

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 659**

51 Int. Cl.:

A61K 31/522	(2006.01)	A61K 47/26	(2006.01)
A61K 31/40	(2006.01)	A61K 47/38	(2006.01)
A61K 31/403	(2006.01)	A61K 47/44	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)	A61K 9/20	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)	A61K 9/48	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01)		
A61P 9/04	(2006.01)		
A61P 9/10	(2006.01)		
A61K 47/06	(2006.01)		
A61K 9/02	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2012 PCT/US2012/032378**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12154340**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2012 E 12715516 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2694074**

54 Título: **Uso de antagonistas del receptor de la adenosina A2B para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca y la arritmia en pacientes después de un infarto de miocardio**

30 Prioridad:

07.04.2011 US 201161473110 P
07.06.2011 US 201161494222 P
21.12.2011 US 201161578728 P
30.03.2012 US 201261618581 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2017

73 Titular/es:

GILEAD SCIENCES, INC. (100.0%)
333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US

72 Inventor/es:

BELARDINELLI, LUIZ;
ZHONG, HONGYAN y
ZENG, DEWAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 599 659 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

Uso de antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y la arritmia en pacientes después de un infarto de miocardio

5

Campo de la invención

La divulgación se dirige a compuestos para su uso en la reducción de la arritmia en un paciente humano que ha sufrido un infarto de miocardio (IM).

10

Antecedentes

El infarto agudo de miocardio (IAM) se caracteriza por la necrosis isquémica del miocardio seguida de una respuesta inflamatoria intensa. El alcance de la pérdida inicial de miocardio viable y la intensidad de la respuesta inflamatoria son ambos predictores independientes de la remodelación cardíaca subsiguiente caracterizada por la dilatación y la disfunción cardíacas. La lesión miocárdica puede inducir fibrosis cardíaca que conduce a arritmias e insuficiencia cardíaca. Cada año, aproximadamente 200.000 personas sufren IMCEST agudo (infarto de miocardio con elevación del segmento ST), que tiene aproximadamente un 20 % de mortalidad en un año. En 2011, hubo aproximadamente 7,6 millones de pacientes de infarto de miocardio, y se estimó que el 10-70 % de ellos progresaría a insuficiencia cardíaca en un plazo de 5 años.

15

20

Sin embargo, no todas las fibrosis cardíacas producidas después de un infarto de miocardio (IM) son perjudiciales. Por ejemplo, inmediatamente después de un IAM, los tejidos de la zona infartada se someten a una reparación fibrótica compensatoria de la zona necrótica con la formación de cicatrices. Sin la reparación fibrótica adecuada y la cicatrización, el corazón se puede romper, lo que podría ser letal.

25

Por el contrario, la remodelación patológica del VI durante la fase de mala adaptación puede conducir a insuficiencia cardíaca y arritmia. Por lo tanto, la inhibición ciega de la fibrosis cardíaca, en momentos o ubicaciones incorrectos, no sería eficaz en el restablecimiento de la función cardíaca y la reducción de la muerte de los pacientes después de un IM. Más bien, estos tratamientos pueden dar lugar a graves efectos adversos.

30

La fibrosis intersticial impide el acoplamiento normal de los miocitos cardíacos y crea un sustrato para la arritmia, que podría conducir a la muerte cardíaca repentina.

35

La fibrosis cardíaca se ha asociado con el proceso de insuficiencia cardíaca que conduce a varias enfermedades del corazón, incluyendo aquellas asociadas con la sobrecarga de volumen y presión (Weber *et al.*, *Circ.*, 83:1849-1865 (1991); Schaper *et al.*, *Basic Res. Cardiol.*, 87:S1303-S1309 (1992); Boluyt *et al.*, *Circ. Res.*, 75:23-32 (1994); y Bishop *et al.*, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 22:1157-1165 (1990)). En el caso de la insuficiencia cardíaca, la fibrosis implica un aumento tanto en el número de fibroblastos como en la deposición matricial (*Cardiovasc. Res.*, 30: 537-543 (1995)), lo que sugiere la importancia de los fibroblastos en el desarrollo de dicha afección.

40

La adenosina (Ado) es una pequeña molécula ubicua liberada en respuesta a la lesión tisular que potencia la hiperemia y modula la inflamación a través de la interacción con uno de los cuatro tipos de receptores de la membrana de la superficie celular. En algunos modelos de bloqueo de la inflamación de la A_{2B}, el AdoR ha limitado la intensidad de la respuesta inflamatoria y ha mejorado la cicatrización, mientras que en otros, la señalización de AdoR de A_{2B} pareció inhibir la inflamación. Por lo tanto, no se puede generalizar el papel de AdoR de A_{2B}. El documento WO03/105666 desvela antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} que tienen uso en la prevención, la limitación o el tratamiento de la lesión de isquemia y reperfusión.

45

Sumario

La presente divulgación se dirige al descubrimiento sorprendente e inesperado de que los antagonistas del receptor de adenosina A_{2B} inhiben la remodelación patológica del ventrículo izquierdo (VI) y aumentan la fracción de eyección del VI. En los pacientes que han sufrido un infarto de miocardio (IM), la inhibición de la remodelación del VI puede traducirse en una mejora de la función del VI y una menor incidencia de arritmias, lo que, a su vez, puede reducir la muerte cardiovascular (VC) y la hospitalización.

55

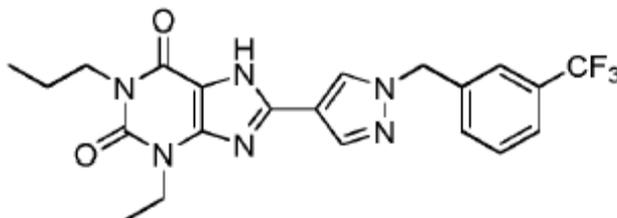
También se ha descubierto que el receptor de la adenosina A_{2B} (AdoR) es el subtipo predominante de AdoR expresado en los fibroblastos cardíacos humanos (FCH), y la activación de este receptor aumenta la liberación de IL-6 y la producción de colágeno, la expresión de marcadores fibróticos y la liberación de biomarcadores de enfermedades cardiovasculares (ECV). En particular, se ha descubierto que un antagonista del receptor de la adenosina A_{2B} podría abolir completamente dicha activación, reduciendo así la respuesta fibrótica en las enfermedades del corazón, lo que conduciría a la inhibición de la dilatación del VI y al aumento de la fracción de eyección del VI.

60

65

En vista de lo anterior, la divulgación se dirige a los compuestos reivindicados para su uso en la reducción de la incidencia de la arritmia en un paciente que ha sufrido infarto de miocardio (IM). En algunas realizaciones, se reduce la muerte u hospitalización mediante el tratamiento de la arritmia.

- 5 El antagonista del receptor de la adenosina A_{2B} es *N*-(6-amino-1-etil-2,4-dioxo-3-propil-1,2,3,4-tetrahidro-pirimidin-5-il)-1-(3-(trifluorometil)bencil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida, denominado a lo largo del documento Compuesto A, que tiene la siguiente fórmula química:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

Breve descripción de las figuras

Las **FIG. 1A-D** muestran que los efectos de NECA sobre la liberación de IL-6, colágeno, ST-2 y PAPPa, y sobre la expresión de α -actina del músculo liso (SMA α) y procolágeno α -1 (Col1A1) se suprimieron por completo mediante una antagonista selectivo del AdoR de A_{2B}, el Compuesto A (Comp A).

15

La **FIG. 2** muestra que el tratamiento con el Compuesto A (Comp A) redujo significativamente la actividad de la caspasa-1 (panel izquierdo), redujo el diámetro telediastólico (panel central izquierdo), aumentó la fracción de eyección del VI (panel central derecho) y redujo el índice de función miocárdica (panel derecho) en comparación con el vehículo tras un infarto agudo de miocardio en ratones.

20

La **FIG. 3** es la línea de tiempo para el estudio del Ejemplo 4.

La **FIG. 4** muestra que la administración del antagonista del AdoR de A_{2B}, el Compuesto A (Comp A), realizada inmediatamente después de la ligadura coronaria (4 mg/kg i.p. dos veces al día) previno la activación de la caspasa-1 en el tejido cardiaco, medida 72 horas después de la cirugía, e inhibió significativamente el reclutamiento leucocitario (CD45⁺) en el corazón. *P < 0,001 frente a simulada; #P < 0,01 frente al vehículo. N = 4-6 por grupo.

25

La **FIG. 5** incluye gráficos para mostrar que el tratamiento con el antagonista del AdoR de A_{2B}, el Compuesto A, condujo a una reducción significativa de los niveles en plasma de marcadores inflamatorios asociados con el IAM. Las concentraciones en plasma de IL-6, TNF- α , sE-selectina, sICAM y sVCAM se midieron usando Luminex el día 28 después de la cirugía. +P < 0,05 frente al vehículo; *P < 0,001 frente al vehículo.

30

La **FIG. 6** presenta imágenes ecocardiográficas ilustrativas en modo B y modo M de un ratón tratado con vehículo (paneles superiores) y de uno tratado con el antagonista del AdoR de A_{2B}, Compuesto A (paneles inferiores) 2 semanas después de la cirugía de infarto agudo de miocardio.

35

Las **FIG. 7A-F** muestran que, después de la cirugía de ligadura de la arteria coronaria, los ratones tratados con vehículo resultaron tener una importante dilatación de los ventrículos izquierdo y derecho (diámetro telediastólico ventricular izquierdo (DTDVI) (**A**), diámetro telesistólico ventricular izquierdo (DTSVI) (**B**) y la superficie telediastólica ventricular derecha (STDVD)) (**E**) y una reducción significativa de la función ventricular izquierda y derecha (fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) (**C**), índice de función miocárdica (IFM) (**D**) y desplazamiento sistólico del plano del anillo tricuspídeo (DSPAT)) (**F**). El tratamiento con el antagonista del AdoR de A_{2B}, el Compuesto A (4 mg por vía i.p. dos veces al día) limitó significativamente la dilatación y la disfunción del corazón. *P < 0,001 frente al valor basal (o simulado), + P < 0,001 frente al vehículo.

40

45

Las **FIG. 8A-D** muestran que la expresión de cuatro biomarcadores inflamatorios, MCP-1, IL-1b, IL-2 e IL-6, se redujo mediante el tratamiento con el Compuesto A, y para dos de ellos, MCP-1 e IL-1b, la reducción en el grupo de 10 mg/kg/día fue estadísticamente significativa.

50

Las **FIG. 9A-D** muestran el DTDVI (**A**), (DTSVI) (**B**), STDVD (**C**) e IFM (**D**) medidos usando ECHO⁶ el Día 28. Los valores se presentan como la media \pm ETM. n = 4-9. *, p < 0,05 en comparación con el control simulado; #, p < 0,05 en comparación con IM. Las estadísticas se determinaron usando ANOVA seguido de la prueba de Bonferroni. Estas cifras demuestran que el Compuesto A inhibe la remodelación adversa del miocardio tras un IM y mejora la función miocárdica.

55

Las **FIG. 10A-C** muestran niveles en plasma de ST2 (A) IL-6 (B) y TNF- α (C) y los valores se presentan como la media \pm ETM. n = 4-8. *, p < 0,05 en comparación con el control simulado; #, p < 0,05 en comparación con IM. Las estadísticas se determinaron usando ANOVA seguido de la prueba de Bonferroni. Estas cifras demuestran que el Compuesto A reduce los biomarcadores en plasma de las citocinas inflamatorias en un modelo de ratón de remodelación miocárdica tras un IM.

Las **FIG. 11A-C** presentan niveles en plasma de sE-selectina (A), sICAM (B) y sVCAM (C). Los valores se presentan como la media \pm ETM. n = 4. *, p < 0,05 en comparación con el control simulado; #, p < 0,05 en comparación con IM. Las estadísticas se determinaron usando ANOVA seguido de la prueba de Bonferroni. Estas cifras demuestran que el Compuesto A reduce los niveles en plasma de las moléculas de adhesión solubles en un modelo de ratón de remodelación miocárdica tras un IM.

