



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 273 599**

(21) Número de solicitud: 200502545

(51) Int. Cl.:

A61K 31/522 (2006.01)

A61K 31/498 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

A61K 31/42 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación: **14.10.2005**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2007**

Fecha de la concesión: **14.03.2008**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **01.06.2008**

(54) Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

(73) Titular/es: **Universidad de Barcelona**
Centro de Patentes de la UB
Baldíri Reixac, 4
08028 Barcelona, ES

(72) Inventor/es: **Franco Fernández, Rafael;**
Ciruela Alférez, Francisco;
Lluís Biset, Carmen;
Müller, Christa;
Cinca Cuscullo, Joan y
Hove-Madsen, Leif

(74) Agente: **Segura Cámara, Pascual**

(57) Título: **Compuestos para el tratamiento de la fibrilación auricular.**

(57) Resumen:

Compuestos para el tratamiento de la fibrilación auricular. Los antagonistas del receptor de adenosina A_{2A} son útiles para la preparación de medicamentos contra la fibrilación auricular en mamíferos, incluyendo el hombre. Se ha encontrado que el receptor de adenosina A_{2A} es presente en los cardiomiositos auriculares humanos y participa en los mecanismos patológicos fundamentales de la fibrilación auricular. Una ventaja de utilizar antagonistas A_{2A} sobre otros agentes conocidos en la técnica es que los antagonistas A_{2A} van dirigidos específicamente a pacientes con fibrilación auricular.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Compuestos para el tratamiento de la fibrilación auricular.

5 Esta invención se relaciona con el campo de la medicina humana y veterinaria y específicamente con compuestos para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, en particular para el tratamiento de la fibrilación auricular.

Estado de la técnica

10 La fibrilación auricular es la arritmia cardíaca más frecuente y se asocia a una mortalidad y morbilidad sustanciales. Su incidencia y prevalencia está incrementando y representa una creciente carga clínica y económica (la prevalencia actual es del 2% de la población general). Además de los síntomas clínicos severos como palpitaciones, mareos, disnea y otros, la fibrilación auricular es el factor aislado de riesgo más importante para el accidente isquémico cerebral en la población de más de 75 años de edad. En conjunto la fibrilación auricular es responsable de un 5% de los ingresos hospitalarios por enfermedades cardíacas. En el 90% de los casos la fibrilación auricular acontece en presencia de otras enfermedades cardíacas como la enfermedad cardíaca hipertensiva, el fallo cardíaco congestivo o las enfermedades de las válvulas cardíacas. En sólo un 10% de los casos la fibrilación auricular se desarrolla en ausencia de anomalías cardíacas ("lone" fibrilación auricular). Se puede diferenciar entre tres formas de fibrilación auricular: (1) fibrilación auricular paroxística caracterizada por episodios de fibrilación auricular autolimitados con duraciones que varían entre segundos y días; (2) fibrilación auricular persistente que dura indefinidamente hasta que se termina por medio de intervención médica; (3) fibrilación auricular permanente que no revierte tras cardioversión eléctrica o farmacológica.

25 Existen estudios que han demostrado que la fibrilación auricular está causada por múltiples ondas eléctricas reentrantes que se mueven al azar alrededor de la aurícula. Estas ondas se inicián por extrasistoles comúnmente localizados en las extensiones miocárdicas que van de la aurícula izquierda hasta los 5-6 cm proximales de las venas pulmonares. Una vez iniciada la fibrilación auricular se producen cambios en la aurícula (remodelado auricular) que afectan a sus propiedades eléctricas, mecánicas y metabólicas, responsables de la perpetración de la arritmia. La frecuencia ventricular en presencia de fibrilación auricular es elevada y si ésta no puede reducirse con tratamiento médico, se producirá una dilatación ventricular y una disfunción sistólica que se conoce como taquimiocardiopatía. El accidente vascular cerebral o ictus ("stroke") y el tromboembolismo son la mayor causa de mortalidad y morbilidad asociadas a la fibrilación auricular, y la base patofisiológica de ello es el estado protrombótico o de hipercoagulabilidad asociado a anomalías del flujo sanguíneo (estasis auricular, por ejemplo) y daño endotelial o endocárdico.

35 Como en otras subespecialidades en cardiología, se han realizado importantes progresos en las últimas cuatro décadas en el diagnóstico y el tratamiento de arritmias cardíacas. A pesar de dichos avances la curación real de las arritmias cardíacas y de la muerte súbita arrítmica sólo es posible en una minoría de pacientes. Actualmente la terapia para la fibrilación auricular está enfocada a reducir los síntomas relacionados con la fibrilación auricular, la prevención de las complicaciones tromboembólicas y la terminación de la arritmia cuando ello sea posible.

40 En general hay dos formas de enfocar el tratamiento de la fibrilación auricular: a) control de la propia arritmia y b) reducción del riesgo tromboembólico (cfr. M.B. Igbal *et al.*, "Recent developments in atrial fibrillation", *British Medical Journal* 2005, vol. 330, pp. 238-43). El control de la arritmia va dirigido al control del ritmo (restauración y mantenimiento del ritmo sinusal) y al control de la velocidad. Farmacológicamente, el control de ritmo y de la velocidad se realiza con fármacos antiarrítmicos (agentes antiarrítmicos de clase I y III). Ejemplos de ellos que se usan hoy en día son flecainida, propafenona, amiodarona, dofetilida, ibutilida y sotalol. El control del ritmo y de la velocidad por medios no farmacológicos se realiza con cardioversión eléctrica, marcapasos auricular, desfibrilador auricular implantable y procedimiento quirúrgico de Maze.

