

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 804**

51 Int. Cl.:

A61K 31/196 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2009 PCT/EP2009/059266**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010 WO2010007176**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2009 E 09780800 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2317995**

54 Título: **Inhibidores de MRP4 y agentes que estimulan la actividad de MRP4 para el tratamiento de trastornos cardíacos**

30 Prioridad:

17.07.2008 EP 08160652

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

26.05.2017

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris Cédex 13, FR**

72 Inventor/es:

**HULOT, JEAN-SÉBASTIEN;
LOMPRE, ANNE-MARIE y
SASSI, YASSINE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 613 804 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

Inhibidores de MRP4 y agentes que estimulan la actividad de MRP4 para el tratamiento de trastornos cardíacos

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a inhibidores de la proteína 4 de resistencia a múltiples fármacos (MRP4) para el tratamiento y/o la prevención de trastornos cardíacos, tales como insuficiencia cardíaca aguda o crónica y choque cardiogénico.

10 La invención se refiere asimismo a agentes que estimulan la actividad de MRP4 para el tratamiento y/o la prevención de la hipertrofia cardíaca.

La presente invención se refiere a la regulación génica y a la fisiología celular en cardiomiocitos. Concretamente, la invención se refiere al uso de inhibidores de MRP4 para bloquear el eflujo de nucleótidos cíclicos fuera de las células.

15 **Estado de la técnica**

20 La proliferación y crecimiento celulares son dos mecanismos que conducen a la remodelación cardíaca observada habitualmente en células musculares vasculares y cardíacas en respuesta a diversos estímulos patológicos.

El remodelado cardíaco hipertrófico es una respuesta adaptable del corazón a numerosas formas de enfermedad cardíaca, incluyendo hipertensión, anomalías de carga mecánica, infarto de miocardio, disfunción valvular, arritmias cardíacas, trastornos endocrinos y mutaciones genéticas en genes de la proteína contráctil cardíaca. Para un intervalo de tiempo amplio, la respuesta hipertrófica de los cardiomiocitos se ha considerado como un estado compensatorio útil para mantener el rendimiento cardíaco. No obstante, actualmente se considera que dicho remodelado después de los estímulos inducidos por la enfermedad tiene una mala adaptación y contribuye a la progresión de la insuficiencia cardíaca y propicia la arritmia y la muerte súbita. En consecuencia, la hipertrofia cardíaca se ha establecido como un factor de riesgo independiente para la morbilidad y mortalidad cardíacas.

30 Se observa un patrón estereotípico de cambios en la expresión génica que incluye la reexpresión de genes fetales. Dichas diferencias están controladas por vías de señalización subyacentes particulares. Los avances en la descripción de las vías de señalización implicadas en el remodelado cardíaco patológico y/o la proliferación de células de músculo liso vascular han indicado vías de regulación controladas por nucleótidos cíclicos. Los nucleótidos cíclicos, a saber, adenosín 3',5'-monofosfato (AMPc) y guanosín 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc), son segundos mensajeros clave que actúan como reguladores negativos de la proliferación de células de músculo liso. La síntesis de AMP cíclico o GMP cíclico en las células está catalizada por las enzimas adenilil o guanilil ciclasa, respectivamente (McDonald y Murad, 1996; Sunahara *et al.*, 1996). La elevación de las concentraciones intracelulares de AMPc y GMPc por análogos de AMPc o GMPc inhibe, de forma independiente, la proliferación de células de músculo liso vascular de conejo. (Assender JW. *et al.*, 1992). La reexpresión de la proteína quinasa G (PKG) activa constitutivamente (o PKG de tipo natural con estimulación por GMPc) inhibe la migración de las CMLV, potencia la apoptosis, reduce la proliferación, y disminuye la formación de neoíntima después de una lesión vascular. (Boerth NJ *et al.*, 1997; Sinnaeve P *et al.* 2002). GMPc (guanosín 3',5'-monofosfato cíclico) también es un mediador importante de numerosos procesos en las células musculares, incluyendo cardiomiocitos (Silberbach M *et al.* 2001). La estimulación de la vía NO/GMPc evita la hipertrofia cardíaca a través de una regulación negativa de la expresión de genes pro-hipertróficos (Silberbach M. *et al.* 2001; Barouch LA, *et al.* 2002). Conocimientos adicionales sobre el papel de los nucleótidos cíclicos en la prevención de la respuesta hipertrófica proceden de un modelo de bandedo aórtico en la rata, en la que el uso de inhibidores de la fosfodiesterasa sildenafil (que cataboliza nucleótidos cíclicos) da como resultado una importante prevención de la hipertrofia cardíaca por la acumulación de nucleótidos cíclicos intracelular.

55 A raíz de estos resultados, el enfoque se ha centrado en el proceso implicado en la eliminación de nucleótidos cíclicos. Estos nucleótidos cíclicos pueden degradarse por miembros específicos de la superfamilia de la fosfodiesterasa (PDE) que son responsables de la hidrólisis de AMPc y GMPc intracelulares. (Rybalkin *et al.*, 2003).

Recientemente, Chen *et al.* (JBC, 2001) han informado que AMPc y GMPc pueden transportarse también por transportadores de eflujo activo, a saber, proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP) MRP4 y MRP5, codificadas por los genes transportadores de casete de unión a ATP de clase C (ABCC) 4 y ABCC5, respectivamente. Entre esta familia de transportadores, MRP4 y MRP5 muestran una alta afinidad por AMPc y GMPc. Sin embargo, hasta la fecha, la función fisiológica de estas proteínas aún se desconoce. Recientemente, MRP4 y MRP5 se han identificado como bombas de exportación dependientes de ATP para nucleótidos cíclicos (Jedlitschky *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001) y se ha demostrado que MRP4 y MRP5 se expresan en las arterias coronaria y pulmonar porcinas (Mitani *et al.*; 2003).

65 El documento WO 98/48812 divulga el uso de una deshidroepiandrosterona sulfatada en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca crónica.

Gong *et al.*, *American Heart Journal*, 2006 divulgan el uso de metotrexato en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca crónica.

5 Hansen *et al.*, *American Heart Journal*, 1997 divulgan el uso de verapamilo en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva.

Philip S *et al.*, *International Journal of Cardiology*, 2007 divulgan el uso de ibuprofeno en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca.

10 Juhlin T. *et al.*, *European Journal of Heart Failure*, 2004, divulgan el uso de diclofenaco en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca, pero especifican que este inhibidor de MRP4 específico tiene un efecto perjudicial.

15 Sanada *et al.*, *Journal of Cardiac Failure*, 2007, divulgan el uso de dipiridamol en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica.

El documento WO02/09761 divulga el uso de una combinación de un antagonista del receptor de aldosterona epoxi-esteroideo y un bloqueador del canal de calcio en el tratamiento de trastornos circulatorios.

20 Pasotti C *et al.*, *US National Library of Medicine*, 1983, divulgan el uso de dilazep en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca crónica.

Birkenmeier *et al.*, *US National Library of Medicine*, 192007, divulgan la administración de digitálicos y dilazep en sujetos con insuficiencia cardíaca.

25 Goldenberg *et al.*, *Database Biosis*, 2001, se refiere al papel de la apoptosis inducida por angiotensina II en cardiomiocitos.

30 El documento WO2005/044244 divulga el uso de inhibidores de MRP4 en trombocitos para el tratamiento del choque cardiogénico.

Objeto de la invención

35 La presente solicitud demuestra formalmente por vez primera que (1) MRP4 se expresa y es funcional en cardiomiocitos y (2) que los efectos mediados por AMPc en cardiomiocitos pueden ser favorecidos por la inhibición de MRP4. Debido a que MRP4 también está presente en los cardiomiocitos y que la regulación del nivel de AMPc controla el crecimiento cardíaco, MRP4 es, por lo tanto, una diana para el remodelado cardíaco.

40 La invención se refiere a un inhibidor de MRP4 para el tratamiento de un trastorno cardíaco seleccionado entre el grupo que consiste en insuficiencia cardíaca aguda y choque cardiogénico.

45 La invención se refiere a un método para tratar un trastorno cardíaco seleccionado entre el grupo que consiste en insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica y choque cardiogénico, en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de MRP4.

La invención también se refiere al uso de un inhibidor de MRP4 para la fabricación de un medicamento que favorezca la actividad contráctil de los cardiomiocitos.

50 La invención también se refiere a un agente que estimula la actividad de MRP4 para el tratamiento y/o la prevención de la hipertrofia cardíaca.

La invención se refiere a un agente que estimula la actividad de MRP4 para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica.

55 La invención se refiere a un método de tratamiento de la hipertrofia cardíaca en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un agente que estimula la actividad de MRP4.

60 La invención también se refiere al uso de un agente que estimula la actividad de MRP4 para la fabricación de un medicamento para inhibir la respuesta hipertrófica de los cardiomiocitos.

Descripción detallada de la invención

65 **Definiciones**

El término "MRP4" tiene su significado general en la materia y hace referencia a la proteína 4 de resistencia a múltiples fármacos. MRP4 se designa también como proteína ABCC4, miembro 4 de la subfamilia C (RTFQ/MRP) de casete de unión a ATP, EST 170205, transportador ABC relacionado con MRP/TMAOc (TMAOB), transportador multiespecífico de aniones orgánicos B (TMAOB), proteína 4 de resistencia a múltiples fármacos en la materia. El término puede incluir MRP4s presentes de manera natural y variantes y formas modificadas de las mismas. El término también puede referirse a proteínas de fusión en las que se fusiona un dominio de MRP4 que retiene al menos una actividad de MRP4, por ejemplo, con otro polipéptido (por ejemplo, un marcador polipeptídico, tal como son convencionales en la materia). La MRP4 puede ser de cualquier fuente, pero generalmente es una MRP4 de mamífero (por ejemplo, de seres humanos y primates no humanos), particularmente una MRP4 humana. Se proporciona una secuencia de aminoácidos nativa de MRP4 a modo de ejemplo en la base de datos GenPept con número de acceso AAH41560 y se proporciona una secuencia de nucleótidos nativa a modo de ejemplo que codifica MRP4 en la base de datos GenBank con número de acceso NM_005845.

La expresión "inhibidor de MRP4" ha de entenderse en el sentido amplio, abarca inhibidores del eflujo celular de nucleótidos cíclicos mediado por MRP4, denominado en lo sucesivo actividad de MRP4, e inhibidores de la expresión de MRP4.