Las **FIG. 12A-B** incluye gráficos que muestran que el Compuesto A redujo el volumen telesistólico ventricular izquierdo (A) y aumentó la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (B). El volumen telesistólico ventricular izquierdo (A) (VTSVI) en el grupo de IM e IM + Compuesto A se midió usando ECHO al inicio del estudio, de 1 semana y 5 semanas después del IM. Los valores se presentan como la media \pm ETM. n = 13. *, p < 0,05 en comparación con el control de vehículo usando ANOVA seguido de la prueba de Bonferroni. (B) la FEVI en el control del vehículo (IM) y el compuesto de un grupo (IM + Compuesto A) se midió usando ECHO al inicio del estudio, 1 semana y 5 semanas tras un IM. El FEVI se calculó usando la fórmula: $(VDFVI-VTSVI)/VDFVI \times 100$. Los valores se presentan como la media \pm ETM. n = 13. *, p < 0,05 en comparación con el control del vehículo usando ANOVA seguido de la prueba de Bonferroni.

Las **FIG. 13A-B** son mapas de vectores de conducción de las paredes anteriores del VI que muestran flechas más pequeñas de velocidad de conducción cerca de las zonas de IM designadas más notables en el control del vehículo (A) en comparación con la muestra de Compuesto A (B).

Las **FIG. 14A-C** muestran que el Compuesto A aumenta las velocidades de conducción en las zonas de infarto y las zonas limítrofes del infarto (ZLI). La VC para las zonas normal (A), limítrofe (B) y del infarto (C) en las ratas con IM tratadas con control de placebo y Compuesto A en varias duraciones del ciclo de estimulación. *, p < 0,05 en comparación con el control de placebo.

Las **FIG. 15A-B** son imágenes de microscopía de alta potencia (x 100) de ZLI teñidas con rojo sirio (que se muestra como gris oscuro) para la fibrosis con tinción de contraste rápida con verde (gris claro). La fibrosis se extendió en una distribución en forma de dedo de la zona infartada a las zonas limítrofes para el control del vehículo (A), pero en menor grado para la muestra de Compuesto A (B). Estas imágenes demuestran que el Compuesto A reduce la fibrosis en la ZLI.

Las **FIG. 16A-C** muestran niveles en plasma de IL-6 (A), PAI-1 (B) y BNP (C) medidos usando Luminex a las 5 semanas del IM. Los valores se presentan como la media \pm ETM. n = 4-8. *, p < 0,05 en comparación con el control normal; #, p < 0,05 en comparación con el IM. Las estadísticas se determinaron usando ANOVA seguido de la prueba de Bonferroni. Estas cifras demuestran que el Compuesto A reduce los biomarcadores en plasma en el modelo de rata de remodelación tras un IM.

La **FIG. 17** es un diagrama que muestra la liberación de IL-6 de los miocitos cardiacos humanos tratados con NECA, junto con el Compuesto A, B o C, a las dosis indicadas.

La **FIG. 18** ilustra un mecanismo propuesto mediante el que el Compuesto A inhibe la remodelación VI patológica tras un IM y mejora las funciones cardiacas.

50 Descripción detallada

Antes de describir la presente divulgación con mayor detalle, se definirán los siguientes términos y expresiones.

Se ha de entender que la presente divulgación no se limita a las realizaciones descritas en particular, y que como tal, puede, por supuesto, variar. Se ha de entender también que la terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente divulgación solo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

Cabe señalar que, como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "ella" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

1. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente

divulgación. Como se usan en el presente documento, los siguientes términos y expresiones tienen los siguientes significados.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" o el término "comprende/n" pretende significar que las composiciones y los métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. "Que consiste esencialmente en", cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará que excluye otros elementos de cualquier significado esencial para la combinación con el fin indicado. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos según lo definido en el presente documento no excluiría otros materiales ni etapas que no afectaran materialmente a la/s característica/s básica/s y nueva/s de la divulgación reivindicada. "Que consiste en" significará que excluye más de los elementos traza de otros ingredientes y etapas sustanciales de los métodos. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de la presente divulgación.

15 El término "aproximadamente", cuando se usa antes de una designación numérica, por ejemplo, temperatura, tiempo, cantidad y concentración, incluyendo intervalos, indica aproximaciones que pueden variar en (+) o (-) un 10 %, 5 % o 1 %.

20 El término "tratamiento" significa cualquier tratamiento de una enfermedad en un paciente, que incluye: (i) prevenir la enfermedad, es decir, hacer que los síntomas clínicos no se desarrollen; (ii) inhibir la enfermedad, es decir, detener el desarrollo de los síntomas clínicos; y/o (iii) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de los síntomas clínicos. A modo de meramente ilustrativo, el tratamiento puede incluir la mejora de la función ventricular derecha y/o el alivio de los síntomas, incluyendo, pero sin limitación, disnea de esfuerzo, fatiga, dolor en el pecho y combinaciones de los mismos.

25 Como se usa en el presente documento, el término "mejorar", cuando se usa en referencia a la gravedad de una afección patológica, significa que se reducen los signos o síntomas asociados con la afección, o la mejora del estado del sujeto. Los signos o síntomas que han de controlarse serán característicos de una determinada afección patológica y serán bien conocidos por el médico experto, al igual que los métodos de control de los signos y de las condiciones.

30 El término "paciente" se refiere normalmente a un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano.

35 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad de un compuesto, tal como un antagonista del receptor de la adenosina A_{2B} , que es suficiente para efectuar el tratamiento, como se ha definido anteriormente, cuando se administra a un paciente en necesidad de dicho tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo de la actividad o de la vía de administración específicas del agente que se esté usando, la gravedad del estado patológico del paciente y la edad, el estado físico, la existencia de otros estados patológicos y el estado nutricional del paciente. Además, otra medicación que el paciente pueda estar recibiendo afectará a la determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico que se vaya a administrar.

40 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar principios activos suplementarios a las composiciones.

2. Compuestos para su uso

50 Como se ha indicado anteriormente, la presente divulgación se refiere a compuestos para su uso en la reducción de la arritmia en un paciente que ha sufrido un infarto de miocardio (IM). En una realización, los métodos descritos en el presente documento pueden reducir la muerte u hospitalización en los pacientes mediante el tratamiento de la insuficiencia cardiaca o la arritmia. Además, dichos métodos mejoran el estado cardiaco de los pacientes que han sufrido infarto de miocardio (IM).

55 Se ha descubierto en el presente documento que el receptor de la adenosina A_{2B} (AdoR) es el subtipo predominante de los AdoR expresados en los fibroblastos cardiacos humanos (FCH), y la activación de este receptor aumenta la liberación de IL-6 y la producción de colágeno, la liberación de marcadores fibróticos y la liberación de biomarcadores de enfermedades cardiovasculares (ECV).

60 Además, la N-etilcarboxamida-adenosina (NECA), un análogo estable de la adenosina, aumentó significativamente la liberación de IL-6 de una manera dependiente de la concentración. Por otra parte, la NECA aumentó la expresión de la α -actina del músculo liso y del procolágeno α -1, aumentó la producción de colágeno de FCH y aumentó la liberación de dos nuevos biomarcadores de ECV, ST-2 soluble y PAPPa (proteína A plasmática asociada al embarazo). Los efectos de NECA sobre los FCH, sin embargo, fueron inhibidos por completo por un antagonista del AdoR de A_{2B} (Ejemplo 2).

- A nivel fisiológico, se elevan los niveles de adenosina en el miocardio isquémico. El aumento de los niveles de adenosina activa luego los receptores de A_{2B} en los macrófagos, los miocitos cardiacos y los fibroblastos cardiacos, lo que resulta en la liberación de mediadores inflamatorios y fibróticos que contribuyen a la disfunción ventricular izquierda. La capacidad de un antagonista de AdoR de A_{2B} para inhibir dicha activación, a su vez, puede dar lugar a la inhibición de la liberación de dichos mediadores inflamatorios y fibróticos. Además, un antagonista de AdoR de A_{2B} puede inhibir la activación de los macrófagos en los tejidos cardiacos dañados. En resumen, los antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} de la presente divulgación muestran ser capaces de reducir la respuesta fibrótica en las enfermedades del corazón, conduciendo a la mejora de la función ventricular izquierda.
- De acuerdo con estos hallazgos mecanicistas, ahora se ha observado, en modelos de rata y de ratón de infarto de miocardio con elevación del segmento ST (IMEST), que los antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} inhibieron la dilatación del ventrículo izquierdo (VI), como se muestra con una reducción de la ampliación del volumen telesistólico y del volumen telediastólico del VI, y el aumento de la fracción de eyección del VI. Como la inhibición de la dilatación del VI produce una mejoría en la función del VI, y la inhibición de la fibrosis en la zona limítrofe del infarto (ZLI) conduce a un menor número de arritmias, los antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} pueden reducir la muerte cardiovascular y la hospitalización por insuficiencia cardiaca o arritmias. En este sentido, se contempla que la fibrosis intersticial crea un sustrato para la arritmia. Al reducir la fibrosis intersticial, por lo tanto, los antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} pueden reducir la incidencia de las arritmias y muerte cardiaca súbita.
- Un aspecto inesperado de estos hallazgos es que las actividades de los antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} no interfieren con la respuesta fibrótica compensatoria tras un IM en la zona del infarto. Como se ilustra en el **FIG. 18**, durante la fase aguda del infarto de miocardio (por ejemplo, IMEST), las células de la zona del infarto sufren necrosis. Tras la fase aguda (por ejemplo, aproximadamente una semana después del IM), la zona del infarto se estrecha y se alarga para compensar la pérdida debida a la cicatriz fibrosa de las células necróticas. Dicho mecanismo de compensación (también conocido como dilatación VI) es beneficioso para el mantenimiento de la función del VI.
- Sin embargo, la posterior dilatación del VI durante la fase de mala adaptación puede conducir a insuficiencia cardiaca y arritmia. En este sentido, la dilatación del VI en esta fase se produce en zonas exteriores a la zona del infarto, produciendo una dilatación ventricular esférica. Además, el VI agrandado conduce a la disfunción del VI caracterizada con una reducción de la fracción de eyección.
- Sorprendentemente, los antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} de la presente divulgación inhiben en concreto, en los tejidos cardiacos de fuera de la zona del infarto, la liberación de mediadores inflamatorios y fibróticos, reduciendo la inflamación y lesión de los tejidos inducida por la fibrosis, y mejorando la fracción de eyección y la función del VI. Por lo tanto, en contra de la percepción convencional relativa al papel protector cardiaco de las adenosinas, los datos experimentales de la presente divulgación demuestran el efecto terapéutico de la inhibición de las actividades de las adenosinas, con antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B}, en la protección y la recuperación cardiaca tras un IM.
- Por lo tanto, cuando se usan en pacientes que han sufrido un IM, los antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} se pueden administrar al paciente incluso antes de que haya finalizado la fibrosis cardiaca compensatoria, sin arriesgar la inhibición de dicha respuesta compensatoria. Además, se contempla que los pacientes que han sufrido un IM son hemodinámicamente estables cuando reciben el tratamiento. Es más, se contempla que los antagonistas se pueden administrar tan pronto como durante el IM o inmediatamente después del IM.
- También es sorprendente el grado del efecto terapéutico de los antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B}. Por ejemplo, en comparación con otros fármacos antifibróticos tales como la pirfenidona, que solo retardaron la reducción de la FEVI, los antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} de la presente divulgación fueron capaces de detener o incluso de invertir dicha reducción (Ejemplo 6 y **Fig. 12B**).
- En un aspecto, el IM es IM agudo. En otro aspecto, el IM es IM con elevación del segmento ST (IMEST). En otro aspecto más, el IM es IM sin elevación del ST (IMSEST).
- En un aspecto, el uso del antagonista del receptor de adenosina A_{2B} se inicia tan pronto como durante el IM o inmediatamente después del IM. En algunas realizaciones, el uso se produce cuando el paciente es diagnosticado de IM. En otro aspecto, el uso comienza aproximadamente 1 hora, o, como alternativa, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas después del IM. En otro aspecto más, el uso se inicia aproximadamente 1 día, o como alternativa, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, o 1, 2, 3 o 4 semanas después del IM. En un aspecto particular, el uso se inicia tan pronto como el paciente de IM es estabilizado. En un aspecto, el uso se inicia en el plazo de un día después del IM. En otro aspecto, el uso comienza entre uno y cinco días después de un IM. En el caso de que no sea posible un uso inmediato, los datos actuales muestran que el uso que comienza una o dos semanas después del IM sigue siendo eficaz.
- En algunos aspectos, el uso comienza a más tardar aproximadamente 3 días, o como alternativa, 5 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas después del IM.