50 La reducción del riesgo tromboembólico y por tanto, la prevención del ictus es de mayor importancia en la estrategia terapéutica. Farmacológicamente, la aspirina y la warfarina se recomiendan a la mayoría de pacientes para prevenir la formación de trombos auriculares y de episodios tromboembólicos. Datos de ensayos clínicos con pacientes de alto riesgo indican que la warfarina es mejor que la aspirina para prevenir el ictus, pero que el riesgo de hemorragia es dos veces mayor con warfarina que con aspirina. En cualquier caso, el tratamiento anticoagulante debe ser individualizado en base a la edad, comorbilidad y contraindicaciones. La reducción del riesgo tromboembólico mediante procedimientos no farmacológicos se consigue actualmente mediante la obliteración de la orejuela auricular izquierda o con catéter (procedimiento en fase de investigación).

60 Investigaciones recientes han vislumbrado nuevas aproximaciones en las estrategias de tratamiento farmacológico y no farmacológico. Los agentes más prometedores son los inhibidores del enzima convertidora de la angiotensina (ACE) y los agentes bloqueantes de los receptores de angiotensina II. Inhibidores de proteasas, fosfatases con suficiente selectividad y especificidad o antioxidantes pueden también ofrecer estrategias terapéuticas novedosas para reducir o revertir los cambios estructurales, la dilatación auricular y la disfunción contrátil. Sin embargo, el problema del tratamiento de la fibrilación auricular está todavía lejos de ser resuelto satisfactoriamente.

Explicación de la invención

Los inventores han encontrado que un grupo bien conocido de compuestos farmacéuticos, a saber los antagonistas del receptor de adenosina A_{2A}, son útiles para la preparación de medicamentos contra la fibrilación auricular en mamíferos, incluyendo el hombre.

La invención se ha originado del sorprendente hallazgo de que el receptor de adenosina A_{2A} es presente en los cardiomiocitos de aurícula humana y participa en los mecanismos patológicos fundamentales de la fibrilación auricular. En particular, los inventores han encontrado que la expresión de la especie homodimérica del receptor de adenosina A_{2A}, que es la especie funcional en la membrana plasmática, está regulada al alza en pacientes con fibrilación auricular. Experimentos electrofisiológicos han probado que la activación del receptor de adenosina A_{2A} en miocitos auriculares de estos pacientes da lugar a incrementos mediados por la proteína quinasa A de liberaciones espontáneas de calcio del retículo sarcoplásmico medidos como ondas de calcio.

Además, utilizando dos aproximaciones experimentales diferentes (captación de imágenes de calcio por confocal y técnica de patch clamp) los inventores han encontrado que los antagonistas del receptor de adenosina A_{2A} reducen la frecuencia de onda de calcio elevada encontrada en fibrilación auricular. En realidad, los antagonistas del receptor de adenosina A_{2A} no sólo revierten el efecto estimulatorio agonista sobre las ondas de calcio sino que además reducen la frecuencia de onda de calcio basal. Reuniéndolos, estos resultados sugieren que una desregulación mediada por el receptor de adenosina A_{2A} de los flujos de calcio intracelular contribuye a la compleja remodelación eléctrica de la aurícula que fibrila. Estos hechos convierten a los antagonistas del receptor de adenosina A_{2A} en agentes terapéuticos selectivos para tratar la fibrilación auricular.

Previamente, y como investigación más cercana, los inventores habían sólo descrito que los miocitos aislados de aurícula derecha de pacientes con episodios de fibrilación auricular exhibían una liberación espontánea de Ca²⁺ de retículo sarcoplásmico más frecuente que miocitos de pacientes sin esta arritmia (cfr. L. Hove-Madsen *et al.*, "Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes", *Circulation* 2004, vol. September, pp. 1358-63).

En consecuencia, la invención se refiere al uso de un antagonista del receptor de adenosina A_{2A} para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la fibrilación auricular en un mamífero, incluyendo un humano. A partir de aquí, "antagonista del receptor de adenosina A_{2A}" será llamado "antagonista A_{2A}" y "receptor de adenosina A_{2A}" como "receptor A_{2A}". Este aspecto de la invención se puede formular alternativamente como un método para la prevención y/o tratamiento de la fibrilación auricular antagonizando los receptores A_{2A}, que comprende administrar a un mamífero (preferiblemente un humano) que lo necesite una cantidad efectiva de antagonista A_{2A} junto con cantidades apropiadas de diluyentes o portadores aceptables.

Una ventaja de utilizar antagonistas A_{2A} sobre otros agentes conocidos en la técnica es que los antagonistas A_{2A} van dirigidos específicamente a pacientes con fibrilación auricular. Así, la expresión de los receptores A_{2A} diméricos funcionales es baja en pacientes con un tamaño normal de aurícula y sin una historia previa de fibrilación auricular mientras que la expresión de la especie de receptor dimérico está fuertemente regulada al alza en pacientes con fibrilación auricular. Por el contrario, otros agentes actualmente empleados actúan más ampliamente sobre receptores o canales que regulan críticamente múltiples funciones en una variedad de células. Así, los antagonistas de calcio no sólo reducirán la sobrecarga de calcio por inhibición de los canales de calcio tipo L, sino que también reducen la contractibilidad cardíaca. Además, los canales de calcio tipo L también regulan la función del músculo liso y las células secretoras, con los consecuentes efectos secundarios indeseados de los antagonistas de calcio.