Un "inhibidor de la expresión" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir o reducir de manera significativa la expresión de un gen. Por consiguiente, un "inhibidor de la expresión de MRP4" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir o reducir significativamente la expresión del gen que codifica el gen de MRP4.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "inhibidor selectivo de MRP4" se refiere a un inhibidor que es selectivo de MRP4 en comparación con otras proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRPs), tales como MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, MRP6, MRP7, MRP8, MRP9, MRP10, MRP11, MRP12 y MRP13. Por "selectivo" se entiende que la Ki del inhibidor de MRP4 es al menos 5 veces, preferentemente 10 veces, más preferentemente 25 veces, aún más preferentemente 100 veces menor que la Ki de otras MRP. La Ki de un inhibidor de MRP4 puede determinarse utilizando diversos métodos adecuadamente conocidos en la materia.

La expresión "agente que estimula la actividad de MRP4" ha de entenderse en el sentido amplio, abarca agentes que estimulan el eflujo celular de nucleótidos cíclicos mediado por MRP4, denominado en lo sucesivo actividad de MRP4, y agentes que estimulan la expresión de MRP4. Normalmente, los ejemplos de agentes que estimulan la expresión de MRP4 son el receptor nuclear de hormonas, agonista del receptor constitutivo de androstano: 1,4-bis[2-(3,5-dicloropiridiloxi)]benceno (TCPOBOP) (Masson D, 2008), 6-(4-clorofenil)imidazo[2,1-b][1,3]tiazol-5-carbaldehído O-(3,4-diclorobencil)oxima (CITCO) (Maglich JM 2003). Alternativamente, otro ejemplo de agentes que estimulan la expresión de MRP4 es un vector genético (por ejemplo, plásmidos, vectores virales...) que expresa MRP4. Normalmente, este vector puede administrarse específicamente al corazón.

La expresión "molécula pequeña orgánica" se refiere a una molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas utilizadas generalmente en productos farmacéuticos. El término excluye las macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas pequeñas orgánicas preferentes oscilan en el intervalo de tamaño de hasta aproximadamente 5.000 Da, más preferentemente hasta 2.000 Da, y más preferentemente hasta aproximadamente 1.000 Da.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino, y un primate. Preferentemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un ser humano.

En su sentido más amplio, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a la reversión, alivio, inhibición del progreso o prevención del trastorno o patología al que se aplica dicho término, o de uno o más síntomas de dicho trastorno o patología.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra indeseada cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según proceda. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un material de relleno, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo.

Métodos y usos

La invención se refiere a un inhibidor de MRP4 para el tratamiento de un trastorno cardíaco seleccionado entre el grupo que consiste en insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica y choque cardiogénico. La invención se refiere a un método para tratar un trastorno cardíaco seleccionado entre el grupo que consiste en insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica y choque cardiogénico, en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de MRP4.

La invención también se refiere al uso de un inhibidor de MRP4 para la fabricación de un medicamento para estimular la contractilidad cardíaca.

La invención también se refiere a un agente que estimula la actividad de MRP4 para el tratamiento y/o la prevención de la hipertrofia cardíaca. La invención se refiere a un método para tratar la hipertrofia cardíaca en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un agente que estimula la actividad de MRP4. La invención también se refiere al uso de un agente que estimula la actividad de MRP4 para la fabricación de un medicamento para inhibir la respuesta hipertrófica de los cardiomiocitos.

La presente invención proporciona igualmente métodos y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) para tratar y/o prevenir la hipertrofia cardíaca, la insuficiencia cardíaca aguda y crónica, y el choque cardiogénico.

Normalmente, el tratamiento puede mejorar uno o más síntomas de la hipertrofia cardíaca o insuficiencia cardíaca, tales como proporcionar una mayor capacidad de ejercicio, aumento del volumen de eyección de sangre, presión diastólica final del ventrículo izquierdo, dimensiones diastólica y sistólica final del ventrículo izquierdo, tensión de la pared y grosor de la pared, calidad de vida, morbilidad y mortalidad relacionadas con la enfermedad, reversión del remodelado progresivo, mejora de la dilatación ventricular, aumento del volumen minuto cardíaco, alivio del deterioro del rendimiento de la bomba, mejora de la arritmia.

La invención también se relaciona con el uso de un inhibidor de MRP4 para favorecer el crecimiento de los cardiomiocitos *in vitro*.

La invención se refiere asimismo a un método para cultivar cardiomiocitos, en el que los cardiomiocitos se cultivan en presencia de un inhibidor de MRP4.

En una realización preferente, un inhibidor de MRP4 de acuerdo con la invención es un inhibidor selectivo de MRP4.

En una realización, el inhibidor de MRP4 puede ser un inhibidor de bajo peso molecular, por ejemplo, una molécula pequeña orgánica. Los ejemplos de inhibidor de MRP4 se presentan en el documento US2006/0286041, en Reid *et al.* (*Molecular Pharmacology*, 63: 1094-1103, 2003) y en Rémon *et al.* (*J Am Soc Nephrol* 13:595-603, 2002).

Los inhibidores de MRP4 orgánicos pequeños que pueden utilizarse por la invención incluyen, entre otros, compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en N-acetil-dinitrofenil-cisteína, benzbromarona, colato, diclofenaco, dipirimidol, 3-glucurónido de deshidroepiandrosterona, 3-sulfato de deshidroepiandrosterona, dilazep, dinitrofenil-5-glutión, 17-[beta]-glucurónido de estradiol, 3,17-disulfato de estradiol, 3-glucurónido de estradiol, 3-sulfato de estradiol, 3-sulfato de estrona, flurbiprofeno, folato, N5-formil-tetrahydrofolato, glicocolato, sulfato del ácido glicolítico, ibuprofeno, indometacina, indoprofeno, ketoprofeno, sulfato del ácido litocólico, metotrexato, MK571 (([libra]-3-[[[3-[2-(7-cloro-2-quinolinil)etenil]fenil]-[[3-dimetilamino)-3-oxopropil]tio]metil]tio]propanoico), [alfa]-naftil-[beta]-D-glucurónido, [pi]bosida de nitrobenzilmercaptapurina, probenecida, PSC833, sulfinpirazona, tauroquenodesoxicolato, taurocolato, taurodesoxicolato, taurolitocolato, sulfato del ácido taurolitocólico, toptotecán, trequinsina, verapamilo y zap[pi]nast, opcionalmente en forma de racematos, enantiómeros, diastereómeros y opcionalmente sales de adición de ácido farmacológicamente aceptables e hidratos de los mismos.

En una realización de la invención, el inhibidor de MRP4 no es un inhibidor de fosfodiesterasa (PDE) seleccionado entre el grupo que consiste en inhibidores de PDE3, inhibidores de PDE4, inhibidores de PDE5.

En una realización de la invención, el inhibidor de MRP4 no se selecciona entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona sulfatada, metotrexato, verapamilo, ibuprofeno, diclofenaco, dipirimidol y dilazep.

Se entiende por sales de adición de ácido del inhibidor de MRP4 con ácidos farmacológicamente aceptables, por ejemplo, sales seleccionadas entre el grupo que comprende clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, hidrosulfato, hidrofosfato, hidrometanosulfonato, hidronitrato, hidromaleato, hidroacetato, hidrobencato, hidrocitrato, hidrofumarato, hidrotartrato, hidrooxalato, hidrosucinato, hidrobencato e hidro-p-toluensulfonato, preferentemente clorhidrato, bromhidrato, hidrosulfato, hidrofosfato, hidrofumarato e hidrometanosulfonato. De las sales de adición de ácido anteriormente mencionadas, resultan particularmente preferentes de acuerdo con la invención, las sales de ácido clorhídrico, ácido metanosulfónico, ácido benzoico y ácido acético.

En otra realización, el inhibidor de MRP4 es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede bloquear parcial o completamente la actividad de transporte de MRP4 (es decir, anticuerpo o fragmento de anticuerpo bloqueador parcial o completo de MRP4).

En particular, el inhibidor de MRP4 puede consistir en un anticuerpo dirigido contra MRP4, de manera tal, que dicho anticuerpo bloquea la actividad de MRP4.

Los anticuerpos dirigidos contra MRP4 pueden crearse de acuerdo con métodos conocidos mediante la

administración del antígeno o epítipo apropiado a un animal huésped seleccionado, por ejemplo, entre cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Diversos adyuvantes conocidos en la materia pueden utilizarse para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, resultan preferentes los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra MRP4 pueden prepararse y aislarse utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante estirpes celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, entre otros, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Cote *et al.*, 1983); y la técnica de hibridoma de VEB (Cole *et al.* 1985). Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios anti-MRP4. Los inhibidores de MRP4 útiles en la práctica de la presente invención incluyen también fragmentos anti-MRP4 incluyendo, entre otros, fragmentos F(ab')₂, que pueden generarse por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacto, y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir una rápida identificación de los fragmentos que tienen la especificidad deseada por MRP4.

También se pueden preparar anticuerpos anti-MRP4 humanizados y fragmentos de anticuerpos de los mismos de acuerdo con técnicas conocidas. Los "anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (por ejemplo, de roedor) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que se reemplazan residuos de una región hipervariable (CDRs) del receptor con residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan residuos de la región variable (RV) de la inmunoglobulina humana con los correspondientes residuos no humanos. Es más, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las RV son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Se describen métodos para preparar anticuerpos humanizados, por ejemplo, por Winter (patente de Estados Unidos n.º 5.225.539) y Boss (Celltech, patente de Estados Unidos n.º 4.816.397).

En aún otra realización, el inhibidor de MRP4 es un aptámero.

Los aptámeros son una clase de moléculas que representan una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos o de oligopéptidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos pueden aislarse mediante evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias aleatorias puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S. D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo constreñida conformacionalmente mostrada en una proteína de plataforma, tal como tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan a partir de bibliotecas combinatorias por métodos de doble híbrido (Colas *et al.*, 1996).

Otro aspecto de la invención se refiere a la expresión de un inhibidor selectivo de MRP4.

Las secuencias de MRP muestran baja identidad de secuencia (<60 %), los inhibidores de la expresión de MRP4 que pueden utilizarse de acuerdo con la invención proporcionan ventajosamente una inhibición selectiva de la expresión de MRP4, en comparación con otra expresión de MRPs.