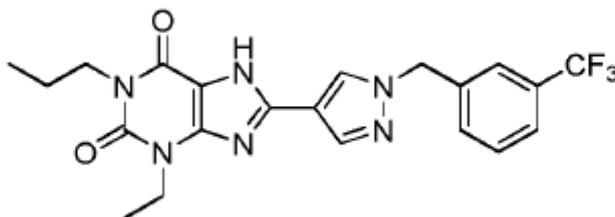
En algunos aspectos, los pacientes que han sufrido un IM son hemodinámicamente estables. Los métodos y los criterios para la determinación de la estabilidad hemodinámica se conocen en la técnica. La expresión "estabilidad hemodinámica", como se usa en el presente documento, se refiere al restablecimiento de uno o más, o todos, los parámetros hemodinámicos medidos en su intervalo normal. Los ejemplos de dichos intervalos normales se proporcionan en la siguiente tabla.

	Valor típico	Intervalo normal
Volumen telediastólico	120 ml	65 - 240 ml
Volumen telesistólico	50 ml	16 - 143 ml
Volumen de impulso	70 ml	55 - 100 ml
Fracción de eyección	0,58	55 % - 70 %
Frecuencia cardiaca	75 ppm	60 - 100 ppm
Gasto cardiaco	5,25 l/min	4 - 8 l/min

Como se describe más a fondo a continuación, los antagonistas se pueden usar de varias vías, incluyendo, la vía sistémica, oral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y por inhalación.

3. Antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B}

El antagonista del receptor de A_{2B} para su uso en la presente invención es un compuesto que tiene la siguiente fórmula:



y el nombre 3-etil-1-propil-8-(1-(3-(trifluorometil)benzil)-1H-pirazol-4-ol)-1H-purin-2,6(3H,7H)-diona o 3-etil-1-propil-8-(1-((3-(trifluorometil)fenil)metil)pirazol-4-il)-1,3,7-trihidropurin-2,6-diona o una sal farmacéuticamente aceptable. A lo largo del presente documento, a veces se denomina "Compuesto A" o "CVT-6833". El compuesto se describe en la patente de EE.UU. n.º 6.825.349.

También se pretende que el antagonista del receptor de A_{2B} desvelado en el presente documento represente formas no marcadas, así como formas marcadas isotópicamente del compuesto. Los compuestos marcados isotópicamente tienen las estructuras representadas por las fórmulas dadas en la presente memoria, excepto que uno o más átomos están reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico seleccionado. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse a los compuestos de la divulgación incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como, pero sin limitación, ²H (deuterio, D), ³H (tritio), ¹¹C, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸F, ³¹P, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl y ¹²⁵I. Diversos compuestos marcados isotópicamente de la presente divulgación, por ejemplo, aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como ³H, ¹³C y ¹⁴C. Dichos compuestos marcados isotópicamente pueden ser útiles en estudios metabólicos, estudios cinéticos de reacción, técnicas de detección o de formación de imágenes tales como la tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de un solo fotón (SPECT), incluyendo ensayos de distribución tisular de fármacos o sustratos, o en el tratamiento radiactivo de pacientes.

La divulgación también incluye el Compuesto A desvelado en el presente documento, en el que de 1 a "n" hidrógenos unidos a un átomo de carbono está/n reemplazado/s por deuterio, en el que n es el número de átomos de hidrógeno de la molécula. Dichos compuestos muestran una mayor resistencia al metabolismo y, por tanto, son útiles para aumentar la semivida de cualquier compuesto cuando se administra a un mamífero. Véase, por ejemplo, Foster, "Deuterium Isotope Effects in Studies of Drug Metabolism", *Trends Pharmacol. Sci.* 5(12):524-527 (1984). Dichos compuestos se sintetizan mediante medios bien conocidos en la técnica, por ejemplo, empleando materiales de partida en los que uno o más átomos de hidrógeno se han reemplazado por deuterio.

Los compuestos terapéuticos marcados o sustituidos con deuterio de la divulgación pueden tener mejores propiedades DMPK (metabolismo y farmacocinética de fármacos), relativas a la distribución, al metabolismo y a la excreción (ADME). La sustitución con isótopos más pesados tales como el deuterio puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una mayor semivida *in vivo* o

menores necesidades de dosis. Un compuesto marcado con ^{18}F puede ser útil para los estudios de PET o SPECT. Los compuestos marcados isotópicamente de la presente divulgación y los profármacos de los mismos pueden prepararse, en general, llevando a cabo los métodos desvelados en los esquemas o en los ejemplos y las preparaciones descritos más adelante, sustituyendo un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo no marcado isotópicamente. Además, la sustitución con isótopos más pesados, en particular, de deuterio (es decir, ^2H o D) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas como consecuencia de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una mayor semivida *in vivo* o menores necesidades de dosis o una mejora del índice terapéutico. Se entiende que el deuterio, en el presente contexto, se considera un sustituyente en el compuesto de Fórmula I, o cualquier fórmula desvelada en el presente documento.

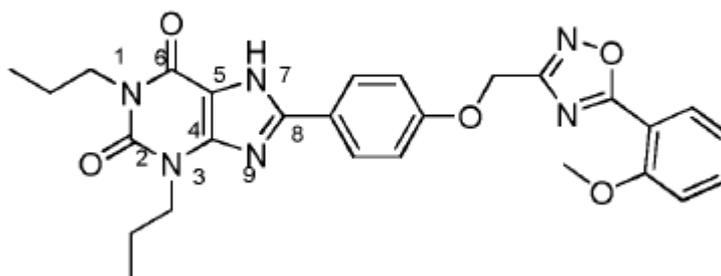
La concentración de dicho isótopo más pesado, en concreto, del deuterio, puede estar definida por un factor de enriquecimiento isotópico. En los compuestos de la presente divulgación, cualquier átomo no designado específicamente como un isótopo particular, pretende representar cualquier isótopo estable de ese átomo. A menos que se indique otra cosa, cuando una posición se designa específicamente como "H" o "hidrógeno", se entenderá que la posición tiene hidrógeno en su composición isotópica de abundancia natural. Por consiguiente, en los compuestos de la presente divulgación, cualquier átomo designado específicamente como deuterio (D) pretende representar deuterio.

En muchos casos, los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales de ácido y/o de base en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los compuestos de Fórmula I, II o III, y que no son biológicamente indeseables o no deseados por otra causa. Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, solamente a modo de ejemplo, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero sin limitación, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, tales como alquilaminas, dialquilaminas, trialquilaminas, alquilaminas sustituidas, di(alquil)aminas sustituidas, tri(alquil)aminas sustituidas, alquenilaminas, dialquenilaminas, trialquenilaminas, alquenilaminas sustituidas, di(alquenil)aminas sustituidas, tri(alquenilaminas) sustituidas, cicloalquilaminas, di(cicloalquil)aminas, tri(cicloalquil)aminas, cicloalquilaminas sustituidas, cicloalquilamina disustituida, cicloalquilamina trisustituida, cicloalquenilaminas, di(cicloalquenil)aminas, tri(cicloalquenil)aminas, cicloalquenilaminas sustituidas, cicloalquenilaminas disustituidas, cicloalquenilaminas trisustituidas, arilaminas, diarilaminas, triarilaminas, heteroarilaminas, diheteroarilaminas, triheteroarilaminas, aminas heterocíclicas, aminas diheterocíclicas, aminas triheterocíclicas, di- y tri-aminas mixtas en las que al menos dos de los sustituyentes de la amina son diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, heteroarilo, heterocíclico, y similares. También se incluyen aminas en las que dos o tres sustituyentes, junto con el nitrógeno de amino, forman un grupo heterocíclico o heteroarilo.

Los ejemplos específicos de aminas adecuadas incluyen, solamente a modo de ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, tri(iso-propil)amina, tri(n-propil)amina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, trometamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, N-alquilglucaminas, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, morfolina, N-etilpiperidina, y similares.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido *p*-tolueno-sulfónico, ácido salicílico, y similares.

Nomenclatura



El Compuesto A de la invención se denomina: 8-4-[5-(2-metoxifenil)-[1,2,4]-oxadiazol-3-ilmetoxi]-fenil]-1,3-dipropil-1,3,7-trihidropurin-2,6-diona.

4. Terapias de combinación

También se proporcionan terapias de combinación. En una realización, el uso comprende además un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE). Los ejemplos no limitantes de inhibidores de la ACE incluyen captopril, enalapril, lisinopril, perindopril, ramipril y similares.

En otra realización, el uso comprende además un antagonista del receptor de la angiotensina II, también conocido como bloqueadores de los receptores de la angiotensina (ARB). Los ejemplos no limitantes de los ARB incluyen losartán, EXP 3174, candesartán, valsartán, irbesartán, telmisartán, eprosartán, olmesartán, azilsartán y similares.

Los antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} se pueden usar en combinación con otras terapias o agentes para la fibrosis cardiaca, incluyendo, pero sin limitación, Resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno) Sutra *et al.*, *J Agric Food Chem* 56(24):11683-11687 (2008)). El Resveratrol es un estilbenoide, un tipo de fenol natural y una fitoalexina producidos de manera natural por varias plantas cuando sufren el ataque de patógenos tales como las bacterias o los hongos.

Se contempla el sinergismo entre los antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} y otras terapias para la fibrosis cardiaca debido a sus respectivos mecanismos terapéuticos diferentes. Los inhibidores de la ACE, por ejemplo, bloquean la conversión de la angiotensina I en la angiotensina II. Por lo tanto, reducen la resistencia arteriolar y aumentan la capacidad venosa; aumentan el gasto cardiaco, el índice cardiaco, el trabajo y el volumen de impulso del corazón; reducen la resistencia vascular renal; y conducen a un aumento de la natriuresis (excreción de sodio en la orina). Por el contrario, los antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} reducen la inflamación y la fibrosis cardiacas. En combinación, por lo tanto, un antagonista del receptor de la adenosina A_{2B} y un inhibidor de ACE pueden mejorar la función cardiaca y reducir la dosis terapéutica de cada agente individual. La reducción de las dosis terapéuticas, a su vez, ayuda a reducir o a prevenir los posibles eventos adversos.

En términos de administración, se contempla que los dos o más agentes pueden administrarse simultánea o secuencialmente. Si los dos o más agentes se administran de forma simultánea, bien se pueden administrar como una sola dosis o como dosis separadas. Además, se contempla que el médico a cargo será capaz de determinar fácilmente la dosis requerida del agente adicional, la pauta posológica y la vía de administración preferida. Dichas composiciones se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mace Publishing Co., Filadelfia, PA 17^a Ed. (1985) y "Modern Pharmaceutics", Marcel Dekker, Inc. 3^a Ed. (G.S. Banker & C.T. Rhodes, Eds.).

5. Administración

Las composiciones adecuadas para la administración en la invención se pueden administrar a individuos en necesidad de las mismas por vía oral, intravítrea, tópica, sublingual, bucal, nasal, parenteral (por ejemplo, intramuscular), intraperitoneal, inyección intravenosa o subcutánea, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, sublingual, bucal, como un pulverizado oral o un pulverizado nasal. Las composiciones se pueden formular en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral, intranasal, ocular, parenteral o mediante terapia de inhalación, y pueden adoptar la forma de comprimidos, grageas, gránulos, cápsulas, píldoras, ampollas, supositorios o forma de aerosol. También pueden adoptar la forma de suspensiones, soluciones y emulsiones de los ingredientes clave en diluyentes acuosos o no acuosos, jarabes, granulados o polvos. Además de un agente de la presente invención, las composiciones farmacéuticas también pueden contener otros compuestos farmacéuticamente activos o una pluralidad de compuestos.