El receptor A_{2A}

La adenosina es un nucleósido de purina producido por todas las células metabólicamente activas del cuerpo. La adenosina ejerce su efecto a través de cuatro subtipos diferentes de receptor de superficie celular: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃ que pertenecen a la super familia de receptores acoplados a proteína G. A₁ y A₃ acoplan proteína G inhibitoria, mientras que A_{2A} y A_{2B} acoplan proteína G estimuladora. Los receptores A_{2A} se encuentran principalmente en cerebro, tanto en neuronas como en células gliales (máximos niveles en striatum y nucleus accumbens, de moderados a altos en bulbo olfatorio, regiones del hypothalamus e hippocampus). En striatum el receptor A_{2A} regula la liberación y la función de neurotransmisores (cfr. H. Kase *et al.* "Progress in pursuit of therapeutic A_{2A} antagonists: the adenosine A_{2A} receptor selective antagonist KW 6002: research and development toward a novel nondopaminergic therapy for Parkinson's disease", *Neurology* 2003, vol. 61, pp. 97-100). En tejidos periféricos, los receptores A_{2A} se conoce que están presentes en plaquetas, neutrófilos, bazo, timo, células endoteliales y del músculo liso vascular, donde inducen una potente vasodilatación coronaria que permite la evaluación de la perfusión miocárdica en pacientes con enfermedad coronaria (cfr. Z. Gao *et al.*, "Novel short-acting A_{2A} adenosine receptor agonists for coronary vasodilatation: inverse relationship between affinity and duration of action of A_{2A} agonists", *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, vol. 298, pp. 209-18). Sin embargo, el receptor A_{2A} no se había localizado nunca en cardiomiocitos de aurícula humana.

Compuestos adecuados para tratar la fibrilación auricular

En general, un antagonista es una molécula que se une al receptor sin activarlo. Compite con el/los ligandos endógenos o el/los sustratos por los sitios de unión del receptor y así, inhibe la habilidad del receptor para transducir

ES 2 273 599 B1

una señal intracelular en respuesta a la unión de ligando endógeno. Un antagonista funciona de varias maneras. Puede unirse a o secuestrar la adenosina con suficiente afinidad y especificidad para interferir sustancialmente con, bloquear o de otra manera, evitando la unión de la adenosina al receptor A_{2A}, y así, inhibiendo, suprimiendo o causando la cesación de la actividad biológica mediada por la adenosina.

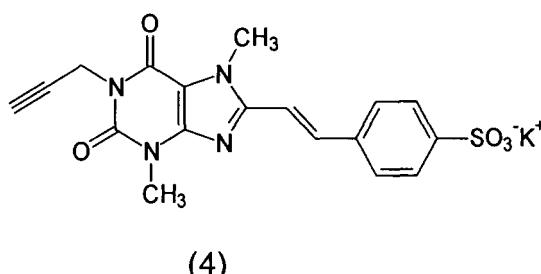
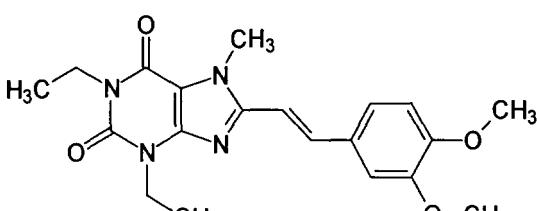
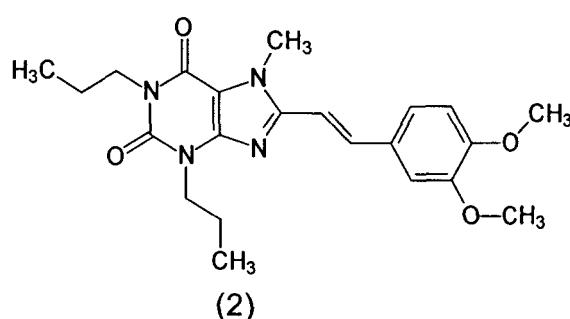
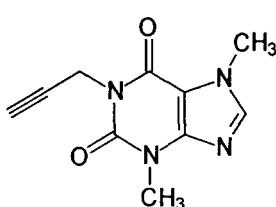
5 El receptor A_{2A} en cardiomiositos y en ausencia de ligando endógeno, presenta una actividad basal. Esta actividad puede ser debida a una actividad constitutiva del receptor o a activación del receptor por adenosina endógena. En esta situación, el tratamiento de la fibrilación auricular puede llevarse a cabo mediante la reducción de esta actividad basal utilizando un antagonista o un agonista inverso. Algunos de los antagonistas A_{2A} de la invención pueden presentar 10 agonismo inverso.

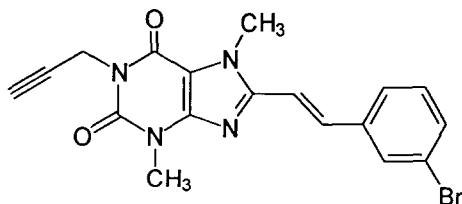
De acuerdo con la localización conocida y la función del receptor A_{2A}, los antagonistas A_{2A} han sido utilizados hasta ahora contra el Parkinson y otras enfermedades del SNC (esquizofrenia, demencia senil como en la enfermedad de Alzheimer, psicosis de origen orgánico, etc.). Entre ellas, la principal es la enfermedad de Parkinson.

15 Cada antagonista A_{2A} se contempla para utilizarse para los propósitos de esta invención. Se han investigado profundamente muchos compuestos diferentes como antagonistas A_{2A}, que pueden clasificarse en dos grandes familias: derivados de xantina y heterociclos no derivados de xantina.