Los inhibidores de la expresión de MRP4 para su uso en la presente invención pueden basarse en construcciones de oligonucleótidos anti-sentido. Los oligonucleótidos anti-sentido, incluyendo moléculas de ARN anti-sentido y moléculas de ADN anti-sentido, actúan bloqueando directamente la traducción de ARNm de MRP4 mediante la unión al mismo, y por consiguiente, previenen la traducción de proteína o aumentan la degradación de ARNm, disminuyendo así el nivel de MRP4s, y en consecuencia, la actividad, en una célula. Por ejemplo, pueden sintetizarse oligonucleótidos anti-sentido de al menos aproximadamente 15 bases y son complementarios de regiones únicas de la secuencia del transcrito de ARNm que codifica MRP4, por ejemplo, mediante técnicas de fosfodiéster convencionales y administrarse, por ejemplo, por inyección o infusión intravenosa. Los métodos para utilizar técnicas anti-sentido para inhibir específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia es conocida son adecuadamente conocidos en la materia (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321; y 5.981.732).

Los ARN inhibidores pequeños (ARNip) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión de MRP4 para su uso en la presente invención. La expresión de MRP4 puede reducirse poniendo en contacto un sujeto o célula con un ARN bicatenario pequeño (ARNbp) o un vector o construcción, causando la producción de un ARN bicatenario pequeño, de manera que la expresión de MRP4 se inhibe específicamente (es decir, interferencia de ARN o iARN). Los métodos para seleccionar un ARNbp o vector que codifica ARNbp correspondiente son bien conocidos en la materia de genes cuya secuencia es conocida (por ejemplo, véanse Tuschl, T. *et al.* (1999); Elbashir, S. M. *et al.* (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. *et al.* (2002); Brummelkamp, TR. *et al.* (2002); patentes de Estados Unidos n.º 6.573.099 y 6.506.559; y las publicaciones de patentes internacionales n.º WO 01/36646, WO 99/32619, y WO 01/68836). Se ha desarrollado un ARNip que silencia eficazmente MRP4. Este ARNip se orientará selectivamente a las diversas variantes de corte y empalme de MRP4 (NM_005845, BC041560, AY081219, AF541977, AY133680, AY133679, AY133678). La secuencia sentido es 5'-CAGUGUUCUUACACUUCUTT-3 '(SEQ ID NO. 7) y la antisentido: 5'-AGGAAGUGUAAGAACACUGTT-3 '(SEQ ID NO. 8).

Los ARNhc (ARN de horquilla corta) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión de MRP4 para su uso en la presente invención. Un ejemplo de ARN de horquilla corta de acuerdo con la invención es un ARNhc que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO. 9: GCAAATGTGGATCCGAGAA.

Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión de MRP4 para su uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. El mecanismo de la acción de la ribozima implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima con el ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. De este modo, son útiles en el alcance de la presente invención las moléculas de ribozima de motivo de horquilla o cabeza de martillo modificadas por ingeniería genética que catalizan específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de secuencias de ARNm de MRP4. Los sitios de escisión por ribozima específicos en cualquier diana de ARN potencial se identifican inicialmente explorando en la molécula diana los sitios de escisión por ribozima, que incluyen normalmente las siguientes secuencias, GUA, GUU, y GUC. Una vez identificadas, se pueden evaluar las secuencias de ARN cortas de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión de las características estructurales predichas, tales como estructura secundaria, que pueden hacer inadecuada la secuencia de oligonucleótidos.

Se pueden preparar por métodos conocidos tanto oligonucleótidos antisentido como ribozimas útiles como inhibidores de la expresión de MRP4. Estos incluyen técnicas para la síntesis química, tales como, por ejemplo, síntesis química por fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, pueden generarse moléculas de ARN antisentido por transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Dichas secuencias de ADN pueden incorporarse a una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de la ARN polimerasa adecuados, tales como los promotores de la polimerasa T7 o SP6. Diversas modificaciones en los oligonucleótidos de la invención pueden introducirse como medio para aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las posibles modificaciones incluyen, entre otros, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de enlaces fosfodiésterasa en el esqueleto del oligonucleótido.

Los oligonucleótidos antisentido, ARNips, ARNhcs y ribozimas de la invención pueden administrarse *in vivo* solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia de ácido nucleico de oligonucleótido antisentido, ARNip, ARNhc o ribozima a las células y, preferentemente, a las células que expresan MRP4. Preferentemente, el vector transporta el ácido nucleico a células con degradación reducida en relación con el grado de degradación que resultaría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, entre otros, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado por la inserción o incorporación de las secuencias de ácidos nucleicos de oligonucleótido antisentido, ARNip, ARNhc o ribozima. Los vectores virales son un tipo preferente de vector e incluyen, entre otros, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus, tales como virus de la leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del tumor mamario murino, y virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociados; virus de tipo SV40; poliomavirus; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus vacuna; virus de la poliomielitis; y virus de ARN, tal como un retrovirus. Se pueden emplear con facilidad otros vectores no nombrados pero conocidos en la materia.

Los vectores virales preferentes se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que se han reemplazado genes no esenciales con el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (por ejemplo, lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa del ARN viral genómico a ADN con la integración proviral posterior en el ADN celular del huésped. Los retrovirus se han aprobado para ensayos de terapia génica humana. Los más útiles son aquellos que son deficientes de replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Dichos vectores de expresión retrovirales alterados genéticamente tienen utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes *in vivo*. Los protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes de replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno a un plásmido, transfección de una estirpe celular de empaquetamiento con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la estirpe celular de empaquetamiento, recogida de partículas virales de los medios de cultivo

tisular, e infección de las células diana por partículas virales) se proporcionan en Kriegler, 1990 y en Murry, 1991).

Los virus preferentes para ciertas aplicaciones son los adenovirus y virus adenoasociados (VAA), que son virus de ADN bicatenarios que ya se han aprobado para su uso humano en terapia génica. Se conocen en realidad 12 serotipos de VAA diferentes (AAV1 a 12), cada uno con diferente tropismo tisular (Wu, *Z Mol Ther* 2006; 14:316-27). Los VAA recombinantes se derivan del parvovirus AAV2 dependiente (Choi, *VW J Virol* 2005; 79:6801-07). Los virus adenoasociados de tipo 1 a 12 pueden modificarse por ingeniería genética para ser deficientes de replicación y son capaces de infectar un amplio intervalo de tipos y especies celulares (Wu, *Z Mol Ther* 2006; 14:316-27). Tiene ventajas adicionales, tales como, estabilidad térmica y en disolventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hematopoyéticas; y falta de inhibición de la superinfección, permitiendo, en consecuencia, múltiples series de transducciones. Supuestamente, el virus adenoasociado puede integrarse en ADN celular humano de manera específica del sitio, minimizando, de este modo, la posibilidad de mutagénesis por inserción y la variabilidad de la expresión del gen insertado, características de la infección retroviral. Además, las infecciones por virus adenoasociados de tipo natural se han seguido en cultivos tisulares durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un acontecimiento relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de manera extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito extensamente en la materia y son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989. En los últimos años, los vectores plasmídicos se han utilizado como vacunas de ADN para administrar genes codificantes de antígenos a células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para esto porque no tienen los mismos problemas de seguridad que muchos de los vectores virales. Estos plásmidos, sin embargo, que tienen un promotor compatible con la célula huésped, pueden expresar un péptido a partir de un gen codificado operativamente en el plásmido. Algunos plásmidos utilizados habitualmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, PRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos en la materia. Adicionalmente, los plásmidos pueden diseñarse a medida utilizando enzimas de restricción y reacciones de ligamento para retirar y añadir fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos pueden administrarse por una variedad de vías parenteral, mucosal y tópica. Por ejemplo, el plásmido de ADN puede inyectarse por vías intramuscular, intradérmica, subcutánea, o por otras vías. También puede administrarse mediante pulverizadores o gotas intranasales, supositorio rectal y por vía oral. También puede administrarse a la epidermis o a una superficie mucosa utilizando una pistola génica. Los plásmidos pueden administrarse en una solución acuosa, secarse sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de ADN que incluye, entre otros, liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

En una realización preferente, la secuencia de ácido nucleico de oligonucleótido antisentido, ARNip, ARNbc o ribozima está bajo el control de una región reguladora heteróloga, por ejemplo, un promotor heterólogo. El promotor puede ser, por ejemplo, un promotor específico de músculo liso, tal como un promotor de alfa actina de músculo liso, promotor SM22 α , promotor específico cardíaco, tal como el promotor de la miosina cardíaca (por ejemplo, un promotor 2v de la cadena ligera de miosina cardíaca), promotor de troponina T o promotor de BNP. El promotor también puede ser, por ejemplo, un promotor viral, tal como un promotor de CMV o cualquier promotor sintético. El inhibidor selectivo de la actividad y/o expresión de MRP4 puede administrarse en forma de una composición farmacéutica, como se define a continuación.

Preferentemente, dicho inhibidor se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del inhibidor de MRP4 para tratar y/o prevenir trastornos cardíacos en una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención se decidirá por el doctor tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto específico empleado; composición específica empleada, edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta del paciente; tiempo de administración, vía de administración, y velocidad de excreción del compuesto específico empleado; duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en las materias médicas. Por ejemplo, está dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consigue el efecto deseado. No obstante, la dosificación diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto al día. Preferentemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg de principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación en el paciente a tratar. Un medicamento contiene normalmente aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del principio activo, preferentemente 1 mg a aproximadamente 100 mg del principio activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra normalmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal al día.

Métodos de identificación sistemática:

Los inhibidores de MRP4 o agentes que estimulan la actividad de MRP4 de la invención pueden identificarse además por métodos de identificación sistemática descritos en el estado de la técnica. Los métodos de identificación sistemática de la invención pueden llevarse a cabo de acuerdo con métodos conocidos.

5 El método de identificación sistemática puede medir la unión de un compuesto candidato a MRP4, o a células o membranas portadoras de MRP4, o a una proteína de fusión de la misma por medio de un marcado asociado directa o indirectamente con el compuesto candidato. Alternativamente, un método de identificación sistemática puede implicar medir o detectar cualitativa o cuantitativamente la competición de unión de un compuesto candidato al receptor con un competidor marcado (por ejemplo, inhibidor o sustrato).