En algunas realizaciones, la composición de la invención también denominad en el presente documento principio activo, se puede administrar para la terapia por cualquier vía adecuada incluyendo la vía oral, nasal, tópica (incluyendo transdérmica, aerosol, bucal y sublingual), parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica) y pulmonar. También se apreciará que la vía preferida variará con el estado y la edad del receptor, y con la enfermedad que se esté tratando.

A. Inyección

Un modo de administración es el parenteral, en particular, por inyección tal como inyección intravenosa (IV). Las formas en las que las composiciones de la presente divulgación pueden incorporarse para la administración por inyección incluyen suspensiones o emulsiones acuosas u oleosas, con aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón o aceite de cacahuete, así como elixires, manitol, dextrosa, o una solución acuosa estéril, y vehículos farmacéuticos similares. Las soluciones acuosas en solución salina también se usan convencionalmente para la inyección, pero se prefieren menos en el contexto de la presente divulgación. También se pueden emplear etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares (y mezclas adecuadas de los mismos), derivados de ciclodextrina y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la

dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede obtener mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares.

5 En un aspecto, la divulgación proporciona una solución IV que comprende una concentración seleccionada de un antagonista del receptor de la adenosina A_{2B}. En concreto, la solución IV comprende preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.000 mg del antagonista del receptor de la adenosina A_{2B} por mililitro de una solución acuosa farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, la concentración del antagonista del receptor de la adenosina A_{2B} en la solución IV es de aproximadamente 5 a aproximadamente 1.000 mg, o de forma alternativa, de aproximadamente 10 a aproximadamente 800 mg, o de forma alternativa, de aproximadamente 20 a aproximadamente 800 mg, o de forma alternativa, de aproximadamente 50 a aproximadamente 700 mg, o de forma alternativa, de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 mg. En otro aspecto, la concentración del antagonista del receptor de la adenosina A_{2B} en la solución IV es de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 mg, o de forma alternativa, de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 mg, o de forma alternativa, de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 mg, o de forma alternativa, de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 mg, o de forma alternativa, de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mg, o de forma alternativa, de aproximadamente 200 a aproximadamente 300 mg. En otro aspecto más, la concentración es de aproximadamente 250 mg. Con el fin de permitir el flujo intravenoso rápido del antagonista del receptor de la adenosina A_{2B} en el paciente, la solución IV contiene preferentemente componentes no viscosos, incluyendo, a modo de ejemplo, propilenglicol o polietilenglicol (por ejemplo, polietilenglicol 400). Se entiende que se pueden incluir pequeñas cantidades de componentes viscosos que no alteran materialmente la viscosidad en las formulaciones intravenosas de la presente divulgación. En una realización particularmente preferida, la viscosidad de la solución IV es preferentemente menos de 1×10^{-5} m²/s (10 cSt) a 20 °C, más preferentemente inferior a 5×10^{-6} m²/s (5 cSt) a 20 °C e incluso más preferentemente inferior a 2×10^{-6} m²/s (2 cSt) a 20 °C.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto de la divulgación en la cantidad requerida al disolvente apropiado con otros diversos ingredientes como se ha especificado anteriormente, según sea necesario, seguido de la esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y de liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

35 **B. Administración oral**

La administración oral es otra vía de administración de los compuestos de la divulgación. La administración puede ser mediante cápsulas o comprimidos con recubrimiento entérico, o similares. Al preparar las composiciones farmacéuticas que incluyen al menos un compuesto de la divulgación, el principio activo normalmente se diluye mediante un excipiente y/o se encierra dentro de un vehículo que puede estar en forma de una cápsula, una bolsita, un papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser en un material sólido, semisólido o líquido (como antes), que actúe como un vehículo, portador o medio para el principio activo. Por lo tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, grageas, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), pomadas que contienen, por ejemplo, hasta el 10 % en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blandas y duras, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir además: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; emulsionantes y agentes de suspensión; agentes conservantes tales como metil- y propilhidroxi-benzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes.

Las composiciones de la divulgación se pueden formular de modo que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo tras la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica. Los sistemas de administración de fármacos de liberación controlada para la administración oral incluyen sistemas de bomba osmótica y sistemas de disolución que contienen depósitos recubiertos de polímero o formulaciones de matriz de fármaco-polímero. Los ejemplos de sistemas de liberación controlada se dan en las patentes de EE.UU. n.º 3.845.770.; 4.326.525; 4.902.514; y 5.616.345. Otra formulación para su uso en los métodos de la presente divulgación emplea dispositivos de administración transdérmica ("parches"). Dichos parches transdérmicos se pueden usar para proporcionar infusión continua o discontinua de los compuestos de la presente divulgación en cantidades controladas. La construcción y el uso de parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos es bien conocida en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.023.252, 4.992.445 y 5.001.139. Dichos parches se pueden construir para la administración continua, pulsátil o a demanda de agentes farmacéuticos.

Las composiciones se formulan preferentemente en una forma de dosificación unitaria. La expresión "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado (por ejemplo, un comprimido, una cápsula, una ampolla). Los compuestos de la presente divulgación son eficaces en un amplio intervalo de dosificación y se administran en general en una cantidad farmacéuticamente eficaz.

En algunos aspectos, para la administración oral, cada unidad de dosificación contiene de 10 mg a 2 g de un compuesto de la divulgación, o como alternativa, de 10 a 200 mg, o aproximadamente 10 mg, 20 mg, 40 mg, 80 mg o 160 mg. Para la administración parenteral, la unidad de dosificación puede ser de 10 a 700 mg de un compuesto de la divulgación, o de aproximadamente 50 a 200 mg. Se entenderá, sin embargo, que la cantidad del compuesto de la divulgación realmente administrada será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección que se vaya a tratar, la vía de administración seleccionada, el compuesto real administrado y su actividad relativa, la edad, el peso y la respuesta de cada paciente, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contenga una mezcla homogénea de un compuesto de la presente divulgación. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, se quiere decir que el principio activo está dispersado uniformemente por toda la composición de manera que la composición puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas.

Los comprimidos o las píldoras de la presente divulgación se pueden recubrir o componerse de otra manera para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de la acción prolongada, o para proteger de las condiciones ácidas del estómago. Por ejemplo, el comprimido o la píldora pueden comprender un componente de dosificación interno y un componente de dosificación externo, estando este último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirva para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o que se retrase su liberación. Se pueden usar varios materiales para dichas capas entéricas o recubrimientos, incluyendo dichos materiales una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

C. Inhalación e insuflación

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes farmacéuticamente aceptables, acuosos u orgánicos, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, las composiciones se administran por vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes preferentemente farmacéuticamente aceptables se pueden nebulizar mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden inhalarse directamente desde el dispositivo de nebulización, o el dispositivo de nebulización puede fijarse a una cubierta protectora de máscara facial o una máquina de respiración de presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o en polvo se pueden administrar, preferentemente, por vía oral o nasal, desde dispositivos que administran la formulación de una manera apropiada.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la divulgación. Los expertos en la materia han de apreciar que las técnicas desveladas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la divulgación, y por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberían apreciar, a la luz de la presente divulgación, que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan, y seguir obteniéndose un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu ni del alcance de la divulgación.

Ejemplo de formulación 1

Se preparan cápsulas de gelatina dura que contienen los siguientes ingredientes:

Ingrediente	(mg/cápsula)
Principio activo	30,0
Almidón	305,0
Estearato de magnesio	5,0

Los ingredientes anteriores se mezclan y se introducen en cápsulas de gelatina dura.

Ejemplo de formulación 2

Se prepara una fórmula en comprimidos usando los siguientes ingredientes:

Ingrediente	(mg/comprimidos)
Principio activo	25,0
Celulosa, microcristalina	200,0
Dióxido de silicio coloidal	10,0
Ácido esteárico	5,0

- 5 Los componentes se mezclan y se comprimen para formar comprimidos.

Ejemplo de formulación 3

- 10 Se prepara una formulación de inhalador de polvo seco que contiene los siguientes componentes:

Ingrediente	% en peso
Principio activo	5
Lactosa	95

Se mezcla el principio activo con la lactosa y se añade la mezcla a un aparato de inhalación de polvo seco.

Ejemplo de formulación 4

Se preparan comprimidos, conteniendo cada uno 30 mg de principio activo, de la siguiente manera:

Ingrediente	(mg/comprimido)
Principio activo	30,0 mg
Almidón	45,0 mg
Celulosa microcristalina	35,0 mg
Polivinilpirrolidona (como solución al 10 % en agua estéril)	4,0 mg
Almidón de carboximetilo sódico	4,5 mg
Estearato de magnesio	0,5 mg
Talco	1,0 mg
Total	120 mg

- 20 A través de un tamiz estadounidense de malla n.º 20 se pasan el principio activo, el almidón y la celulosa y se mezclan a fondo. La solución de polivinilpirrolidona se mezcla con los polvos resultantes, que se pasan después a través de un tamiz estadounidense de malla 16. Se secan los gránulos así producidos a una temperatura de 50 °C a 60 °C y se pasan a través de un tamiz estadounidense de malla 16. Después, se añade el almidón de carboximetilo sódico, el estearato de magnesio y el talco, previamente pasados a través de un tamiz estadounidense de malla 30, a los gránulos que, después de mezclar, se comprimen en una compresora, produciendo comprimidos con un peso unitario de 120 mg.
- 25

Ejemplo de formulación 5

- 30 Se fabrican supositorios, conteniendo cada uno 25 mg de principio activo de la siguiente manera:

Ingrediente	Cantidad
Principio activo	25 mg
Glicéridos de ácidos grasos saturados hasta	2.000 mg

- A través de un tamiz estadounidense de malla 60 se pasa el principio activo y se suspende en los glicéridos de ácidos grasos saturados previamente fundidos usando el mínimo calor necesario. A continuación, se vierte la mezcla en un molde de supositorios de capacidad nominal de 2,0 g y se deja enfriar.
- 35

Ejemplo de formulación 6

- 40 Se preparan suspensiones, conteniendo cada una de ellas 50 mg de principio activo por dosis de 5,0 ml de la siguiente manera:

Ingrediente	Cantidad
Principio activo	50,0 mg
Goma de xantano	4,0 mg
Carboximetilcelulosa sódica (11 %)	

Celulosa microcristalina (89 %)	50,0 mg
Sacarosa	1,75 g
Benzoato de sodio	10,0 mg
Aroma y color	c.v.
Agua purificada hasta	5,0 ml

5 Se combinan el principio activo, la sacarosa y la goma de xantano, se pasan a través de un tamiz de malla estadounidense n.º 10, y luego se mezclan con una solución previamente preparada de la celulosa microcristalina y la carboximetilcelulosa sódica en agua. Se diluyen el benzoato de sodio, aroma y color con algo de agua, y se añaden con agitación. A continuación se añade suficiente agua para producir el volumen requerido.

Ejemplo de formulación 7

10 Se puede preparar una formulación subcutánea se la siguiente manera:

Ingrediente	Cantidad
Principio activo	5,0 mg
Aceite de maíz	1,0 ml

Ejemplo de formulación 8

15 Se prepara un preparado inyectable que tiene la siguiente composición:

Ingredientes	Cantidad
Principio activo	2,0 mg/ml
Manitol, USP	50 mg/ml
Ácido glucónico, USP	c.s. (pH 5-6)
Agua (destilada, estéril)	c.s. hasta 1,0 ml
Gas de nitrógeno, NF	c.s.