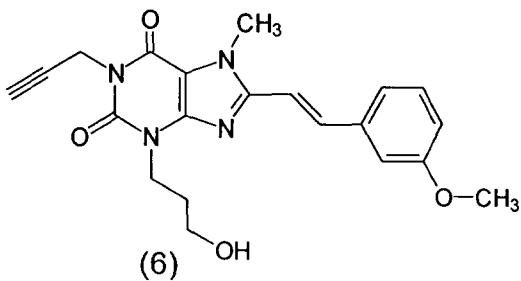
20 En una realización particular de la invención, el antagonista A_{2A} es un derivado de xantina o una sal farmacéuticamente aceptable de éste. Diferentes sustituyentes en varias posiciones, también análogos azo- o deazo-, u otros análogos heterocíclicos del anillo de purina o derivados/análogos tri- o tetracíclicos, pueden tener actividad A_{2A}-antagonística similar. Entre los derivados de xantina, la estructura preferida común a algunos compuestos es la estructura 1,3,7-trialquil-8-estiril-xantina. En una realización preferida, el antagonista A_{2A} es un compuesto que se selecciona del 25 grupo que consiste de teobromina, conocida como DMPX (fórmula 1); KF 17837 (fórmula 2); istradefillina, conocida como KW 6002 (fórmula 3); p-sulfoestiril-DMPX (fórmula 4); BS-DMPX (fórmula 5); MSX-2 (fórmula 6); CSC (fórmula 7); "xanthine amine congener" (XAC, fórmula 8); y MSX-3.

30 En una realización más preferida, el antagonista A_{2A} es KW 6002. Este compuesto está actualmente en ensayos de fase clínica III para la enfermedad del Parkinson. En otra realización preferida, el antagonista A_{2A} es MSX-2. En otra realización preferida, el antagonista A_{2A} es MSX-3, el éster de ácido fosfórico de MSX-2, un profármaco de MSX-2.

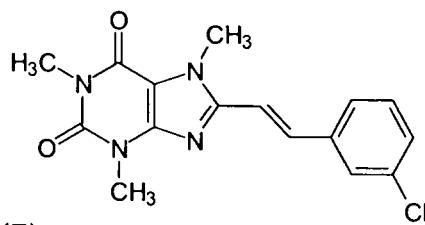




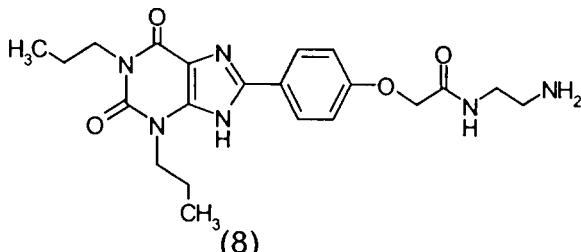
(5)



10



(7)



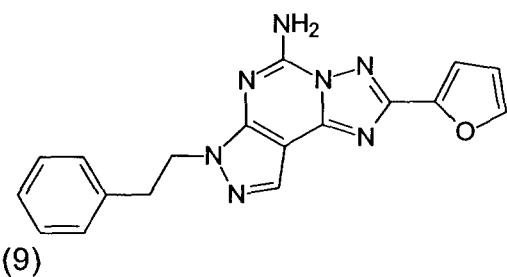
20

Otros compuestos de xantina conocidos por presentar actividad antagonística para el receptor A_{2A} se describen por ejemplo en US 5484920, US 5587378, US 5543415 y EP 1016407A1.

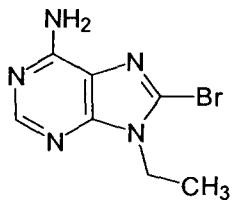
En otra realización particular de la invención, el antagonista A_{2A} es un heterociclo no derivado de xantina. Antagonistas A_{2A} no-xantina típicos pueden derivar de la adenina y representar derivados de la adenina en el sentido más amplio, incluyendo compuestos mono-, di-, tri- y tetracíclicos con varios sustituyentes. Se han identificado otros compuestos heterocíclicos no derivados de la adenina que poseen actividad antagonística A_{2A}. Se conocen algunos compuestos 2-aminopiridina que exhiben antagonismo para el receptor A_{2A} (p.ej. WO 02/14282, WO 01/25210), y también se conocen algunos compuestos 9-aminopirimidina (p.ej. US 2001/0027196).

En una realización preferida, el antagonista A_{2A} se selecciona del grupo que consiste de SCH 58261 (fórmula 9); ANR-82 (fórmula 10); ZM 241385 (fórmula 11); SCH 63390 (fórmula 12), CGS 15943 (fórmula 13), 8FB-PTP (fórmula 14); VER-6623 (también conocido como V2006, fórmula 15); (-) R,S-mefloquina (fórmula 16); y 7FB-PTP (fórmula 17). En una realización más preferida, el antagonista A_{2A} entre el grupo de compuestos no-xantina es VER-6623.

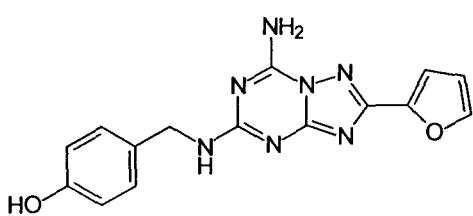
Otros compuestos preferidos como antagonistas A_{2A} son el derivado de pirazolopirimidina de fórmula 18; el derivado de triazoloquinoxalina de fórmula 19; el derivado 9-sustituido 2-amino-6-furil-adenina de fórmula 20; y los derivados de triazolotriazina de fórmula 21, 22 y 23.