15 Por ejemplo, puede insertarse ADNc de MRP4 en un vector de expresión que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Se pueden utilizar los siguientes sistemas de vector/huésped, tales como baculovirus/células insecto Sf9; retrovirus/estirpes celulares de mamíferos como HepB3, LLC-PK1, MDCKII, CHO, HEK293; vector de expresión/estirpes celulares de mamíferos como HepB3, LLC-PK1, MDCKII, CHO, HEK293. Dichos vectores pueden utilizarse entonces para transfectar células, de manera que dichas células expresen MRP4 recombinante en su membrana. También es posible utilizar estirpes celulares que expresan la proteína MRP4 endógena (THP-1, U937, WI-38, WI-38 (subestirpe VA-13), IMR-90, HEK-293).

20 Las células obtenidas como se ha descrito previamente pueden preincubarse con compuestos de ensayo y estimularse posteriormente con compuestos conocidos por elevar la producción celular de AMPc y/o GMPc (tales como forskolina, isoprenalina, para AMPc y SNP para GMPc). Los compuestos de ensayo se identifican de forma sistemática por su capacidad para potenciar los niveles intracelulares de AMPc y/o GMPc y reducir los niveles extracelulares de AMPc y/o GMPc.

25 En una realización adicional, las vesículas de membrana pueden prepararse a partir de estirpes celulares obtenidas como se ha descrito previamente. Las vesículas de membrana pueden entonces preincubarse con compuestos de ensayo. Posteriormente, se añaden AMPc, ATP y sistemas de regeneración de ATP (creatina quinasa y fosfocreatina) a las vesículas de membrana, y los compuestos se identifican de forma sistemática por su capacidad para inhibir la acumulación de AMPc en el interior de las vesículas de membrana.

Composiciones farmacéuticas

35 Un objeto adicional de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos cardíacos.

40 El inhibidor de MRP4 o el agente que estimula la actividad de MRP4 puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

45 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, puede administrarse el principio activo, solo o en combinación, con otro principio activo, en una forma de administración unitaria, como mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de vía oral, tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

50 Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede inyectarse. Estos pueden ser, en particular, soluciones salinas estériles isotónicas (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras la adición, en función del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

55 Las formas farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

65 Las soluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada de forma adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un

conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

El inhibidor de MRP4 o el agente que estimula la actividad de MRP4 de la invención puede formularse en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos, tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido, en el caso de dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede provocarse por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, resultará preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida al disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados previamente, cuando sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, 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 previamente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran con facilidad en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas previamente, aunque también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y hacer en primer lugar el diluyente líquido isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la materia a tenor de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse a 1.000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio de infusión propuesto. Se producirá necesariamente cierta variación de la dosificación en función de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

El inhibidor de MRP4 o el agente que estimula la actividad de MRP4 de la invención puede formularse en una mezcla terapéutica que comprende aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis o más o menos. También pueden administrarse dosis múltiples.

Además de los compuestos de la invención formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma utilizada actualmente.

55 Descripción de las figuras

La invención se ilustrará adicionalmente ante las siguientes figuras y ejemplos.

Figura 1. La ablación de MRP4 está asociada con la hipertrofia cardíaca progresiva. **(A)** Aumento dependiente de la edad en la relación peso del corazón a longitud de la tibia (PC/LT), los datos son de > 6 animales por punto de datos \pm EEM. **(B)** Histología tras la tinción con rojo sirio y área de miocitos cardíacos. **(C)** Área de miocitos ventriculares de corazones de ratones GI y con DG de MRP4 de 3 y 9 meses de vida que muestran hipertrofia cardíaca en corazones de ratones deficientes en MRP4 de 9 meses de vida en comparación con los GI de la misma edad. **(D)** Los parámetros ecocardiográficos muestran el grosor LVPW, el grosor IVS del corazón de ratones GI y con DG de MRP4 de 3 y 9 meses de vida (n = 4-6) (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001). **(E)** Acortamiento fraccional de los corazones de ratones con DG de MRP4 de 9 meses de vida en comparación con

los GI de la misma edad. **(F)** Porcentaje del acortamiento de los miocitos ventriculares aislados de ratones GI y con DG de MRP4 de 9 meses de vida.

Figura 2: La inhibición de MRP4 aumenta la actividad de PKA *in vitro*. Se infectaron miocitos ventriculares de rata adulta (MVRA) bien con AdshLuc o AdshMRP4 durante 3 días. **(A)** Inmunoelctrotransferencia representativa que muestra una disminución en la expresión de MRP4 y un aumento en la fosforilación de Tnl en el sitio de PKA en MVRA infectados por AdshMRP4. Las inmunoelctrotransferencias se cuantificaron y normalizaron en la expresión de calsecuestrina. **(B)** Las inmunoelctrotransferencias muestran un aumento en la fosforilación por PKA de RyR2 en Ser2808 y una disminución en la unión de calstabilina-2 al complejo de RyR2 (panel derecho) aunque sin cambio alguno en la fosforilación por CaMKII en Ser2814 (panel izquierdo) en MVRA infectados por AdshMRP4. La cantidad relativa de la fosforilación de RyR2 se determinó dividiendo las señales de fosforilación por la cantidad total de RyR2. **(C)** La atenuación génica de MRP4 aumenta la corriente de calcio en los miocitos cardíacos. La corriente de I_{CaL} se registró en los miocitos cardíacos atriales de ratas adultas infectados por Ad-shMRP4 o Ad-shLuc. La densidad de corriente había aumentado notablemente en los miocitos cardíacos infectados por Ad-shMRP4, indicando un aumento en la fosforilación de los canales de calcio. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Ejemplo

Resumen

Adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico (AMPc) es uno de los primeros mensajeros de línea que median el efecto fisiológico de los receptores acoplados a Gs. En el corazón, con la estimulación de los receptores β -adrenérgicos, AMP cíclico conduce a la activación de la proteína quinasa A (PKA) que fosforila varias proteínas clave implicadas en el acoplamiento de excitación-contracción, tal como canales de calcio de tipo L, fosfolamban, receptores de rianodina y troponina I. Esto se traduce en un aumento dependiente de PKA en la corriente de Ca^{2+} y en el manejo del calcio por el retículo sarcoplásmico y conduce a efectos inotrópicos y lusitrópicos positivos característicos. El AMP cíclico también se une directamente y activa los canales de HCN que codifican la corriente If, y por consiguiente, regula la automaticidad del corazón. En este caso, se muestra que MRP4, que está presente en la membrana de los miocitos cardíacos, regula la vía de señalización de AMPc en los miocitos cardíacos, que impacta en la estructura y función cardíaca global. En los miocitos cardíacos aislados de rata, el silenciamiento de MRP4 por un adenovirus que codifica un ARN de horquilla corta de MRP4 produjo un aumento de la fosforilación de la proteína quinasa A de proteínas diana. La ablación de MRP4 *in vivo* en ratones dio como resultado la hipertrofia cardíaca dependiente de la edad, así como la hipertrofia cardíaca exacerbada inducida por la estimulación crónica de beta-adrenérgicos, asociada aparentemente con un aumento de la actividad de PKA. Los efectos inotrópicos y cronotrópicos de la milrinona, un inhibidor de PDE3, aumentaron drásticamente en ratones deficientes en MRP4 en comparación con los genéticamente intactos, lo que sugiere un equilibrio entre PDEs y MRP4 para el control del nivel de AMPc en el miocito cardíaco. Estos hallazgos revelan el eflujo mediado por MRP4 como un nuevo mecanismo de regulación de la señalización de AMPc en los miocitos cardíacos.

Procedimientos experimentales

Modelos animales. Se generaron y genotiparon ratones con ablación de MRP4 (DG de MRP4) como se ha descrito (Leggas, M. *et al. Mol Cell Biol* 24, 7612-21 (2004). Los ratones genéticamente intactos y los ratones con DG de MRP4 homocigóticos (8-10 semanas de vida) se sometieron a una sobrecarga de presión del ventrículo izquierdo por constricción de la aorta transversal (CAT), como se ha descrito previamente (Rockman, *et al. Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 88, 8277-81 (1991). Cinco semanas después de haber realizado el procedimiento, los animales se sacrificaron y se determinaron los pesos del corazón y corporales. Como modelo para la sobreestimulación de β -adrenérgicos, se implantaron subcutáneamente bombas miniosmóticas (Alzet) que contenían (-)-isoproterenol-bitartrato (Sigma Aldrich) (administración de 20 $\mu\text{g/g/día}$ cada uno) en animales de 10-12 semanas de vida.

Se llevaron a cabo la determinación de los pesos del corazón y el análisis de la expresión génica después de 14 días de infusión continua. Por último, los ratones machos con DG de MRP4 y los miembros de la camada GI se sometieron a ejercicio voluntario. Los animales tenían 10-12 semanas al inicio del estudio. Los animales individuales se alojaron en una jaula con libre acceso a una rueda con un diámetro de 11,5 cm con una superficie de 5,0 cm de ancho equipada con un contador digital magnético (modelo BC 1200, Sigma Sport) que se activa por la rotación de la rueda. Los valores del ejercicio diario para el tiempo y la distancia recorrida se registraron para cada animal ejercitado a lo largo de la duración del periodo de ejercicio.

PCR cuantitativa en tiempo real.