Ejemplo de formulación 9

20 Se prepara un preparado tópico que tiene la siguiente composición:

Ingredientes	gramos
Principio activo	0,2-10 mg/ml
Span 60	2,0
Tween 60	2,0
Aceite mineral	5,0
Vaselina	0,10
Metilparabeno	0,15
Propilparabeno	0,05
BHA (hidroxianisol butilado)	0,01
Agua	c.s. hasta 100

25 Se combinan todos los ingredientes anteriores, a excepción del agua, y se calientan hasta 60 °C con agitación. A continuación, se añade una cantidad suficiente de agua a 60 °C con agitación vigorosa para emulsionar los ingredientes, y después se añade agua c.s. hasta 100 g.

Ejemplos

30 La presente divulgación se define además por referencia a los siguientes ejemplos.

Abreviaturas

35 A menos que se indique lo contrario, todas las temperaturas están en grados centígrados (°C). Además, en estos ejemplos y en otras partes, las abreviaturas tienen los siguientes significados:

µg	=	Microgramo
µl	=	Microlitro
µM	=	Micromolar
Ado	=	Adenosina

AdoR	=	Receptor de adenosina
IAM	=	Infarto agudo de miocardio
ppm	=	Pulsaciones por minuto
VC	=	Cardiovascular
ECV	=	Enfermedad cardiovascular
FE	=	Fracción de eyección
ELISA	=	Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima
g	=	Gramo
FCH	=	Fibroblastos cardiacos humanos
ZLI	=	Zona limítrofe del infarto
h	=	Hora
ip o i.p.	=	Intraperitoneal
VI	=	Ventrículo izquierdo
DTDVI	=	Diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo
FEVI	=	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
DTSVI	=	Diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo
VTSVI	=	Volumen telesistólico del ventrículo izquierdo
EDPPVI	=	Espesor diastólico de la pared posterior del VI
mg	=	Miligramo
ml	=	Mililitro
mM	=	Milimolar
IM	=	Infarto de miocardio
IFM	=	Índice de función miocárdica
NECA	=	N-etilcarboxamida-adenosina
nM	=	Nanomolar
STDVD	=	Superficie telediastólica del ventrículo derecho
RT-PCR	=	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa
IMESST	=	Infarto de miocardio con elevación del segmento ST
SV	=	Volumen de impulso del corazón
DSPAT	=	desplazamiento sistólico del plano del anillo tricuspídeo

Metodologías y reactivos

Células y reactivos

5 El Compuesto A fue sintetizado por Gilead Sciences, Inc. (Foster City, California) de conformidad en la patente de EE.UU. n.º 6.825.349. Otros compuestos químicos se obtuvieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri).

RT-PCR en tiempo real

10 La RT-PCR en tiempo real se realizó como se ha publicado usando el equipo de PCR de Stratagene (La Jolla, California). Zhong H., *et al.*, "A2B adenosine receptors increase cytokine release by bronchial smooth muscle cells", *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 30(1): 118-125 (2004).

Ejemplo 1: Ensayos de receptores de adenosina

Para seleccionar antagonistas del receptor de A_{2B} , normalmente se usan dos tipos de ensayos: 1) ensayo de unión de radioligando para determinar si un compuesto dado pueda unirse al receptor de A_{2B} como se describe a continuación; y 2) un ensayo funcional (ensayo de AMPc u otros) para determinar si el compuesto es un agonista (activa el receptor) o un antagonista (inhibe la activación del receptor).

Se usa un ensayo de unión de radioligando para el receptor de la adenosina A_{2B} para determinar la afinidad de un compuesto por el receptor de la adenosina A_{2B} . Entretanto, se realizan los ensayos de unión de radioligando para otros receptores de adenosina para determinar las afinidades del compuesto por los receptores de la adenosina A_1 , A_{2A} y A_3 . El compuesto debería tener una mayor afinidad (de al menos el triple) por el receptor de A_{2B} que por otros receptores de adenosina.

Se suele usar un ensayo de AMPc para el receptor de A_{2B} para confirmar que el compuesto es un antagonista y que bloqueará el aumento mediado por el receptor de A_{2B} en AMPc.

Unión del radioligando para el receptor de adenosina A_{2B}

Los compuestos que son antagonistas putativos del receptor de A_{2B} se pueden examinar para determinar la actividad requerida basándose en los siguientes ensayos. Se transfectan de forma estable ADNc humanos del receptor de la adenosina A_{2B} en células HEK-293 (denominadas células HEK-A2B). Se lava la monocapa de células HEK-A2B con PBS una vez y se recoge en un tampón que contiene HEPES 10 mM (pH 7,4), EDTA 10 mM e inhibidores de la proteasa. Se homogenizan estas células en un homogenizador Polytron durante 1 minuto en la posición 4, y se centrifugan a 29.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Se lavan los sedimentos celulares una vez con un tampón que contiene HEPES 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM e inhibidores de la proteasa, y se vuelven a suspender en el mismo tampón suplementado con sacarosa al 10 %. Se mantienen las alícuotas congeladas a -80 °C. Los ensayos de competición se inician mezclando $^3\text{H-ZM241385}$ 10 nM (Tocris Cookson) con diversas concentraciones de compuestos de ensayo y 50 μg de proteínas de la membrana en tampón TE (Tris 50 mM y EDTA 1 mM) suplementado con 1 unidad/ml de adenosina desaminasa. Se incuban los ensayos durante 90 minutos, se detienen por filtración usando el cosechador de Packard y se lavan cuatro veces con tampón TM enfriado con hielo (Tris 10 mM, MgCl_2 1 mM, pH 7,4). La unión inespecífica se determina en presencia de ZM241385 10 μM . Las afinidades de los compuestos (es decir, los valores de K_i) se calculan usando el software GraphPad.

Unión del radioligando para otros receptores de adenosina

Se transfectan de forma estable ADNc humanos del receptor de la adenosina A_1 , A_{2A} y A_3 bien en células CHO o células HEK-293 (denominadas CHO-A1 HEK-A2A, CHO-A3). Se preparan las membranas a partir de estas células usando el mismo protocolo que se ha descrito anteriormente. Los ensayos de competición se inician mediante la mezcla de $^3\text{H-CPX}$ 0,5 nM (para CHO-A1), $^3\text{H-ZM241385}$ 2 nM (HEK-A2A) o $^{125}\text{I-AB-MECA}$ 0,1 nM (CHO-A3) con diversas concentraciones de compuestos de ensayo y las respectivas membranas en el tampón TE (Tris 50 mM y EDTA 1 mM de CHO-A1 y HEK-A2A) o tampón TEM (Tris 50 mM, EDTA 1 mM y MgCl_2 10 mM para CHO-A3) suplementado con 1 unidad/ml de adenosina desaminasa. Los ensayos se incuban durante 90 minutos, se detienen por filtración usando el cosechador Packard y se lavan cuatro veces con tampón TM enfriado con hielo (Tris 10 mM, MgCl_2 1 mM, pH 7,4). La unión inespecífica se determina en presencia de CPX 1 μM (CHO-A1), ZM241385 1 μM (HEK-A2A) e IB-MECA 1 μM (CHO-A3). Las afinidades de los compuestos (es decir, los valores de K_i) se calculan usando el software GraphPad.

Mediciones de AMPc

Se recoge la monocapa de células transfectadas en PBS que contiene EDTA 5 mM. Se lavan las células una vez con DMEM y se vuelven a suspender en DMEM que contiene 1 unidad/ml de adenosina desaminasa a una densidad de 100.000, 500.000 células/ml. Se mezclan 100 μl de la suspensión de células con 25 μl que contienen diversos agonistas y/o antagonistas, y se mantiene la reacción a 37 °C durante 15 minutos. Al final de los 15 minutos, se añaden 125 μl de HCl 0,2 N para detener la reacción. Se centrifugan las células durante 10 minutos a 1.000 rpm. Se retiran 100 μl del sobrenadante y se acetilan. Se miden las concentraciones de AMPc en los sobrenadantes usando el ensayo de AMPc directo de Assay Design.

Se acoplan los receptores de la adenosina A_{2A} y A_{2B} a las proteínas G y, por lo tanto, los agonistas del receptor de la adenosina A_{2A} (tales como CGS21680) o del receptor de la adenosina A_{2B} (tales como NECA) aumentan las acumulaciones de AMPc, mientras que los antagonistas de estos receptores evitan el aumento de las acumulaciones de AMPc inducidas por los agonistas. Se acoplan los receptores de la adenosina A_1 y A_3 a proteínas G_i y, por lo tanto, los agonistas del receptor de la adenosina A_1 (tales como CPA) o del receptor de la adenosina A_3 (tales como IB-MECA) inhiben el aumento de las acumulaciones de AMPc inducidas por la forskolina. Los antagonistas de los receptores A_1 y A_3 previenen la inhibición de las acumulaciones de AMPc.

Es competencia del experto en la materia determinar si un compuesto, basándose en el protocolo de ensayo

anterior, es un antagonista del receptor de A_{2B}. Una selectividad del triple, o en ciertos casos, 10 veces superior, por el agonista del receptor de A_{2B} frente a otros receptores de la adenosina, se puede considerar que cualifica a un compuesto como un antagonista selectivo del receptor de A_{2B}.

5 **Ejemplo 2: Atenuación de los biomarcadores de la fibrosis cardiaca por el receptor de la adenosina A_{2B}**

10 El presente ejemplo demuestra que los receptores de la adenosina A_{2B} (AdoR) son el subtipo predominante de AdoR expresados en fibroblastos cardiacos humanos primarios (FCH), y sugiere que el AdoR de A_{2B} media la respuesta fibrótica en enfermedades del corazón. Por lo tanto, se puede usar un antagonista del AdoR de A_{2B} para el tratamiento de la fibrosis cardiaca.

15 Se determinó la expresión de AdoR, α -actina del músculo liso y procolágeno α -1 usando RT-PCR en tiempo real. Se midió la concentración de IL-6, ST-2 soluble y PAPPa (proteína A plasmática asociada al embarazo) en los sobrenadantes celulares usando ELISA, y se determinó la concentración del colágeno soluble usando el ensayo de colágeno Sircol™.

20 Entre los cuatro subtipos de AdoR, el AdoR de A_{2B} se expresó al nivel más alto de FCH. La N-etilcarboxamida-adenosina (NECA), un análogo estable de la adenosina, aumentó significativamente la liberación de IL-6 de una manera dependiente de la concentración, con un aumento máximo de $2,4 \pm 0,1$ veces sobre el nivel basal. Además, la NECA (10 μ M) aumentó la expresión de la α -actina de músculo liso y del procolágeno α -1, y la producción de colágeno (inducción de $1,8 \pm 0,1$ veces, de $3,4 \pm 0,2$ a $6,0 \pm 0,4$ μ g/ml, $p < 0,05$) de los FCH. Por otra parte, la NECA aumentó la liberación de dos nuevos biomarcadores de enfermedades cardiovasculares (ECV), ST-2 soluble (inducción de $1,7 \pm 0,1$, de $1,5 \pm 0,1$ a $2,6 \pm 0,1$ ng/ml, $p < 0,05$) y PAPPa (inducción de $4,4 \pm 0,6$ veces, de $1,4 \pm 0,5$ a $6,2 \pm 0,8$ ng/ml, $p < 0,05$). Los efectos de NECA sobre la liberación de IL-6, colágeno, ST-2 y PAPPa, y la expresión de α -actina de músculo liso y procolágeno α -1 fueron completamente inhibidos por un antagonista selectivo del AdoR de A_{2B}, el Compuesto A (**Fig. 1A- D**).

30 El presente ejemplo, por tanto, indica que el AdoR de A_{2B} es el subtipo predominante de AdoR expresados en los FCH humanos primarios, y que la activación de este receptor aumenta la liberación de IL-6 y la producción de colágeno, la expresión de marcadores fibróticos y la liberación de biomarcadores de ECV. Estos hallazgos sugieren que AdoR de A_{2B} podría mediar la respuesta fibrótica en las enfermedades del corazón. Por lo tanto, los antagonistas del AdoR de A_{2B}, a través de la inhibición de la activación del AdoR de A_{2B}, se pueden usar para el tratamiento de la fibrosis cardiaca.