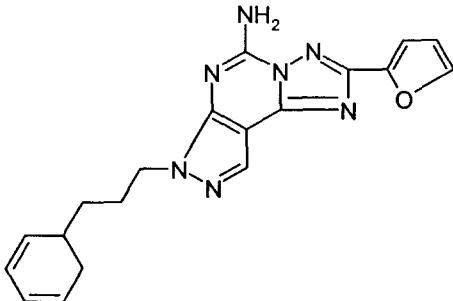
(9)



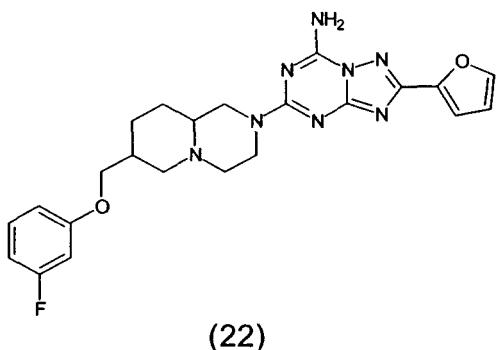
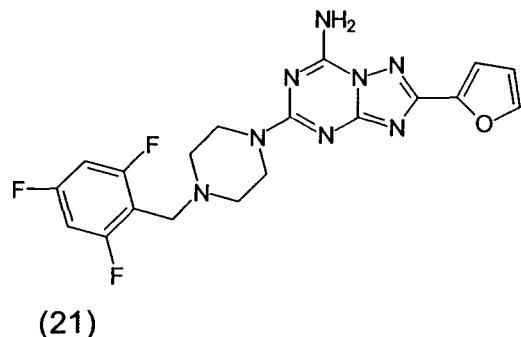
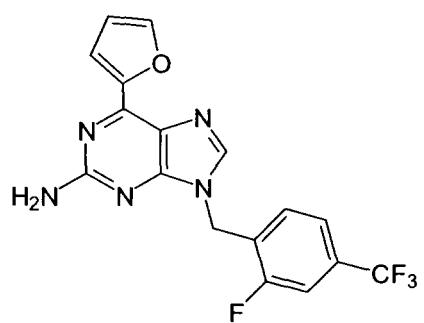
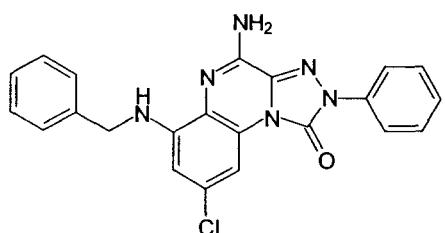
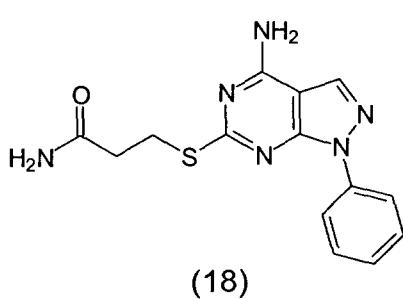
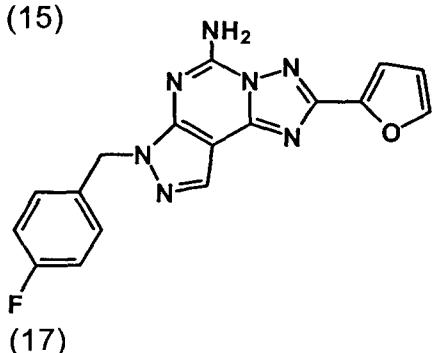
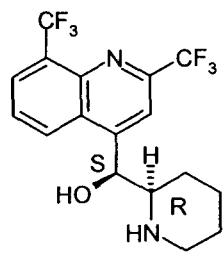
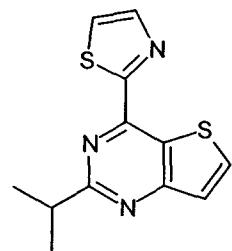
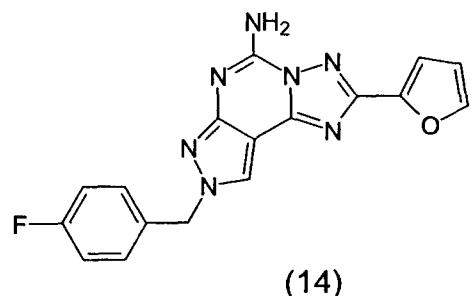
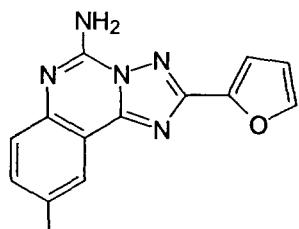
(10)

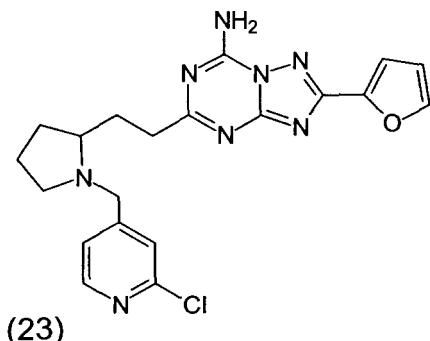


(11)



(12)





15 Otros antagonistas A_{2A} de triazolopirimidina se describen por ejemplo en WO 2004/029056, WO 95/01356, US 5565460, WO 97/05138, WO 98/52568, WO 01/92264 y PCT/US02/32630. Específicamente, compuestos sustituidos de pirazol[4,3-e]-1,2,4-triazolo-[1,5-c]pirimidina se describen en WO 2005/054245, US 2004/220194 y US 2003212059.