Se preparó ARN total con los Kits RNeasy Mini (Invitrogen) y se transcribió de forma inversa 1 μg con un protocolo convencional. Se amplificó una décima parte del ADNc resultante mediante 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a T_m (60 °C para MRP4, MRP5 y RPL32) y 30 s a 72 °C, seguido de una etapa de amplificación final a 72 °C durante 10 min, utilizando 1 unidad de ADN polimerasa BIOTAQ (Bioline) y 200 pmol de cada uno de los siguientes cebadores:

- Sentido para MRP4: 5'- GGACACTGAACTAGCAGAATCT-3' (SEQ ID NO. 1)
 Antisentido para MRP4: 5'- GTCGCTGTCAATGATGGTGT-3' (SEQ ID NO. 2)
 Sentido para GAPDH: 5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTG-3' (SEQ ID NO. 3)
 Antisentido para GAPDH: 5'-CATTATCGGCCTTGACTGTG CATTATCGGCCTTGACTGTG-3' (SEQ ID NO. 4)
 5 Sentido para ANF: 5'-TTTCAAGAACCTGCTAGACCAC-3' (SEQ ID NO. 5)
 Antisentido para ANF: 5'-CCCTGCTCCTCAGTCTGCT-3' (SEQ ID NO. 6)
 Sentido para Beta-MHC: 5'-CAATGCAGAGTCGGTGAAGG-3' (SEQ ID NO. 10)
 Antisentido para Beta-MHC: 5'-GCCGCATTAAGTTCTTCTTGTCT-3' (SEQ ID NO. 11)
 Sentido para SERCA: 5'-TGACAATGGCACTTTCTGTTC-3' (SEQ ID NO. 12)
 10 Antisentido para SERCA: 5'-GCATCCTCAGCAAAGACTGG-3' (SEQ ID NO. 13)

Se utilizaron cebadores específicos de gen para amplificar ARNm mediante PCR en un aparato Mx4000 (Stratagene) utilizando la mezcla maestra Qiagen SYBR Green. Se controló la especificidad de cada conjunto de cebadores mediante el análisis de la curva de disociación. El volumen de la muestra fue de 25 µl, con 1X (concentración final) de mezcla maestra para PCR SYBR Green, 400 nM de cebadores específicos de gen, y 5 µl de molde.

Análisis de membrana de Western e inmunofluorescencia. Para la inmunofluorescencia, las proteínas se incubaron en primer lugar con anti-MRP4 (el anticuerpo se ha descrito en otra parte (van Aubel, *et al. J Am Soc Nephrol* 13, 595-603 (2002)), anti-MRP5 (Santa Cruz Biotechnology Inc.), o anti-alfa-actinina (Sigma-Aldrich) y se visualizaron mediante la aplicación de anticuerpos secundarios conjugados directamente con Alexa Fluor 546 o Alexa Fluor 488 (Invitrogen).

La extracción de proteínas se realizó en un tampón que contenía los inhibidores de proteasa y de fosfatasa (Sigma-Aldrich) y la inmunoelectrotransferencia se realizó como se ha descrito previamente. El Dr. Scheffer facilitó amablemente el anticuerpo anti-MRP4 (M41-80) (Amsterdam, Países Bajos). Los otros anticuerpos eran anticalsecuestrina (ABR), anti-troponina (señalización celular), anti-fosfo troponina I (señalización celular). Para medir la fosforilación de los receptores de rianodina, se utilizó el siguiente protocolo. Los corazones de ratón se lisaron isotónicamente en 2,0 ml de un tampón que contenía 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 20 mM de NaF, 1,0 mM de Na₃VO₄, y los inhibidores de proteasa y fosfatasa (Roche). Un anticuerpo anti-RyR (4 µg de AM 5029) se utilizó para inmunoprecipitar RyR2 a partir de 500 µg de homogeneizado de corazón. Estas muestras se incubaron con un anticuerpo en 0,5 ml de un tampón RIPA modificado (50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, NaCl al 0,9 %, 5,0 mM de NaF, 1,0 mM de Na₃VO₄, Triton-X100 al 1 %, y los inhibidores de la proteasa) durante 1 h a 4 °C. Los complejos inmunes se incubaron con microesferas de proteína A sefarosa (Sigma, St. Louis, MS) a 4 °C durante 1 h y las microesferas se lavaron tres veces con un tampón. Las proteínas se separaron con geles de SDS-PAGE al 6 % (para RyR) o PAGE al 15 % (para calstabin) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 1 h a 200 mA (membrana de transferencia semiseca, Bio-Rad). Las inmunoelectrotransferencias se desarrollaron utilizando anticuerpos contra RyR2 total (Affinity Bioreagents, dilución 1:2.000), RyR fosforilado por PKA (P2808, 1:5.000) RyR fosforilado por CaMKII (P2814, 1:5.000), o calstabin (1:2.500). Todas las inmunoelectrotransferencias se desarrollaron utilizando el sistema de imágenes por infrarrojos Odyssey (LICOR Biosystems, Lincoln, NE) y anticuerpos secundarios marcados por infrarrojos.

Cultivo de miocitos cardíacos ventriculares de adultas. Los miocitos ventriculares de rata adulta se aislaron como se ha descrito previamente (Henaff, *et al. Faseb J* 16, 99-101 (2002)). Se aislaron miocitos atriales de ratas adultas como se ha descrito previamente (Abi-Char *et al. J Physiol* 582, 1205-1217 (2007)).

Mediciones de la corriente de calcio y análisis de los datos. La configuración de la célula completa de la técnica de fijación de voltaje (amplificador, Axoclamp 200A, Axon Instruments) se utilizó para registrar I_{Ca}. Las pipetas de vidrio de borosilicato (resistencia en la punta: 1 a 2 M [OMEGA]) se llenaron con una solución que contenía (en mmol/l) 130 de CsCl, 2 de MgCl₂, 10 de HEPES, 15 de EGTA, 10 de glucosa, y 3 de MgATP (el pH se ajustó a 7,2 con CsOH). Los miocitos infectados por Ad-shMRP4 o Ad-shLuc durante 3 días estuvieron inmersos en una solución que contenía (en mmol/l) 136,9 de NaCl, 5,4 de KCl, 2 de CaCl₂, 10 de glucosa, 1,06 de MgCl₂, y 10 de HEPES (el pH se ajustó a 7,4 con NaOH). Para el registro de la corriente, NaCl se reemplazó con una cantidad equivalente de cloruro de tetraetilamonio y KCl se omitió de la solución. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22 °C a 24 °C). Los impulsos de tensión despolarizantes se suministraron a 0,2 Hz. La amplitud de I_{Ca} se calculó como la diferencia entre el pico de corriente de entrada y la corriente medida al final del impulso del ensayo, y su densidad se obtuvo dividiendo la amplitud I_{Ca} por la capacitancia de la membrana. Para la medición de la inactivación de la corriente el calcio, los impulsos del ensayo para I_{Ca} fueron precedidos por impulsos de acondicionamiento de 2 segundos. Los gráficos de activación se generaron dividiendo el pico I_{Ca} medido en un potencial dado por la diferencia entre el potencial medido e inverso. Los datos sobre las curvas de activación e inactivación de conductancia/tensión se ajustaron mejor con una ecuación de distribución de Boltzmann: $G/G_{max} = 1/[1+\exp((V_{1/2}-V) k)]$ y $I/I_{max} = 1/[1+\exp((V_{1/2}-V) k)]$, respectivamente, en el que G representa la conductancia calculada en el potencial de membrana V, I la amplitud de I_{Ca} en el potencial de acondicionamiento V, V_{1/2} el potencial en el que la mitad de los canales se activan o inactivan, y k el factor de pendiente.

Medición de Ca²⁺ intracelular y chispas de Ca²⁺. Los miocitos ventriculares cardíacos se disociaron

enzimáticamente utilizando procedimientos convencionales (Fauconnier, J. *et al. Diabetes*, 2007). En pocas palabras, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, el corazón se extirpó con rapidez y se perfundió de forma retrógrada a 37 °C durante 6-8 min con una solución de tyrode modificada (en mM: 113 de NaCl, 4,7 de KCL, 0,6 de KH₂PO₄, 0,6 de Na₂HPO₄, 1,2 de MgSO₄, 12 de NaHCO₃, 10 de KHCO₃, 10 de HEPES, 30 de taurina, pH = 7,4) que contenía 1 mg/1 ml de liberasa (Roche, Francia). Los miocitos aislados se transfirieron entonces a la misma solución, exenta de enzimas, que contenía 1 mM de CaCl₂.

Las células se cargaron durante 30 min a TA con Fluo-4 AM (5 μmol/l, Molecular Probes). Las células se estimularon en un campo a 1 Hz con un impulso de corriente de 1-2 ms suministrado a través de dos electrodos de platino, uno a cada lado de la cámara de perfusión. Los cambios en la fluorescencia de Fluo-4 se registraron utilizando un microscopio confocal LSM510 Meta Zeiss equipado con un objetivo de inmersión en agua 63X (NA: 1,2). Las mediciones se realizaron en un modo de exploración de líneas (1,5 ms/línea) y la exploración se llevó a cabo a lo largo del eje longitudinal de la célula. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm, y la luz emitida se recogió a través de un filtro de paso largo de 505 nm. La intensidad de láser utilizada (3-6 % del máximo) no tuvo ningún efecto perjudicial apreciable en la señal de fluorescencia o en la función celular durante el transcurso temporal del experimento. Para permitir las comparaciones entre las células, el cambio en la fluorescencia (ΔF) se dividió por la fluorescencia detectada inmediatamente antes del impulso de estimulación de 0,5 Hz (F₀). El contenido en Ca²⁺ del RS se evaluó midiendo la amplitud de los transitorios de Ca²⁺ citosólico inducidos por la rápida aplicación de cafeína (10 mM). Se registraron chispas de Ca²⁺ espontáneas en células quiescentes después de 5 min de estimulaciones con el fin de alcanzar el estado estacionario del contenido en Ca²⁺ del SR. El tamaño celular se estimó en el plano focal en el que se detectó la superficie más grande.

Estudios de telemetría. Las mediciones por ECG ambulatorio telemétrico a largo plazo se realizaron en ratones macho genéticamente intactos y con desactivación génica a los 3 meses de vida. Se realizó una monitorización de ECG restringido de seis derivaciones de animales conscientes (hámsters y ratones) con el sistema de herramientas EasyCG® (EMKA technologies, Francia) formado por los cuatro sensores de la plataforma del sistema ecgTUNNEL® y un túnel medio para el ajuste del tamaño del animal translúcido. Cada animal se colocó en el interior del túnel, que después se cerró, asegurando que el animal esté adecuadamente restringido. Los cuatro cables de la plataforma se conectaron a un transmisor y a un amplificador de sistema inalámbricos (emkaPACK®, EMKA technologies). Se obtuvo un trazado de ECG telemétrico en ratones conscientes durante el tiempo de relajación despiertos y durante el día. Para minimizar los efectos del estrés, a los animales se les permitió permanecer en el sistema de retención durante 5 minutos antes de iniciar los registros de ECG. De hecho, la observación directa de los animales y los trazados del ECG demostraron que estaban tranquilos y que la frecuencia cardíaca se mantuvo estable. Se registraron seis derivaciones de ECG durante 15 a 20 minutos utilizando un software específico (iox®, EMKA technologies): se midieron tres derivaciones (L1, L2, L3), y se calcularon tres (aVR, aVL, aVF). El software especializado (ECG-auto®, EMKA technologies) se utilizó para medir el intervalo RR, y el índice SDNN y HRV. Si es necesario, los datos en bruto se sometieron a un filtro de corte de 50 Hz con una configuración automática determinada por el software.

