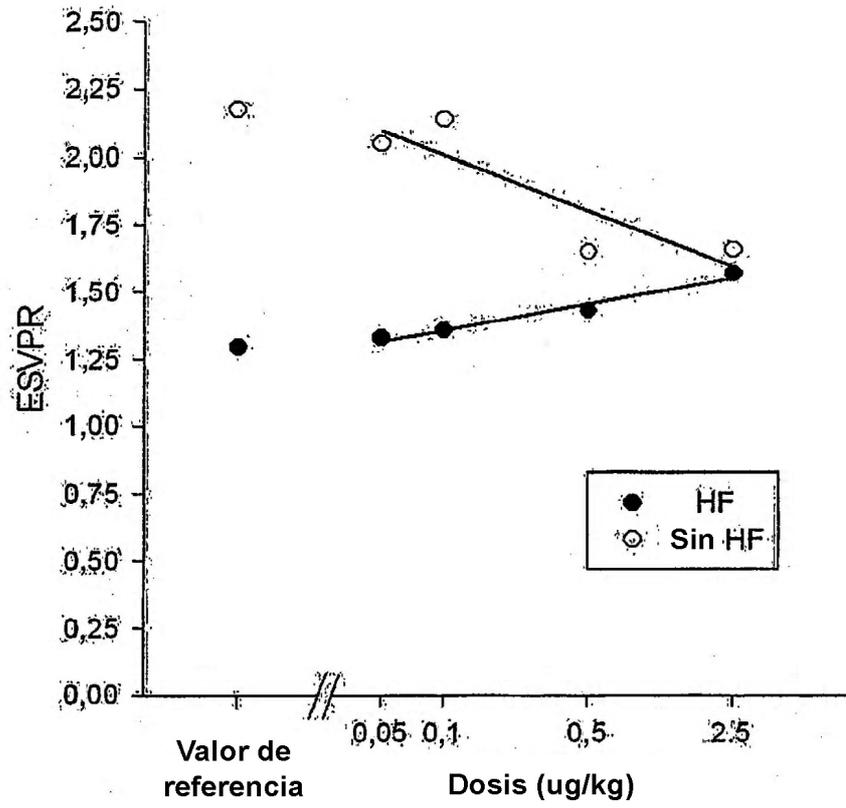


Figura 6