20 Otros ejemplos específicos de antagonistas A_{2A} adecuados incluyen los compuestos descritos en las siguientes patentes, solicitudes de patente y artículos: WO 95/01356, US 6630475, US 5935964, WO 03/032996, WO 03/048165, WO 03/048164, WO 03/048163, WO 2005/042500, WO 2005/058883, WO 2005/040151, WO 2005/039572, WO 2004/092177, US 2004138235, WO 2004/019949, WO 02/14282, WO 2004/016605, WO 03/082873, US 5484920, US 5703085, WO 92/06976, WO 94/01114, US 5565460, WO 98/42711, WO 00/7201, WO 99/43678, WO 99/26627, WO 01/92264, WO 99/35147, WO 00/13682, WO 00/13681, WO 00/69464, WO 01/40230, WO 01/02409, WO 01/02400, EP 1054012, WO 01/62233, WO 01/17999, WO 01/80893, WO 02/14282, WO 01/97786, WO 01/16134, WO 00/73307, US 2005043315, US 2003149060, Baraldi *et al.*, "Recent developments in the field of A_{2A} and A₃ adenosine receptor antagonists", *European Journal of Medicinal Chemistry* 2003, vol. 38, pp. 367-82; E. Ongini, *et al.* "Selective adenosine A_{2A} receptor antagonists", *Farmaco* 2001, vol. 56, pp. 87-90; C.E. Müller *et al.*, "A_{2A} Adenosine receptor antagonists - future drugs for Parkinson's disease?", *Drugs of the Future* 2000, vol. 25, pp. 1043-52; L.J. Knutson *et al.*, "KW-6002 (Kyowa Hakko Kogyo)", *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2001, vol. 2, pp. 668-73; B. Cacciari *et al.*, "Medicinal chemistry of A_{2A} adenosine receptor antagonists", *Curr. Top. Med. Chem.* 2003, vol. 3, pp. 403-11; G. Yao *et al.*, "Synthesis of alkyne derivatives of novel triazolopyrazine as A_{2A} adenosine receptor antagonists", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, vol. 15, pp. 511-5; E. Kiselgof *et al.*, "6-(2-furanyl)-9H-purin-2-amine derivatives as A_{2A} adenosine antagonists", *Bioorg. Med. Chem. Left.* 2005, vol. 15, pp. 2119-22; S.M. Weiss *et al.*, "Discovery of nonxanthine adenosine A_{2A} receptor antagonists for the treatment of Parkinson's disease", *Neurology* 2003, vol. 61 (Supp. 6), pp. S101-6; C.B. Vu *et al.*, "Novel diamino derivatives of [1,24]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazine as potent and selective adenosine A_{2A} receptor antagonists", *J. Med. Chem.* 2005, vol. 48, pp. 2009-18; C.B. Vu *et al.*, "Piperazine derivatives of [1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazine as potent and selective adenosine A_{2A} receptor antagonists", *J. Med. Chem.* 2004, vol. 47, pp. 4291-9.

40 El experto en la materia sabrá si un compuesto es un buen antagonista A_{2A} para el propósito de la invención. Por ejemplo, hay en la técnica métodos adecuados para valorar si un compuesto es un buen antagonista A_{2A}. Un ejemplo es el método basado en un ensayo de unión de radioligando que se describe en la solicitud de patente US 2004/0138235 secciones [0226]-[0240].

45 Es preferido para el tratamiento de la fibrilación auricular que el antagonista A_{2A} sea selectivo para el receptor A_{2A}. Todos los antagonistas A_{2A} antes descritos son selectivos para el receptor A_{2A}, pero el grado de selectividad es diferente entre ellos. Las selectividades pueden también diferir un tanto entre diferentes especies (p.ej. rata, humano).

50 Los antagonistas A_{2A} se preparan por métodos conocidos como se describe en las patentes y solicitudes citadas.

Composiciones farmacéuticas y administración

55 En términos de tratamiento, una cantidad efectiva se refiere a aquella cantidad de ingrediente activo que es suficiente para dar un resultado clínico beneficioso o deseado: paliar, mejorar, estabilizar, revertir o retrasar la progresión de la enfermedad o desorden, o si no, reducir las consecuencias patológicas de la enfermedad o desorden. La cantidad efectiva la determina normalmente un médico caso por caso.

60 Mientras que el compuesto activo para usarse de acuerdo con la invención en terapia puede administrarse en forma de compuesto químico bruto, se prefiere introducir el ingrediente activo, opcionalmente en forma de sal fisiológicamente aceptable, en una composición farmacéutica junto con uno o más adyuvantes, excipientes, portadores, tampones, diluyentes y/o otros auxiliares farmacéuticos habituales. Los componentes pueden administrarse en una sola o en múltiples dosis por cualquiera de los modos de administración aceptables de agentes con utilidad similar, incluyendo las rutas rectal, bucal, intranasal y transdérmica, por inyección intra-arterial, intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutánea, oral, tópica, como inhalante, o vía un aparato impregnado o recubierto como un stent, por ejemplo, o un polímero cilíndrico insertado en la arteria.

Un modo de administración preferido es el parenteral, particularmente por inyección. Las formas para la administración por inyección incluyen las suspensiones acuosas o oleosas, o las emulsiones, así como las soluciones acuosas estériles. La administración oral es otra ruta de administración preferida. La composición farmacéutica puede estar en forma de pastillas, píldoras, polvos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones jarabes, aerosoles, cápsulas, etc.