40 Estadísticas

Todos los datos cuantitativos se expresan como medias \pm EEM. El análisis estadístico se realizó con el paquete de software Prism (GraphPad versión 3). Se utilizó ANOVA de una vía para comparar cada parámetro. Se realizaron comparaciones con ensayos de *t post-hoc* para identificar qué diferencias entre los grupos representaron los resultados de ANOVA global significativo.

RESULTADOS

50 MRP4 se expresa en la membrana de los miocitos cardíacos.

El análisis de inmunofluorescencia de tejidos del corazón reveló la presencia de MRP4 en la membrana de los miocitos atriales y ventriculares en seres humanos y ratas. Se confirmó la expresión de la proteína MRP4, que se restringió a la fracción de la membrana enriquecida en caveolina, en los extractos de proteínas cardíacas separados en un gradiente discontinuo de sacarosa al 5 % a 40 %. MRP5 también se detectó en el corazón, pero su expresión se restringió a la capa íntima de los vasos sin expresión clara en los miocitos cardíacos. Para determinar si MRP4 regula la homeostasis de AMPc en los miocitos cardíacos, los niveles intracelulares y extracelulares de AMPc se midieron en los miocitos cardíacos tratados con forskolina y se infectaron durante 3 días por un adenovirus que codifica un ARNhc de MRP4, dando como resultado una interferencia génica eficiente de MRP4, o una luciferasa codificante de ARNhc (shLuc) como control negativo. La forskolina (10 μM, 1 hora) aumentó los niveles intracelulares y extracelulares de AMPc en células tratadas con shLuc. El silenciamiento de MRP4 dio lugar a un gran aumento en el nivel intracelular de AMPc inducido por forskolina y evitó que el aumento en el nivel extracelular de AMPc indicara una falta de extrusión del nucleótido cíclico después del silenciamiento de MRP4.

65 El silenciamiento de MRP4 aumentó la fosforilación dependiente de AMPc *in vitro*

Para estudiar el papel fisiológico de MRP4, se examinó la consecuencia de su silenciamiento sobre la fosforilación

de varias proteínas que son dianas de PKA en los miocitos cardíacos. El silenciamiento de MRP4 dio como resultado la hiperfosforilación de la troponina I en su sitio de fosforilación por PKA Ser23/24. Del mismo modo, el análisis de la fosforilación de RyR2 reveló una hiperfosforilación dependiente de PKA de Ser2808 en miocitos cardíacos tratados con shMRP4 y esta fosforilación se asoció con la depleción de la proteína calstabin-2 que estabiliza RyR2 (FKBP12.6). En cambio, el silenciamiento de MRP4 no tuvo efecto alguno sobre el nivel de RyR2 fosforilado por CaMKII, lo que indica un aumento específico de la actividad de PKA. También se registró la corriente de calcio de tipo L, I_{CaL} , una diana bien conocida de PKA, en miocitos cardíacos atriales de rata. En miocitos transducidos con Ad shMRP4, la densidad de corriente I_{CaL} se ha potenciado notablemente en comparación con los miocitos infectados por shLuc (a +10 mV: I_{CaL} en miocitos infectados por shMRP4 era $-12,6 \pm 0,7$ n = 19; frente a $-7,6 \pm 0,8$ pA/pF n = 21 en células infectadas por shLuc, P <0,001). Se produjo un cambio hacia el potencial más negativo de la activación de corriente en miocitos por shMRP4 que se observaron tras la fosforilación dependiente de AMPc de la corriente de calcio. Tomados en conjunto, estos resultados indican que la inhibición de MRP4 potenció los procesos de fosforilación dependiente de AMPc en los miocitos cardíacos.

15 **PDE compensa la delección de MRP4 en ratones**

A continuación se midieron los parámetros cardíacos que reflejarían un aumento en el tono catecolaminérgico en MRP4 de ratones con desactivación génica. A los 3 meses de vida, no se observaron diferencias entre los ratones GI y con DG de MRP4 en el acortamiento fraccional ($36 \pm 1,97$ en GI frente a $37 \pm 2,25$ en DG de MRP4, p = NS) y en la frecuencia cardíaca en condiciones basales (*RR* (ms): $108 \pm 4,9$ en GI frente a 101 ± 3 en DG de MRP4, p = NS). En el examen ecocardiográfico, la función sistólica se analizó mediante la medición de la fracción de eyección y el flujo sanguíneo aórtico no fue diferente entre los dos grupos.

Para explicar la falta de cambio en la función cardíaca en el corazón de ratones con DG de MRP4, se puso a prueba la hipótesis de que la activación de PDEs podría haber compensado la pérdida del transportador. En primer lugar, los niveles de ARNm de diferentes PDE se cuantificaron en ratones GI y con DG de MRP4 de 3 meses de vida. Los niveles de ARNm de PDE3A y PDE4A aumentaron significativamente en el miocardio de ratones con DG de MRP4 en comparación con los ratones GI. También se estudió el efecto cronotrópico del inhibidor de PDE3, milrinona, en ratones con DG de MRP4 en comparación con los ratones genéticamente intactos. La dosis en el efecto cronotrópico de milrinona se potenció drásticamente en los ratones con DG de MRP4. La disminución en el intervalo RR después de la dosis convencional de 1 mg/kg de milrinona fue significativamente mayor en los ratones con DG de MRP4 en comparación con los ratones genéticamente intactos. Además, mientras que no se cambie la frecuencia cardíaca en los ratones genéticamente intactos, la administración de la dosis pequeña de 0,1 mg/kg de milrinona a ratones con DG de MRP4 produjo una disminución significativa en el intervalo RR. Una aceleración similar de la frecuencia cardíaca se observó con una dosis mucho más alta (1 mg/kg) de milrinona en ratones genéticamente intactos. Además, se midió el efecto de la inhibición de PDE3 por cilostamida sobre la contractilidad de los miocitos ventriculares aislados de ratones GI y con DG de MRP4. La cilostamida aumentó la contractilidad de los miocitos ventriculares de GI y con DG de MRP4, pero fue aún más significativa en los ratones con DG de MRP4. También se midió el transitorio de Ca^{2+} en condiciones basales y después de la inhibición de PDE3 por cilostamida en ratones GI y con DG de MRP4. La cilostamida aumentó la amplitud ($\Delta F/F_0$), disminuyó la tasa de aumento ($\Delta F/F_0 \cdot ms^{-1}$), la mitad de la anchura y la tasa de decrecimiento τ del transitorio de Ca^{2+} en los miocitos ventriculares aislados de ratones con DG de MRP4. La cilostamida no tuvo ningún efecto sobre el transitorio de Ca^{2+} en los miocitos aislados del corazón de GI. Esto resulta consistente con una activación de PDE en ratones con DG de MRP4 de 3 meses de edad que compensa la ablación de MRP4. La cilostamida al inhibir PDE3 desenmascara el aumento del nivel de AMPc y sus consecuencias.

La ablación de MRP4 se asocia con la hipertrofia cardíaca progresiva.

A los 3 meses de vida, la morfología cardíaca parecía ser normal. No hubo un aumento en la relación PC/LT (FIG. 1A) en la histología global del corazón (FIG. 1B) en el tamaño de los miocitos ventriculares aislados (FIG. 1C) y en los parámetros ecocardiográficos (FIG. 1D).

Como se observa en otros modelos de desregulación de AMPc crónica, la hipertrofia cardíaca se desarrolla con la edad en ratones con DG de MRP4. Los síntomas progresivos de la hipertrofia cardíaca se volvieron significativos a los 9 meses de vida en ratones con DG de MRP4 en comparación con sus controles de edad idéntica: El peso del corazón, así como la relación PC/LT (FIG. 1A), el tamaño de los miocitos ventriculares aislados (FIG. 1C), el grosor LVPM y el grosor IVS (FIG. 1D) fueron significativamente mayores en ratones con DG de MRP4 de 9 meses de vida que en los ratones GI de la misma edad.

Para investigar más la consecuencia de la pérdida de la función de MRP4 en el crecimiento del miocardio e hipertrofia, se estudió la respuesta a los efectos estimulantes de un aumento en el nivel de AMPc, se ensayó el efecto de la estimulación crónica de β -adrenérgicos utilizando bombas miniosmóticas que administran isoproterenol (20 $\mu g/g/día$) durante 2 semanas en ratones con DG de MRP4 y GI de 3 meses de vida. La hipertrofia cardíaca inducida por isoproterenol fue significativamente más importante en ratones con DG de MRP4 según la evaluación de una relación significativamente mayor de PC/LT. Estos resultados indican que la ausencia de MRP4 desempeña un papel en la vía de señalización de Gs dependiente de PKA mal adaptada. Se obtuvieron resultados similares en

otro modelo de hipertrofia inducida por bandeado de la aorta torácica (no mostrados).

Estos resultados sugieren que, con el tiempo o cuando el sistema β -adrenérgico se sobreestime, la pérdida de la función de MRP4 no se compensa más, y que los transportadores se acoplan a las vías de señalización que controlan el crecimiento del miocardio.

MRP4 participa en la regulación del ciclo de Ca^{2+} del RS y en la regulación de la contractilidad cardíaca.

Curiosamente, el acortamiento fraccional fue mayor en ratones con DG de MRP4 de 9 meses de vida en comparación con GI de edad idéntica, lo que indica un aumento en la contractilidad. Además, el acortamiento de los miocitos ventriculares aislados de ratones con DG de MRP4 de 9 meses de vida fue mayor que el acortamiento de los miocitos en los ratones GI de 9 meses de vida.