35 **Ejemplo 3: Mejora de la remodelación cardiaca por parte del antagonista de A_{2B}**

40 El presente ejemplo demuestra que el bloqueo selectivo del receptor de la adenosina A_{2B} puede mejorar la remodelación cardiaca después de un infarto agudo de miocardio en el ratón. La adenosina se libera en respuesta a la lesión del tejido, y potencia la hiperemia y la inflamación. Los efectos proinflamatorios de la adenosina a través del receptor de A_{2B} provocan mayores daños en el tejido. El presente ejemplo prueba si el bloqueo selectivo del receptor de A_{2B} durante el infarto agudo de miocardio podría conducir a una remodelación cardiaca más favorable.

45 Se sometieron ratones macho ICR a cirugía de ligadura de la arteria coronaria o a tratamiento simulado (N = 8-10 por grupo). Se les administró un antagonista selectivo de A_{2B}, el Compuesto A a 4 mg/kg en una suspensión de dosificación formulada, cada 12 horas i.p., comenzando inmediatamente después de la cirugía y se continuó durante 14 días. Se realizó una ecocardiografía transtorácica antes de la cirugía y después, 7, 14 y 28 días más tarde. Se sacrificó un subgrupo de ratones 72 horas después de la cirugía, y se midió la actividad de la caspasa-1, un mediador proinflamatorio clave, en el tejido cardiaco.

50 Todos los ratones con operación simulada estaban vivos a las 4 semanas, mientras que el 42 % de los ratones tratados con vehículo y el 25 % de los tratados con el Compuesto A murieron durante las 4 semanas posteriores a la cirugía. El tratamiento con el Compuesto A redujo significativamente la actividad de la caspasa-1, el diámetro telediastólico y el índice de función miocárdica, y aumentó la fracción de eyección del VI, en comparación con el vehículo (**FIG. 2**).

55 Por lo tanto, el presente ejemplo demuestra que el bloqueo selectivo del receptor de la adenosina A_{2B} con un antagonista selectivo de A_{2B}, el Compuesto A, limita la activación de caspasa-1 en el corazón y conduce a una remodelación cardiaca más favorable después de un infarto agudo de miocardio en el ratón.

60 **Ejemplo 4: Atenuación de la remodelación cardiaca tras un infarto agudo de miocardio mediante el antagonista de A_{2B}**

65 El presente ejemplo usa un modelo de ratón *in vivo* para demostrar que el bloqueo selectivo del AdoR de A_{2B} con un antagonista reduce la actividad de la caspasa-1 en el corazón, conduciendo a una remodelación cardiaca más favorable después de un infarto agudo de miocardio (IAM).

Métodos

Modelo experimental del IAM

5 Se adquirieron ratones CD1 macho exogámicos adultos (8-12 semanas de vida) en Harlan Sprague Dawley (Indianápolis, IN). Los experimentos se realizaron según las directrices de los animales de laboratorio para la investigación biomédica, publicados por los Institutos Nacionales de Salud (n.º 85-23, revisado en 1996). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad del Estado de Virginia. Se indujo IAM experimental mediante la ligadura de la arteria coronaria permanente para inducir un infarto no reperfundido de gran tamaño que afectara aproximadamente al 30 % del ventrículo izquierdo y que diera lugar a una miocardiopatía dilatada isquémica (Mezzaroma *et al. Proc Natl Acad Sci* 2011 - en prensa, y Abbate *et al. Circulation* 2008; 117:2670-83). En resumen, se intubaron los ratones orotraquealmente bajo anestesia (de 50 a 70 mg/kg de pentobarbital), se colocaron en posición de decúbito lateral derecho, y luego se sometieron a una toracotomía izquierda, pericardiectomía y ligadura de la arteria coronaria izquierda proximal. Se cerró el pecho, y se dejó que los animales se recuperaran. Se asignaron aleatoriamente los ratones que sobrevivieron a la cirugía a los diferentes grupos de tratamiento (N = 6-15 por grupo). Se realizaron operaciones simuladas en las que los animales se sometieron al mismo método quirúrgico sin ligadura de la arteria coronaria (N = 4-8 por grupo). En la **FIG. 3**, se muestra una línea temporal del protocolo del estudio.

20 Tratamiento

El antagonista del AdoR de A_{2B}, el Compuesto A, se obtuvo en Gilead Sciences, Foster City, CA. Los ratones se asignaron aleatoriamente al tratamiento con el Compuesto A (4 mg/kg) o a dosis correspondientes de vehículo administradas por vía intraperitoneal (volumen final de 0,13 ml) cada 12 horas durante 14 días, empezando inmediatamente después de la cirugía de ligadura de la arteria coronaria. Un grupo adicional de ratones recibió una dosis más baja del Compuesto A (2 mg/kg) para examinar una relación dosis-respuesta. Dos grupos adicionales de ratones recibieron el Compuesto A (4 mg/kg) comenzando 1 hora después de la cirugía para simular un escenario clínico de retraso del tratamiento. Un grupo adicional de ratones se trató con 0,13 ml de NaCl al 0,9 % como un control adicional; sin embargo, dado que los datos del tratamiento con vehículo no fueron significativamente diferentes a los del tratamiento con NaCl, en el presente ejemplo, solo se incluyen los resultados del tratamiento con vehículo. Para simular un escenario clínicamente relevante en el que el tratamiento farmacológico puede ocurrir con cierto retraso después de un IAM, el presente ejemplo comparó el tratamiento con el Compuesto A sin demora con los grupos en los que el antagonista del AdoR de A_{2B} se había administrado con 1 hora de retraso.

35 Activación de la Caspasa-1

Se sacrificó un subconjunto adicional de ratones 72 horas después de la cirugía (N = 4-6 por grupo de tratamiento). Se extirpó el corazón como se ha descrito anteriormente. Se determinó la actividad tisular de la caspasa-1 mediante la escisión de un sustrato fluorogénico (CaspACE, Promega, Madison, WI) (Abbate *et al. Circulation* 2008; 117:2670-83). Después de la homogenización usando tampón RIPA (Sigma Aldrich) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma Aldrich) y la centrifugación a 16.000 rpm durante 20 minutos, se usaron 75 µg de proteína de cada muestra para el ensayo de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se midió la fluorescencia después de 60 minutos, y se expresó como unidades de fluorescencia arbitrarias producidas por un microgramo de muestra por minuto (fluorescencia/µg/min), y se calculó como las veces de cambio en comparación con la actividad de la caspasa-1 en los corazones homogenizados de los ratones con operación simulada.

Infiltración inflamatoria

Para cuantificar la infiltración inflamatoria en el corazón durante un IAM, el presente ejemplo mide la expresión de CD45 (un marcador de leucocitos) en el corazón usando transferencia Western. Se homogenizaron los corazones extraídos a las 72 h del IAM en tampón RIPA (Sigma Aldrich, St Louis, MO) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma Aldrich), y se centrifugaron a 16.200 x g durante 20 minutos. Se diluyeron treinta microgramos de cada muestra en tampón de Laemmli, se desnaturalizaron durante 10 minutos a 96 °C y se resolvieron con SDS/PAGE usando un gel de acrilamida al 8 % para permitir la separación de las proteínas. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Tras la saturación con leche al 5 % en solución salina tamponada con fosfato, se incubó la membrana con un anticuerpo anti-ratón de rata generado contra CD45 (R&D system, Miniápolis, MN). Para normalizar la carga de proteína, se usó un anticuerpo monoclonal para la b-actina (Sigma Aldrich).

Se usaron el ensayo de aumento de la quimioluminiscencia (ECL) y la autorradiografía para detectar las bandas correspondientes a CD45 y a la b-actina. La intensidad de la banda se determinó mediante análisis densitométricos usando el software Scion Image, y los resultados se expresaron como el porcentaje de aumento de la intensidad en comparación con las muestras de control con simulación.

Medición de los niveles de citocinas y moléculas de adhesión solubles circulantes

Se determinaron las concentraciones en plasma de la IL- β y la interleucina-1 (IL-6), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y moléculas de adhesión solubles (E-selectina, molécula-1 de adhesión intercelular [ICAM-1] y molécula de adhesión celular vascular [VCAM]), que se inducen mediante la IL- β , el día 28 después de la cirugía usando kits Luminex obtenidos en Millipore (Billerica, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtuvo una muestra de sangre a través de una punción cardíaca directa inmediatamente antes de sacrificar a los animales.

Ecocardiografía

Se sometieron todos los ratones a una ecocardiografía transtorácica al inicio del estudio (antes de la cirugía), y a los 7, 14 y 28 días de la cirugía (antes sacrificarlos). La ecocardiografía se realizó usando el sistema de imágenes Vevo770 (VisualSonics Inc, Toronto, Ontario, Canadá) con una sonda de 30 MHz. El corazón se visualizó en modo B desde las vistas del eje corto paraesternal y apical. En el presente ejemplo, se midieron las superficies telediastólica y telesistólica del ventrículo izquierdo (VI) en modo B, y el diámetro telediastólico del VI (DTDVI), los diámetros telesistólicos del VI (DTSVI), el espesor diastólico de la pared anterior del VI (EDPAVI) y el espesor diastólico de la pared posterior del VI (EDPPVI) en el modo M, como se ha descrito anteriormente (Abbate *et al. Circulation* 2008; 117:2670-83; Toldo *et al. PloS One* 2011;6:e18102) y de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (Gardin *et al. J Am Soc Echocardiogr* 2002; 15:272-90). Se calcularon el acortamiento fraccional (AF) del VI, la fracción de eyección (FE) del VI, la masa y la excentricidad del VI (relación DTDVI/EDPPVI) (Abbate *et al. Circulation* 2008; 117: 2670-83; Toldo *et al. PloS One* 2011; 6:e18102; Gardin *et al. J Am Soc Echocardiogr* 2002; 15:272-90). Se registraron los espectros Doppler del tracto de salida transmural y ventricular izquierdo a partir de vistas de 4 cámaras apicales, y se calculó el índice de función miocárdica (IFM o el índice de Tei) como la relación entre el tiempo de contracción y relajación isovolumétrica dividida entre el tiempo de eyección (Tei *et al. Am J Cardiol* 1995; 26:357-366). Se calculó el volumen de impulso del ventrículo izquierdo usando la integral de la curva velocidad-tiempo (VTI) del flujo del tracto de salida del VI multiplicado por la superficie del tracto de salida del VI, y el gasto cardíaco se calculó multiplicando el volumen de impulso del VI por la frecuencia cardíaca (Abbate *et al. Circulation* 2008; 117:2670-83; Toldo *et al. PloS One* 2011;6: e18102; Gardin *et al. J Am Soc Echocardiogr* 2002; 15:272-90). La dilatación del ventrículo derecho (VD) se evaluó midiendo la superficie telediastólica del VD en la sección ventricular media del eje corto paraesternal, y la función sistólica del VD se estimó usando el modo M y midiendo el desplazamiento sistólico del plano del anillo tricuspídeo (DSPAT) (Toldo *et al. PloS One* 2011;6: e18102; Gardin *et al. J Am Soc Echocardiogr* 2002; 15:272-90). El investigador que realizó y leyó el ecocardiograma tuvo ocultación de la asignación del tratamiento.

Evaluación del tamaño del infarto

Después del ecocardiograma de 28 días, se sacrificaron todos los ratones con una sobredosis de pentobarbital y/o dislocación cervical. Se extirparon los corazones y se fijaron en formalina al 10 % durante al menos 48 horas. Se diseccionó una sección transversal de la tercera mediana del corazón, se introdujo en parafina, se cortó en cortes de 5 μ m, y se tiñeron con tricrómico de Masson (Sigma-Aldrich) (Abbate *et al. Circulation* 2008; 117:2670-83). Se determinaron las zonas de fibrosis y todo el ventrículo izquierdo usando morfometría por ordenador con el software Image Pro Plus 6.0.