5 Las composiciones de la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o de acción retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente mediante el empleo de procedimientos conocidos en la técnica. Sistemas de liberación controlada del fármaco para administración oral incluyen sistemas de bombas osmóticas y sistemas disolusionales que contienen reservorios recubiertos de polímero o formulaciones con 10 una matriz fármaco-polímero. Otra formulación para usarse en los métodos de la presente invención emplea aparatos de liberación transdérmica (parches). Estos parches transdérmicos pueden usarse para proporcionar la infusión continua o discontinua de los compuestos en cantidades controladas.

15 Las composiciones se formulan preferiblemente en forma de dosis única. La dosis depende de la naturaleza y la severidad de la enfermedad y determinarla queda dentro del criterio del médico.

20 Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que la invención pertenece. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, 25 componentes o pasos. El resumen de la solicitud se incorpora aquí como referencia. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25 Breve descripción de los dibujos

Fig. 1. Regulación al alza (up-regulation) de la expresión del receptor A_{2A} en pacientes con fibrilación auricular.

30 Fig. 2. La estimulación por agonistas del receptor A_{2A} incluye en pacientes con fibrilación auricular un incremento dependiente de PKA de la liberación espontánea de calcio del retículo sarcoplásmico.

Fig. 3. Los antagonistas A_{2A} reducen la liberación basal espontánea de calcio del retículo sarcoplásmico en pacientes con fibrilación auricular. Experimentos que muestran I_{NCX} espontáneo a un potencial mantenido a -80 mV.

35 Exposición detallada de modos de realización

Descripción detallada de las figuras

40 La Fig. 1A muestra miocitos frescos aislados de la aurícula derecha que fueron doblemente teñidos con anti-receptor A_{2A} (paneles 1, 4, 7 y 10) y anti-miosina (2), anti- α -actinina (5), anti-connexina-43 (8) o anti-receptor rianodina (11). La superimposición de las imágenes de immunofluorescencia doble (paneles 3, 6, 9 y 12) revela colocalización 45 del receptor A_{2A} con α -actinina y distribución solapada del receptor A_{2A} con el receptor de rianodina (RyR). La Fig. 1B muestra membranas celulares de células HEK transfectadas transitoriamente con el receptor A_{2A} humano (control positivo, C+) y membranas auriculares de corazón humano de individuos con ritmo sinusal (SINUS) o con fibrilación auricular (AF) resueltas por SDS-PAGE e inmunoblot empleando un anticuerpo de conejo anti-receptor A_{2A} . “Di” significa dímero y “Mo” significa monómero. La Fig. 1C muestra el escaneado densitométrico relativo (“Relative Densitometric Scan”, RDS) del inmunoblot de la Fig. 1B. La cantidad total de receptor A_{2A} (monómero más dímero) se muestra en barras negras. Las cantidades relativas de monómero de receptor A_{2A} (barras blancas) y de dímero (barras grises) se normalizan utilizando la suma total de receptor A_{2A} (dímero más monómero) en cada carril.

50 En la Fig. 2A, el I_{NCX} espontáneo se midió con el potencial de membrana mantenido a -80 mV antes (control), durante (CGS) y después (lavado, W) de la exposición del miocardiocito a 200 nM de CGS 21680. Las barras de escala horizontales y verticales corresponden respectivamente a 30 s y 100 pA. La Fig. 2B muestra la dependencia con el tiempo del efecto estimulador del CGS 21680 en el número de corrientes espontáneas de intercambio Na-Ca 55 (contadas como eventos en cada barrido de 30 s, e/s). La línea gruesa situada sobre las barras indica el periodo de aplicación de CGS 21680. La Fig. 2C muestra cómo el antagonista A_{2A} , ZM 241385 (1 μ M) fue capaz de revertir el efecto estimulador de 200 nM de CGS 21680 sobre el I_{NCX} espontáneo. Las barras de escala horizontales y verticales corresponden respectivamente a 30 s y 100 pA. La Fig. 2D es un resumen del efecto de CGS en los cardiomocitos de 8 pacientes sin y de 11 pacientes con fibrilación auricular. El test de t de parejas se usó para evaluar el efecto del 60 CGS 21680 y los valores de p se indican sobre las barras. I_{NCX} F significa frecuencia I_{NCX} . La Fig. 2E muestra que la adición de 10 μ M de H-89 abole el efecto estimulador de 200 nM de CGS 21680 en 5 pacientes. ANOVA muestra un efecto significativo del tratamiento en la frecuencia de ondas ($p=0.001$) y el post-test dió una $p=0.03$ para CGS versus control, $p=0.002$ para CGS versus CGS+H-89 y $p=0.05$ para CGS+89 versus control.

65 En la Fig. 3A, el antagonista de receptor A_{2A} , SCH 58261 (50 nM) causó una reducción reversible de la frecuencia I_{NCX} espontánea en muestras de pacientes con fibrilación auricular. Las barras de escala horizontales y verticales corresponden respectivamente a 30 s y 100 pA. En la Fig. 3B, los antagonistas A_{2A} reducen la frecuencia de ondas de calcio espontáneas (WF) medidas por captación de imágenes de calcio por confocal (panel izquierdo, n=6) o

ES 2 273 599 B1

por la técnica de patch-clamp (panel derecho, n=7). Los efectos de 50 nM de ZM 241385 y de SCH 58261 fueron comparables y se reunieron. La significación estadística empleando un test de t no aparejado en los experimentos de confocal y un test de t de parejas de patch-clamp se muestra sobre las barras.