Por consiguiente, se revisó el ciclo de Ca^{2+} del RS en los miocitos ventriculares aislados de ratones GI y con DG de MRP4 de 3 y 9 meses de vida. En los animales de 3 meses de vida, en condiciones basales, no hubo diferencia alguna en la cinética del transitorio de Ca^{2+} entre los ratones GI y los ratones con DG de MRP4. En esa etapa, no hubo diferencia alguna en la frecuencia de chispas y la cinética (datos no mostrados). No obstante, en los animales de 9 meses de vida, a pesar de no producirse ningún cambio en la carga del RS y en la amplitud ($\Delta F/F_0$) del transitorio de Ca^{2+} , el índice del incremento ($\Delta F/F_0 \cdot \text{ms}^{-1}$) y la tasa de decrecimiento τ del transitorio se aceleraron en los ratones con DG de MRP4 en lugar de los ratones GI. Además, la frecuencia de las chispas y su distribución espacial (anchura a media altura) aumentaron notablemente mientras su amplitud $\Delta F/F$ se redujo, sin diferencia en su cinética. Curiosamente, RyR2 era PKA hiperfosforilada en su Ser2808 y esto se asoció con una depleción de la proteína estabilizante RyR2 calstabilina 2 (FKBP12.6). No se observó diferencia alguna en la fosforilación de Ser 2814.

Estos resultados sugieren que MRP4 podría participar en la regulación de β -adrenérgicos del ciclo de Ca^{2+} del RS en el corazón.

CONCLUSIÓN

Nuestro estudio demuestra, por vez primera, hasta donde se sabe, que el nivel de AMPc en las células cardíacas puede regularse por extrusión a través de la proteína de resistencia a múltiples fármacos, MRP4. Este nuevo mecanismo que regula la homeostasis de AMPc está acoplado a varias vías de señalización mediada por AMPc implicado tanto en la fisiología como en el crecimiento del miocito cardíaco.

MRP5 se detectó previamente en el corazón humano y su expresión se aumentó en la miocardiopatía isquémica y dilatada. En este caso, se demuestra que MRP4 se expresa principalmente en la membrana de los miocitos cardíacos mientras que MRP5 está presente en extractos totales de corazón, pero principalmente en la capa endotelial de los vasos coronarios de conformidad con nuestros resultados previos.

Se demostró además que MRP4 es un elemento de un sistema muy interdependiente para controlar la señalización de AMPc. La contractilidad cardíaca, la frecuencia cardíaca se conservan en ratones jóvenes con ablación de MRP4. Los datos del ciclo de Ca^{2+} de RS, tanto de las características de los transitorios como de las chispas son normales y las dianas dependientes de AMPc/PKA, tales como RyR2 y TNI, no están hiperfosforilados, lo que indica un mecanismo de compensación. Nuestra observación de que los efectos cronotrópicos e inotrópicos positivos de los inhibidores de PDE3, milrinona y cilostamida, se incrementan en gran medida en ratones con ablación de MRP4, en comparación con los ratones genéticamente intactos, apoyan el concepto de un equilibrio entre PDEs y MRP4 para el control de los niveles de AMPc en los cardiomiocitos. También se proporciona una evidencia de que las contribuciones respectivas de PDE o MRP en el control de la homeostasis de AMPc deben ser dependientes de la actividad del elemento homólogo en la cascada. En nuestros experimentos *in vitro*, el silenciamiento de MRP4 condujo a la hiper-fosforilación de proteínas diana PKA que no se observó en ratones jóvenes con DG de MRP4. En el experimento *in vitro*, se obtuvo con rapidez el silenciamiento de MRP4 (es decir, aproximadamente 48 horas), que podría haber sido un retraso demasiado breve como para permitir un ajuste eficaz en la actividad/expresión de PDEs. Esto debe explicar el importante efecto de la inhibición de MRP4 en este modelo. Por otra parte, la relativa escasez en el fenotipo cardíaco de los ratones jóvenes con DG de MRP4 y el aumento del efecto de los inhibidores de PDE3 en estos ratones indican que la actividad de PDE3 se ha potenciado para contrarrestar la activación de las vías de señalización de nucleótidos cíclicos debido a la deficiencia de MRP4. Esto concuerda con un mecanismo de retroalimentación adaptable que limita el efecto perjudicial de la pérdida de extrusión de AMPc a través del transportador. Por consiguiente, el impacto de la ablación de MRP4, podría haberse visto obstaculizado por la hiperactivación de PDE en ratones jóvenes con DG de MRP4 en condiciones basales. Esta observación es otro indicio de que MRP4 es un mecanismo fisiológico constitutivo, de modo que su supresión ha de compensarse. Debe mencionarse que la extrusión de nucleótidos cíclicos por MRPs es un mecanismo dependiente de energía, mientras que la degradación por PDEs requiere energía. Esto es favorable para una activación de MRPs en condiciones de estrés, tales como durante el estrés adrenérgico y es apoyado por un mayor efecto trófico de isoproterenol en ratones con delección de MRP4 en comparación con los ratones de control.

Con el envejecimiento o bajo estrés patológico, tal como estimulación cardíaca crónica a catecolamina alta, el mecanismo de compensación de la supresión de MRP4 podría verse sobrepasado traduciéndose en el aumento de la fosforilación dependiente de AMPc de miocito cardíaco y en el desarrollo de la hipertrofia. Esto se indica por la hipertrofia cardíaca progresiva, así como un aumento de la pérdida de Ca^{2+} de RS asociada con un aumento de la fosforilación de RyR2 en Ser2808 en ratones con DG de MRP4 mayores. Además, la ablación de MRP4 en ratones dio lugar a una exacerbación de los efectos de la estimulación crónica de β -adrenérgicos que se observó en ratones jóvenes, lo que sugiere que se alcanza un límite en la compensación de PDE3 a la estimulación. Es de destacar, que el fenotipo de los ratones con DG de PDE4D3 se asemeja al fenotipo de los ratones con DG de MRP4. Ambos desarrollan un proceso hipertrófico dependiente de la edad con la hiperfosforilación de RyR2.

Sorprendentemente, a pesar de la hipertrofia cardíaca, se aumentó la función contráctil de los ratones de edad avanzada con delección de MRP4. Tanto el acortamiento fraccional, medido por ecocardiografía, y el acortamiento celular, medido en miocitos ventriculares aislados, fueron mayores para los ratones con DG de MRP4 que para los Gl. La contractilidad potenciada de los miocitos cardíacos aislados a partir de ratones deficientes de MRP4 excluyó un efecto sobre el lecho vascular.

Está perfectamente establecido que los efectores intracelulares de nucleótidos cíclicos se compartimentan en complejos macromoleculares, y MRP4 es un socio adicional de estos complejos. Al igual que en las células del músculo liso, se descubrió que MRP4 se localiza en fracciones de membrana enriquecida en caveolina. Las caveolas/plataformas lipídicas son microdominios de membrana especializados en los que los complejos multimoleculares de las moléculas de señalización se compartimentan mediante la interacción con la caveolina-1. La secuencia de la proteína C-terminal de MRP4 contiene un motivo de unión consenso al dominio PDZ, lo que sugiere que MRP4 podría interactuar estrechamente con otros socios de complejos de señalización de membrana. De hecho, en las células epiteliales intestinales, MRP4 se asocia con el canal Cl del RTFQ. Esto indica que MRP4 puede actuar en dominios subcelulares específicos y, por lo tanto, modular una etapa de activación inicial de la transducción de señales mediada por nucleótidos cíclicos. Nuestros resultados también sugieren que MRP4 puede interactuar con otros socios de la cascada de señalización de β -adrenérgicos o sin embargo cuyos canales aún no se han analizado. Curiosamente, se ha expuesto que la integridad de las caveolas/plataformas lipídicas es necesaria para el acoplamiento normal entre β 1-AR y los canales de calcio. Los ratones que sobreexpresan β 1-AR específicos cardíacos desarrollan hipertrofia cardíaca y la insuficiencia cardíaca indica que al menos en esta condición, MRP4 y PDEs no son lo suficientemente activos como para compensar el aumento del nivel de AMPc. No obstante, se ha demostrado que la estimulación crónica del sistema β adrenérgico conduce a efectos deletéreos más importantes en ratones con delección de MRP4, lo que sugiere que, en condiciones normales, MRP4 desempeña un papel en el mantenimiento de la función cardíaca.

Nuestros datos proporcionan evidencia de que MRP4 y PDE son importantes en el mantenimiento del nivel de AMPc y MRP4 es un nuevo elemento a tener en cuenta al analizar la homeostasis de AMPc cardíaco.

Estos resultados indican que MRP4 regula las vías de señalización de nucleótidos cíclicos en los cardiomiocitos. La inhibición de MRP4 potencia la respuesta de los cardiomiocitos a AMPc. Esto comprende la actividad electrofisiológica y también el crecimiento de los cardiomiocitos. La inhibición de MRP4 puede potenciar de este modo el efecto favorable a corto plazo de AMPc en los cardiomiocitos, concretamente, las respuestas cronotrópicas e inotrópicas. Dicho efecto tendrá consecuencias terapéuticas en la insuficiencia cardíaca y en el choque cardiogénico. Por otra parte, la activación a largo plazo de MRP4 puede luchar contra el efecto pro-hipertrófico crónico de AMPc. Esto permitirá el tratamiento y la prevención de la hipertrofia cardíaca patológica.

Referencias

A lo largo de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención. Las divulgaciones de estas referencias se incorporan por la presente por referencia en la presente divulgación.

Assender JW, Southgate KM, Hallett MB, Newby AC. *Inhibition of proliferation, but not of Ca^{2+} mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells.* *Biochem J.* 1 de diciembre de 1992; 288 (Pt 2):527-32.

Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM. *Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms.* *Nature.* 21 de marzo de 2002; 416(6878):337-9.

Boerth NJ, Dey NB, Cornwell TL, Lincoln TM. *Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates vascular smooth muscle cell phenotype.* *J Vasc Res.* Julio-agosto de 1997; 34(4):245-59.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells.* *Science.* 19 de abril de 2002; 296(5567):550-3.