Mediciones hemodinámicas

En un subgrupo de ratones (N = 4 por cada grupo) se realizó una punción en el ápice VI 1 hora después de la cirugía y se insertó un catéter Millar conectado a un transductor de presión para medir la presión sistólica máxima del VI, y la frecuencia cardíaca (Toldo *et al. PloS One* 2011;6: e18102).

Análisis estadístico

Se analizaron las diferencias entre los grupos usando el ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni. Se analizaron los cambios en las mediciones repetidas de los datos ecocardiográficos mediante ANOVA de efectos aleatorios para medidas repetidas, para determinar el efecto principal del tiempo, del grupo y de la interacción del tiempo por grupo. Se realizó el análisis de supervivencia mediante la generación de una curva de supervivencia de Kaplan-Meier y el uso del análisis de regresión logística. Los cálculos se realizaron usando el paquete informático SPSS 15.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL).

Resultados

El antagonismo hacia el AdoR de A_{2B} no tuvo efectos hemodinámicos durante el infarto agudo de miocardio

Como Ado es un vasodilatador, y para excluir que una diferencia en la remodelación se debía a los cambios hemodinámicos secundarios al antagonismo hacia el AdoR de A_{2B}, el presente ejemplo midió la presión sistólica máxima ventricular izquierda (PSMVI) y la frecuencia cardíaca (FC) en ratones tratados con antagonista del AdoR de A_{2B} Compuesto A y en los tratados con vehículo. La PSMVI se redujo significativamente 1 hora después de la

ligadura de la arteria coronaria, pero no fue afectada por el tratamiento (Tabla 1).

Tabla 1. Datos brutos y hemodinámicos

Grupo	Simulación	IM con antagonista de AdoR de A_{2B}	IM con vehículo
Edad (semanas)	11 ± 1	12 ± 1	11 ± 1
Peso (g)	32 ± 1	34 ± 1	32 ± 1
PSVI (mm Hg)	99 ± 3	57 ± 9 *	58 ± 8 *
FC (/min)	417 ± 13	428 ± 32	434 ± 18

5 Los datos hemodinámicos se registraron 1 hora después de la cirugía.
Abreviaturas: AdoR de A_{2B} = receptor de la adenosina A_{2B}; FC = frecuencia cardíaca; VI = ventrículo izquierdo; PSMVI = presión sistólica máxima del ventrículo izquierdo; IM = infarto de miocardio; * P < 0,001 frente a la simulación.

10 *El antagonismo hacia el AdoR de A_{2B} inhibe la activación de la caspasa-1 y la inflamación*

La activación de la caspasa-1 forma parte de un mecanismo proinflamatorio clave en respuesta a la lesión isquémica. El tratamiento con el Compuesto A impidió la activación de la caspasa-1 en el corazón durante el IAM (FIG. 4). La intensidad de la infiltración de los leucocitos (CD45+), medida como la expresión de CD45 en la transferencia Western, también se redujo significativamente mediante el tratamiento con el Compuesto A 72 horas después del IAM (FIG. 4). La activación de la caspasa-1 da lugar al procesamiento y a la liberación de la IL-β activa que normalmente está presente a una concentración tisular muy baja, y amplifica con rapidez la respuesta inflamatoria mediante la inducción de la expresión de citocinas secundarias y moléculas de adhesión. Los niveles de IL-β en plasma fueron indetectables en todos menos en 2 ratones con IAM, mientras que los niveles en plasma de citocinas secundarias, es decir, de IL-6, aumentaron 28 días después de la cirugía en el grupo de IAM (FIG. 5). El tratamiento con el Compuesto A redujo significativamente los niveles en plasma de IL-6, TNF-α, E-selectina, ICAM-1 y VCAM (FIG. 5).

25 *Efectos del antagonismo hacia el AdoR de A_{2B} sobre la supervivencia después de la cirugía de ligadura de la arteria coronaria*

Ninguno de los ratones con operación simulada murió. La mitad de los ratones tratados con vehículo (50 %) sobrevivió hasta 28 días después de la cirugía de ligadura de la arteria coronaria (P < 0,001 frente a la simulación), mientras que el 75 % de los ratones tratados con el Compuesto A estaban vivos (P = 0,14).

30 *Efectos del antagonismo hacia el AdoR de A_{2B} en la remodelación cardíaca*

La remodelación cardíaca se midió de forma no invasiva mediante ecocardiografía transtorácica. En la FIG. 6, se muestran ejemplos de registros en modo B y modo M. La administración de Compuesto A cada 12 horas a partir del momento de la cirugía dio lugar a una atenuación significativa de la dilatación y de la disfunción ventricular izquierda y derecha a los 7 días, que se mantuvo a los 14 días y también a los 28 días, 14 días después de la administración de la última dosis de fármaco (FIG. 7). A los 28 días, la dilatación del VI después de un IAM se redujo en aproximadamente un 40 % mediante el Compuesto A. La función sistólica del VI también fue significativamente superior en el grupo de Compuesto A (diferencia absoluta en la FEVI media del 5 %). La atenuación de la remodelación cardíaca fue paralela a la preservación la función diastólica/sistólica miocárdica (índice de función miocárdica) (FIG. 7A-F). Los corazones de los ratones tratados con el Compuesto A también mostraron menor dilatación y disfunción del ventrículo derecho (FIG. 7A-F).

45 Se sabe que la isquemia miocárdica y la lesión celular acompañante provocan la liberación de los contenidos celulares que desencadenan una respuesta inflamatoria estéril que potencia aún más la disfunción y la insuficiencia cardíacas. Este estudio demuestra por primera vez que la inhibición de la unión de Ado al AdoR de A_{2B} limita la respuesta inflamatoria y conduce a una remodelación cardíaca más favorable.

50 De hecho, Ado se libera rápidamente durante la hipoxia tisular y la isquemia, y se une rápidamente a los receptores acoplados a la proteína G específicos omnipresentes (AdoR). Hay 4 subtipos de AdoR, que son: AdoR de A₁, principalmente expresado en el corazón, regula la conducción eléctrica; AdoR de A₃, que se expresa en los mastocitos de roedores, y regula la activación y la desgranulación en el ratón; mientras que el AdoR de A_{2A} y AdoR de A_{2B} se han relacionado con el tono vascular y la inflamación. AdoR de A_{2A} son AdoR de alta afinidad expresados en la membrana de varios tipos de células, incluyendo las células endoteliales, los leucocitos y los cardiomiocitos.
55 Los AdoR de A_{2B} son receptores de baja afinidad a veces coexpresados en las mismas células que expresan AdoR de A_{2A}, pero en un número bajo y, por lo tanto, se consideran mínimamente relevantes para la señalización de Ado en estas células, al menos en condiciones no estresadas. Mientras que ambos receptores acoplados a la proteína G AdoR de A_{2A} y AdoR de A_{2B} pueden señalar a través de la adenil ciclasa, AdoR de A_{2B} también señala a través de

la fosfolipasa C y las proteínas de unión a GTP pequeñas P21ras, que participan en la señalización inflamatoria que implica a la fosfoquinasa activada por el mitógeno p38 (MAPK) y las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). Es importante destacar que la expresión de AdoR de A_{2B} depende de la estabilización del factor- α inducible por la hipoxia (HIF- α) y que, por lo tanto, es muy sensible a la hipoxia y la inflamación.

5 Por lo tanto, aunque en condiciones no estresadas, la señalización de Ado a través de AdoR de A_{2B} probablemente no es significativa, en el contexto de la lesión tisular, el AdoR de A_{2B} puede desempeñar un papel importante.

10 El presente ejemplo muestra que el bloqueo selectivo de AdoR de A_{2B} usando el Compuesto A suavizó la respuesta inflamatoria durante el infarto como se refleja por una reducción casi completa de la actividad de la caspasa-1, y una reducción significativa de la infiltración de células inflamatorias temprano en el curso del IAM, y una reducción significativa de las citocinas y de las moléculas de adhesión en plasma 28 días después del IAM. La caspasa-1 es el componente enzimáticamente activo de la inflammasoma, una estructura macromolecular que funciona como un sensor del "peligro" y que participa en el procesamiento de la IL-1 β madura y en la muerte celular. La formación de la inflammasoma y la activación de la caspasa-1 en el corazón conducen a la insuficiencia cardiaca. La reducción significativa en la actividad de la caspasa-1 en el corazón con el bloqueo selectivo de AdoR de A_{2B} coincide con la señalización proinflamatoria de AdoR de A_{2B}. El papel de AdoR de A_{2B} en la isquemia miocárdica es, sin embargo, controvertido. En los modelos de lesión miocárdica aguda debida a la isquemia/reperfusión, Ado reproduce sistemáticamente los efectos beneficiosos del preconditionamiento isquémico. Los efectos similares al preconditionamiento de Ado se eliminan cuando se interrumpe la señalización a través de AdoR de A_{2B}. Sin embargo, el bloqueo de AdoR de A_{2B} en ausencia de preconditionamiento isquémico no tuvo efectos sobre el corazón en dichos modelos. Esto sugiere que, aunque pueda mediar en algunos aspectos del preconditionamiento, la señalización de AdoR de A_{2B} no es inherentemente protectora, y es poco probable que sea el único mediador del preconditionamiento.

25 En el modelo de ratón actual de infarto de miocardio sin reperfusión de gran tamaño, el antagonismo hacia AdoR de A_{2B} limitó significativamente la dilatación y la disfunción sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo. Los efectos protectores de AdoR de A_{2B} fueron independientes de un efecto sobre el tamaño del infarto. Esto demuestra que, en el infarto de miocardio sin reperfusión en la rata, la adenosina no tiene efectos sobre el tamaño del infarto.

30 En este modelo de infarto de miocardio sin reperfusión, la remodelación cardiaca es global, y afecta al infarto y a las zonas limítrofes, así como al ventrículo izquierdo lejano no afectado y al ventrículo derecho. El bloqueo de AdoR de A_{2B} no pareció tener ningún efecto sobre el tamaño del infarto, mientras que el bloqueo de AdoR de A_{2B} pareció proteger la zona limítrofe y el miocardio alejado, como lo demuestra una mejora en las dimensiones de tanto el ventrículo izquierdo como el ventrículo derecho, y, lo que es más importante, en la función del VI.

40 El hallazgo de la reducción de la actividad de la caspasa-1 en el corazón y la remodelación cardiaca más favorable confirma el papel central de la caspasa-1 en la respuesta del miocardio a la isquemia miocárdica. La sobreexpresión de la caspasa-1 en el corazón del ratón conduce a mayores superficies de daño isquémico, a la dilatación cardiaca más grave y a una reducción de la supervivencia después de un IAM; mientras que los ratones deficientes en caspasa-1 quedan protegidos tras un IAM.

45 Estos datos sugieren que, en la curación del infarto tras una isquemia miocárdica, el AdoR de A_{2B} tiene un importante papel proinflamatorio y perjudicial.

En conclusión, el bloqueo selectivo del AdoR de A_{2B} con el Compuesto A administrado tras el inicio de la isquemia reduce la actividad de la caspasa-1 en el corazón y conduce a una remodelación cardiaca más favorable tras un IAM en un modelo de ratón de infarto de miocardio sin reperfusión.

50 **Ejemplo 5: Efecto del Compuesto A en un modelo de ratón de infarto de miocardio**

Se administró el antagonista de A_{2B}, el Compuesto A (3 mg/kg/día o 10 mg/kg/día), a ratones de modelo ob/ob de 6 semanas de vida durante 28 días. Al final de la dosificación de 28 días, se midió la expresión de una serie de biomarcadores inflamatorios, MCP-1, IL-1b, IL-2 e IL-6 en estos ratones en comparación con el control (vehículo).

55 Como se muestra en la **FIG. 8A-D**, la expresión de los cuatro biomarcadores inflamatorios se redujo, y para dos de los cuales, MCP-1 e IL-1b, la reducción para el grupo de 10 mg/kg/día fue estadísticamente significativa. Estos datos demuestran que el antagonista de A_{2B}, el Compuesto A, inhibe la inflamación en los animales tratados.