Chen ZS, Lee K, Kruh GD. *Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug*

- resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem.* 7 de septiembre de 2001; 276(36):33747-54. Epub 10 de julio de 2001.
- Choi VW, Samulski RJ, McCarty DM. Effects of adeno- associated virus DNA hairpin structure on recombination. *J Virol.* Junio de 2005; 79(11):6801-7.
- 5 Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R. (1996) Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 380, 548-50.
- Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 1985, págs. (77-96).
- 10 Cote RJ, Morrissey DM, Houghton AN, Beattie EJ Jr, Oettgen HF, Old LJ. Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* Abril de 1983; 80(7):2026-30.
- Desgranges P, Caruelle JP, Carpentier G, Barritault D, Tardieu M. Beneficial use of fibroblast growth factor 2 and RGTA, a new family of heparan mimics, for endothelialization of PET prostheses. *J Biomed Mater Res.* 2001; 58(1):1-9.
- 15 Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* Noviembre de 2002; B(11):1249-56.
- 20 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 24 de mayo de 2001; 411 (6836):494-8.
- Hannon GJ. RNA interference. *Nature.* 11 de julio de 2002; 418(6894):244-51.
- 25 Jayasena S.D. (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem.* 45(9):1628-50.
- Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem.* 29 de septiembre de 2000; 275(39):30069-74.
- 30 Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 7 de agosto de 1975; 256(5517):495-7.
- 35 Kriegler, A *Laboratory Manual*," W.H. Freeman C.O., Nueva York, 1990.
- McDonald LJ, Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc Soc Exp Biol Med.* Enero de 1996; 211(1):1-6.
- 40 McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet.* Octubre de 2002; 3(10):737-47.
- Maglich JM, Parks DJ, Moore LB, Collins JL, Goodwin B, Billin AN, Stoltz CA, Kliewer SA, Lambert MH, Willson TM, Moore JT. Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes *J Biol Chem.* 9 de mayo de 2003; 278(19):17277-83.
- 45 Mitani A, Nakahara T, Sakamoto K, Ishii K. Expression of multidrug resistance protein 4 and 5 in the porcine coronary and pulmonary arteries. *Eur J Pharmacol.* 11 de abril de 2003; 466(1-2):223-4.
- 50 Murry, "Methods in Molecular Biology," vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991.
- Novak K. Cardiovascular disease increasing in developing countries. *Nat Med.* Septiembre de 1998; 4(9):989-90.
- 55 Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res.* 22 de agosto de 2003; 93(4):280-91. Revisión.
- Silberbach M, Gorenc T, Hershberger RE, Stork PJ, Steyger PS, Roberts CT Jr. Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for the anti-hypertrophic effect of atrial natriuretic factor in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem.* 27 de agosto de 1999; 274(35):24858-64.
- 60 Sinnaeve P, Chiche JD, Gillijns H, Van Pelt N, Wirthlin D, Van De Werf F, Collen D, Bloch KD, Janssens S. Overexpression of a constitutively active protein kinase G mutant reduces neointima formation and in-stent restenosis. *Circulation.* 18 de junio de 2002; 105(24):2911-6.
- 65 Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996; 36:461-80.

Tuerk C. y Gold L. (1990) *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. *Science*. 3; 249(4968):505-10.

5 Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. *Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro*. *Genes Dev*. 15 de diciembre de 1999; 13(24):3191-7.

Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. *Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy*. *Mol Ther*. Septiembre de 2006; 14(3):316-27. Epub 7 de julio de 2006.

Listado de secuencias

10 <110> INSERM

<120> INHIBIDORES DE MRP4 Y AGENTES QUE ESTIMULAN LA ACTIVIDAD DE MRP4 PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS CARDÍACOS

15 <130> BI007125

<160> 13

20 <170> Patente en versión 3.3

<210> 1
<211> 22
<212> ADN
25 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

30 <400> 1
ggacactgaa ctgcagaat ct 22

<210> 2
<211> 21
35 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

40 <400> 2
gtcgtgtca atgatggtg t 21

<210> 3
45 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
50 <223> cebador

<400> 3
tggcaaagtg gagattgtg 20

55 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> cebador

<400> 4
65 cattatcggc cttgactgtg 20

<210> 5

ES 2 613 804 T3

5	<211> 22 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
	<400> 5 ttcaagaac ctgctagacc ac	22
10	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador	
	<400> 6 ccctgctcc tcagctgct	20
20	<210> 7 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> ARNip	
30	<400> 7 caguguucuu acacuucut t	21
35	<210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip	
40	<400> 8 aggaagugua agaacacugt t	21
45	<210> 9 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNhc	
50	<400> 9 gcaaagtgg atccgagaa	19
55	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> cebador	
	<400> 10 caatgcagag tcggtgaagg	20
65	<210> 11 <211> 23	

ES 2 613 804 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 11
gccgattaa gttctcttg tct 23

10 <210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador

20 <400> 12
tgacaatggc acttctgtt c 21

25 <210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 13
gcatcctcag caaagactgg 20

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de MRP4 para su uso en la estimulación de la contractilidad cardíaca *in vivo*.
- 5 2. Un inhibidor de MRP4 para su uso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda.
3. Uso de un inhibidor de MRP4 para favorecer el crecimiento de cardiomiocitos *in vitro*.
4. Un método de cultivo de cardiomiocitos, en el que los cardiomiocitos se cultivan en presencia de un inhibidor de MRP4 seleccionado entre el grupo que consiste en N-acetil-dinitrofenil-cisteína, benzbromarona, colato, 3-glucurónido de deshidroepiandrosterona, dinitrofenil-5-glutatión, 17-[beta]-glucurónido de estradiol, 3,17-disulfato de estradiol, 3-glucurónido de estradiol, 3-sulfato de estrona, flurbiprofeno, folato, N5-formil-tetrahidrofolato, glicocolato, sulfato del ácido glicolitocólico, indoprofeno, ketoprofeno, sulfato del ácido litocólico, [alfa]-naftil-[beta]-D-glucurónido, probenecida, PSC833, sulfipirazona, tauroquenodesoxicolato, taurocolato, taurodesoxicolato, topotecán y trequinsina, opcionalmente en forma de racematos, enantiómeros, diastereómeros y opcionalmente sales de adición de ácido farmacológicamente aceptables e hidratos de los mismos.
- 10
- 15
5. Un inhibidor de MRP4 para su uso según la reivindicación 1 o 2, o su uso según la reivindicación 3, en el que el inhibidor de MRP4 se elige entre moléculas pequeñas orgánicas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos bloqueadores parciales o completos de MRP4, aptámeros, e inhibidores selectivos de la expresión de MRP4.
- 20
6. Un inhibidor de MRP4 para su uso según la reivindicación 1, 2 o 5, o su uso según la reivindicación 3 o 5, en el que el inhibidor de MRP4 no se selecciona entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona sulfatada, metotrexato, verapamilo, ibuprofeno, diclofenaco, dipiridamol y dilazep.
- 25
7. Un vector genético que expresa MRP4 para su uso en el tratamiento de la hipertrofia cardíaca.
8. Un vector genético que expresa MRP4 para su uso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica.
- 30 9. Un vector genético que expresa MRP4 para su uso según la reivindicación 7 u 8, en el que dicho agente se elige entre plásmidos y vectores virales que expresan MRP4.

Figura 1

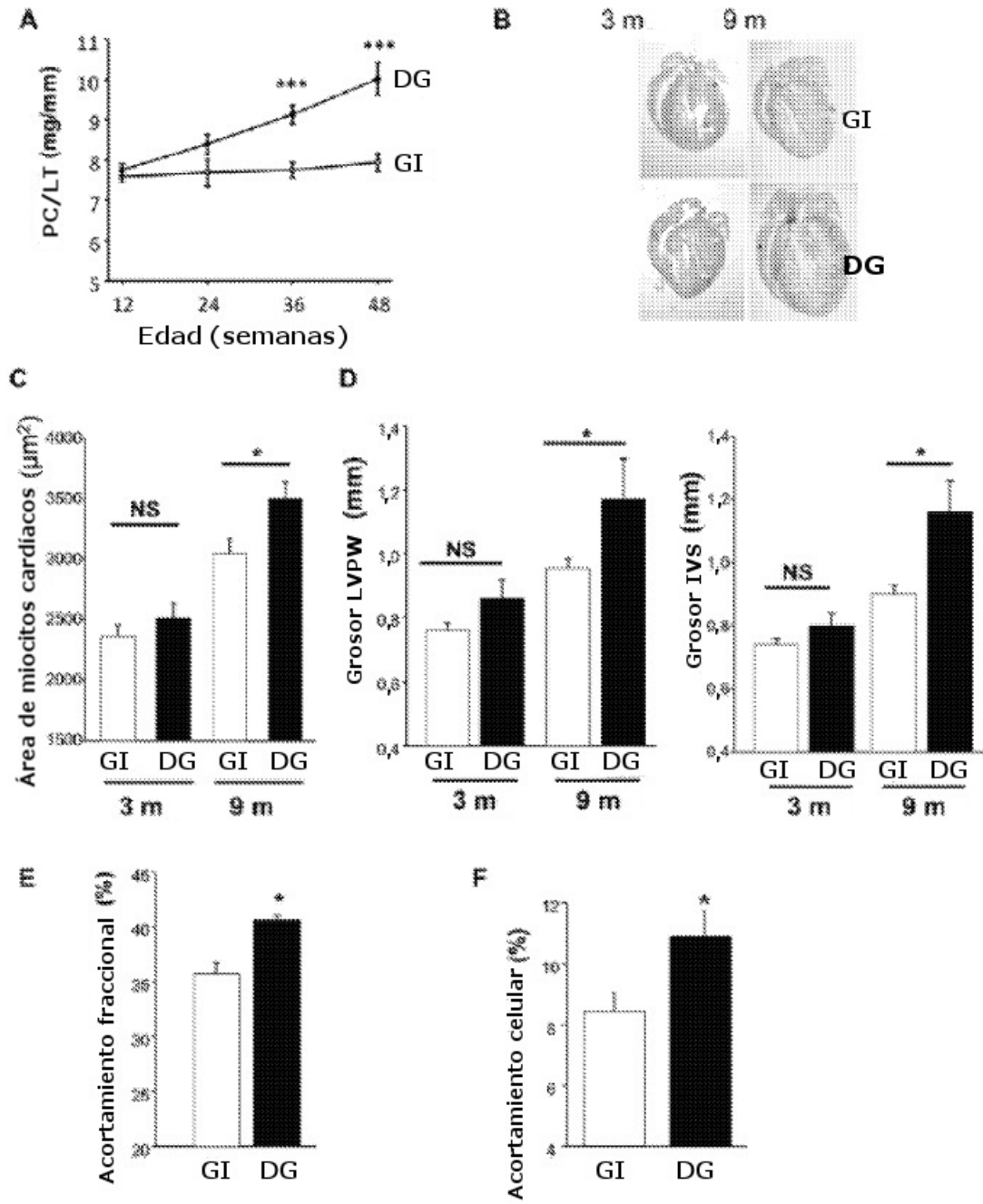


Figura 2