60 También se determinó el efecto del Compuesto A en un modelo de ratón de infarto de miocardio. Se sometieron ratones macho a ligadura de la arteria coronaria permanente o a cirugía simulada. Se administró el Compuesto A (4 mg/kg) por vía i.p. dos veces al día comenzando de inmediato o 1 hora después de la cirugía, y se siguió durante 14 días. Se realizó un ECO transtorácico para medir el diámetro telediastólico/telesistólico del VI (DTDVI o DTSVI), la superficie telediastólica del VI (STDVI) y el índice de función miocárdica (IFM) antes de la cirugía y después de 7, 14 y 28 días. El análisis de los biomarcadores de inflamación y lesión tisulares se realizó en los 28 días después del IM.

Todos los ratones con operación simulada estaban vivos a las 4 semanas. El 42 % de los ratones tratados con vehículo con IM fallecieron durante las 4 semanas. Por el contrario, la tasa de mortalidad de los ratones tratados con el Compuesto A con IM solo fue del 25 %.

5 Los ratones con IM desarrollaron la remodelación tisular adversa y el deterioro de la función miocárdica como se demuestra por los aumentos significativos del DTDVI y DTSVI, de la STDVD y del IFM en comparación con los de los ratones simulados (**FIG. 9A-D**). El tratamiento con el Compuesto A de inmediato o 1 h después de la cirugía redujo significativamente las dimensiones del VI/VD y redujo el IFM, lo que sugiere que el Compuesto A inhibió la remodelación del miocardio adversa y mejoró la función miocárdica en ratones con IM. El Compuesto A no tuvo
10 ningún efecto sobre la remodelación/función miocárdica en ratones con simulación.

Se analizaron los biomarcadores en plasma de la inflamación y la lesión miocárdica el día 28 después del IM. Las concentraciones en plasma de IL-6, TNF- α y ST2 aumentaron significativamente en los ratones con IM en comparación con ratones con operación simulada. El tratamiento con el Compuesto A inmediatamente después de
15 la cirugía redujo significativamente las concentraciones de todos los biomarcadores en plasma en ratones con IM (**FIG. 10A-C**). El Compuesto A no tuvo ningún efecto sobre los biomarcadores en plasma en los ratones con operación simulada. Las moléculas solubles de adhesión celular (CAM), tales como sE-selectina, sICAM y sVCAM, son importantes biomarcadores en circulación para los procesos inflamatorios en las enfermedades cardiovasculares. El tratamiento con el Compuesto A inhibió significativamente el aumento de los niveles en plasma
20 de las moléculas de adhesión celular solubles en los ratones con IM (**FIG. 11A-C**).

En resumen, estos resultados indican que el tratamiento con el Compuesto A mejora significativamente la función miocárdica, reduce los biomarcadores inflamatorios en circulación y, por lo tanto, reduce la mortalidad en el modelo de ratón de remodelación tras un IM.

25 **Ejemplo 6: Evaluación preclínica de Compuesto A**

El presente ejemplo incluye varios experimentos preclínicos que muestran la eficacia del Compuesto A en el cuidado de los animales tras un infarto de miocardio (IM).

30 *Modelo de rata de remodelación tras un infarto de miocardio (IM) y taquicardia ventricular (TV).*

Se determinaron los efectos del Compuesto A en un modelo de rata de remodelación tras un IM y VT. Se provocó el IM mediante la oclusión durante 25 minutos en la ligadura coronaria descendente anterior izquierda seguida de
35 reperfusión. Una semana más tarde, las ratas recibieron vehículo o Compuesto A (100 mg/kg) una vez al día mediante alimentación por sonda oral. Se obtuvieron ecocardiogramas (ECO) en serie para medir la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), el volumen de impulso y el volumen telesistólico del VI (VTSVI) al inicio del estudio, 1 semana y 5 semanas después del IM. Se realizaron estudios electrofisiológicos, cartografía óptica, histología y análisis de biomarcadores a las 5 semanas del IM.

40 Los ECO obtenidos al inicio, 1 semana y 5 semanas después de un IM mostraron evidencias de remodelación progresiva del VI incluyendo una reducción significativa de la fracción de eyección del VI y el volumen de impulso, y un aumento significativo del volumen telesistólico del VI en las ratas con IM. En este modelo, se ha observado la reducción adicional de la FEVI de manera sistemática entre 1 semana y 5 semanas después del IM. Por
45 consiguiente, en el estudio actual, la FEVI se reduce de $56,0 \pm 2,1$ % en 1 semana después del IM a $40,7 \pm 2,2$ % a las 5 semanas del IM. Por el contrario, en los animales tratados con el Compuesto A, la FEVI aumentó ligeramente de $53,1 \pm 3,2$ % a $55,6 \pm 2,6$ % (**FIG. 12B**). Además, el Compuesto A redujo significativamente el aumento del VTSVI (**FIG. 12A**). Todos estos resultados sugieren que el Compuesto A mejoró significativamente la función cardiaca y la remodelación tras el IM en la rata. Por el contrario, la pirfenidona, que no es un antagonista de A_{2B} , pero que ha
50 demostrado ser capaz de mitigar la fibrosis ventricular izquierda, no aumentó el VTSVI, sino que solo inhibió ligeramente su reducción posterior (**FIG. 12B**).

La taquicardia ventricular (TV) es una causa frecuente de mortalidad en los pacientes que han sufrido un infarto, incluso con el tratamiento de revascularización coronaria actual. En este modelo de rata de remodelación posterior al
55 IM, la TV fue inducible de manera sistemática en más de la mitad de los animales. Por lo tanto, se determinó el efecto del Compuesto A en la inducción de la TV a las 5 semanas del IM. Como se muestra en la Tabla 3, la tasa de inducción de la TV fue del 54 % (6 de 11) en los controles de vehículo, mientras que el Compuesto A redujo de manera significativa la inducción de la TV al 9 % (1 de 11).

60 **Tabla 3. Capacidad de inducción de la TV en modelo de rata de remodelación tras un IM**

	N total	TV	Sin TV	% de TV
Placebo	11	6	5	54 %
Compuesto A	11	1	10	9 %

**, p < 0,05 en comparación con el control de vehículo usando la prueba de ji-cuadrado*

La conducción del impulso eléctrico anormal en la zona limítrofe del infarto (ZLI) es importante en la patogénesis de las arritmias posteriores a un IM. Como se muestra en los mapas de vectores de conducción (**FIG. 13A-B**), el grupo de control de vehículo tiene una velocidad de conducción mucho menor que los animales tratados con el Compuesto A. Para cuantificar el impacto del Compuesto A en las propiedades de conducción, se midieron las velocidades de conducción (VC) para las zonas infartadas, limítrofes y normales del miocardio del VI. Las VC en las zonas normales fueron superiores entre todas las zonas y fueron similares entre los grupos de placebo y de Compuesto A (**FIG. 14A**). Por otra parte, las VC de las zonas infartadas del grupo de control con placebo fueron inferiores entre todas las zonas, y se mejoraron significativamente con el Compuesto A (**FIG. 14C**). Por último, las VC en las ZLI de ambos grupos resultaron estar entre las de las zonas no infartadas y las zonas infartadas. Sin embargo, las VC en las ZLI del grupo de Compuesto A fueron significativamente superiores a las de las ZLI del control de placebo (**FIG. 14B**).

La conducción anormal en la ZLI se debe a la remodelación tisular. La fibrosis excesiva en la ZLI es un importante sustrato para la vulnerabilidad a la TV. Como se muestra en la **FIG. 15A-B**, el análisis de las ZLI del control de vehículo reveló más proyecciones heterogéneas, en parches, de fibrosis desde las zonas infartadas a las ZLI. Estas proyecciones fibróticas son menores en las ZLI del grupo tratado con el Compuesto A, lo que sugiere que el Compuesto A inhibió la fibrosis en la ZLI asociada con la mejora de la velocidad de conducción, lo que puede explicar la notable reducción de la capacidad de inducción de la TV.

Los biomarcadores de inflamación (IL-6) y de lesión tisular (BNP y (PAI-1) en plasma se analizaron a las 5 semanas del IM. Las concentraciones de IL-6 y PAI-1 en plasma aumentaron significativamente en las ratas después del IM en comparación con las ratas normales. El tratamiento con el Compuesto A redujo significativamente todos estos biomarcadores en plasma en ratas después del IM. Además, hubo una tendencia del Compuesto A a inhibir el aumento de BNP ($P = 0,16$) en ratas después del IM. (**FIG. 16A-C**)

Además, el presente ejemplo usó un plan de tratamiento clínicamente relevante en el que el fármaco se administró después de la terapia de reperfusión y una vez establecida la disfunción del VI. Por otra parte, los efectos del tratamiento se midieron usando criterios de valoración clínicamente relevantes tales como el volumen telesistólico del ventrículo izquierdo y la FEVI.

Los resultados del estudio del modelo de rata de remodelación después de un IM indican que el tratamiento con el Compuesto A mejora significativamente la función miocárdica y reduce la vulnerabilidad a la TV. Esto probablemente se debe a la reducción de los mediadores inflamatorios y a la inhibición de la fibrosis en la zona limítrofe del miocardio isquémico.

35 **Ejemplo comparativo 7: Otros antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B}**

El presente ejemplo usa miocitos cardiacos humanos para ensayar otros dos antagonistas del receptor de la adenosina A_{2B} sobre su efecto sobre la liberación de IL-6 inducida por NECA.

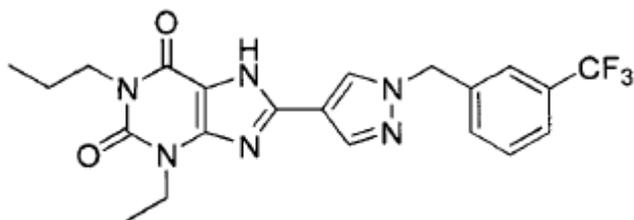
Se trataron miocitos cardiacos humanos (HCM) solo con NECA, o en combinación con el Compuesto A, el Compuesto B (*N*-[5-(1-ciclopropil-2,6-dioxo-3-propil-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*-purin-8-il)-piridin-2-il]-*N*-etil-nicotinamida, también conocido como ATL-801) o el Compuesto C (2-(4-benciloxi-fenil)-*N*-[5-(2,6-dioxo-1,3-dipropil-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*-purin-8-il)-1-metil-1*H*-pirazol-3-il]acetamida). Como se muestra en la **FIG. 17**, la NECA aumentó significativamente la liberación de IL-6 desde los miocitos cardiacos humano (HCM). Sin embargo, el efecto de la NECA en los HCM fue inhibido por completo por cada uno de los antagonistas de AdoR de A_{2B} ensayados, el Compuesto A, B y C.

El presente ejemplo, por lo tanto, demuestra que estos otros antagonistas de AdoR de A_{2B} tienen la capacidad de inhibir la liberación de IL-6 inducida por NECA desde miocitos cardiacos humanos.

50

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula química:



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable, para su uso en la reducción de una arritmia en un paciente humano que ha sufrido un infarto de miocardio (IM).
2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el IM es IM agudo.
- 10 3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el IM es IM con elevación de ST (IMEST) o IM sin elevación de ST (IMSEST).
4. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el paciente está hemodinámicamente estable.
- 15 5. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el uso comprende la administración del compuesto al paciente, y la administración comienza durante el IM o inmediatamente después del IM.
- 20 6. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el uso comprende la administración del compuesto al paciente, y la administración comienza tras al menos aproximadamente 24 horas del IM.
- 25 7. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la administración del compuesto comienza tras al menos aproximadamente 3 días del IM.
8. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la administración del compuesto comienza tras al menos aproximadamente 5 días del IM.
- 30 9. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la administración del compuesto comienza tras al menos aproximadamente 7 días del IM.
10. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el uso comprende además la administración al paciente de un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE).
- 35 11. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el inhibidor de la ACE se selecciona del grupo que consiste en captopril, enalapril, lisinopril, perindopril y ramipril.
- 40 12. El compuesto para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el compuesto se administra al paciente por una vía seleccionada entre la administración sistémica, oral, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, o la administración por inhalación.