5 *Expresión y localización del receptor A_{2A} en la aurícula humana derecha*

La presencia de receptor A_{2A} en cardiomiositos de aurícula derecha se investigó por inmunoblot. Los resultados muestran que el receptor A_{2A} está presente en la aurícula humana y que tanto la forma monomérica como la dimérica se expresan en este tejido, siendo la especie dimérica minoritaria en muestras provenientes de aurícula en ritmo sinusal. La localización del receptor A_{2A} en miocardio auricular se estudió por microscopía confocal en muestras teñidas doblemente con anticuerpos dirigidos contra el receptor A_{2A}, miosina, α -actinina, connexina-43 o el receptor de rianodina (RyR). El receptor A_{2A} se expresó de acuerdo a un patrón de bandas transversal al eje de la fibra miocárdica y colocalizó a nivel de la línea Z del sarcómero con la proteína de citoesqueleto α -actinina. La distribución del receptor A_{2A} fue cuantitativamente similar en muestras de pacientes con y sin fibrilación auricular.

15 *Regulación al alza de la expresión de receptor A_{2A} en pacientes con fibrilación auricular*

Los miocitos auriculares aislados mantenían el patrón bandeadado del receptor A_{2A}, la colocalización con α -actinina, y la distribución solapada con el RyR que se puso de manifiesto en las muestras de tejido auricular (cfr. Fig. 1A). No se observaron diferencias en los cardiomiositos de pacientes con y sin fibrilación auricular (datos no mostrados). Los niveles de proteína correspondientes al receptor A_{2A} medidos por inmunoblot fueron marcadamente superiores en pacientes con fibrilación auricular (cfr. Fig. 1B-C) e interesantemente, la especie dimérica de receptor A_{2A}, que es la forma funcional presente en la superficie celular, estaba notablemente elevada en fibrilación auricular (cfr. Fig. 1 C). No se observaron diferencias significativas en vasos sanguíneos. Por lo tanto los hallazgos presentes no sólo demuestran por vez primera la existencia de receptor A_{2A} en miocitos auriculares humanos, sino su regulación al alza, principalmente en forma homodimérica, en pacientes con fibrilación auricular.

20 *La estimulación por agonistas de los receptores A_{2A} induce un incremento dependiente de PKA en la liberación espontánea de calcio del retículo sarcoplásmico (SR) en pacientes con fibrilación auricular.*

El efecto de los agonistas del receptor A_{2A} en la liberación espontánea de calcio del SR se analizó en miocitos auriculares aislados de pacientes con ritmo sinusal y en pacientes con fibrilación auricular. Fueron analizadas tanto la liberación de calcio local no propagado o destellos de calcio (“calcium sparks”) como la liberación de calcio regeneradora del SR (calcium waves). La preincubación con el agonista de receptor A_{2A}, CGS 21680 (200 nM), incrementó el número de ondas (waves) de calcio en pacientes con fibrilación auricular pero no en aquéllos sin la arritmia.

Para determinar si el efecto del CGS 21680 en la liberación espontánea de calcio del SR es secundaria a un efecto en el potencial de membrana, se utilizó la técnica de patch-clamp para mantener el potencial de membrana a -80 mV. Esto no impidió que el CGS 21680 incrementara de forma reversible el número de ondas de liberación espontánea de calcio medidas como corrientes de intercambio Na-Ca (I_{NCX}) activadas por ellos (cfr. Fig. 2A y B). De hecho esta aproximación confirmó el efecto estimulador significativo del CGS 21680 en pacientes con fibrilación auricular (cfr. Fig. 2D). Por lo tanto, el incremento en la liberación espontánea de calcio del SR inducido por el CGS 21680 es debido a una regulación dependiente del receptor A_{2A} en la actividad del RyR. El efecto específico del CGS 21680 fue revertido por los dos antagonistas selectivos ZM 241385 (cfr. Fig. 2C) y SCH 58261.

Puesto que el receptor A_{2A} está acoplado a proteínas Gs, su activación mediada por agonistas debe incrementar los niveles de cAMP, que a su vez da lugar a la activación de la PKA y a la fosforilación del RyR. Para investigar si el receptor A_{2A} ejerce su efecto a través de una activación de PKA mediada por cAMP, se empleó el inhibidor selectivo de la PKA, H-89. El efecto estimulador del CGS 21680 en miocitos de pacientes con fibrilación auricular fue contrarestando por H-89 (cfr. Fig. 2E), confirmando que la regulación de la liberación espontánea de calcio del SR dependiente de receptor A_{2A} está de hecho mediada por la activación de la PKA. De manera interesante, el H-89 no sólo abolía el efecto del CGS 21680 sino que también reduce la liberación espontánea de calcio a un nivel significativamente menor que el nivel basal existente antes de la aplicación de CGS 21680. El análisis de las ondas y destellos de calcio mediante microscopía confocal confirmó la dependencia de PKA en la liberación espontánea de calcio mediada por receptor A_{2A}.

45 *El bloqueo de los receptores A_{2A} reduce el nivel basal de liberación espontánea de calcio del SR.*

La existencia de un tono basal de cAMP in miocitos auriculares humanos se ha sospechado a partir de estudios de modulación neuro-hormonal de corrientes de calcio de tipo L. La observación de los inventores de que un bloqueante de la PKA, el H-89, reduce la frecuencia de ondas de calcio por debajo del nivel basal debe interpretarse como la existencia de un tono basal de cAMP dependiente de receptor A_{2A}. En concordancia con esto, los antagonistas selectivos del receptor A_{2A}, SCH 58261 o ZM 241385, aplicados a células de pacientes con fibrilación auricular que muestran un elevado nivel basal de liberación de calcio, redujeron significativamente la frecuencia de las ondas de calcio medidas por microscopía confocal o por la técnica de patch clamp (cfr. Fig. 3).

ES 2 273 599 B1

Muestras humanas

Se utilizaron en este estudio muestras de tejido cardíaco de un total de 54 pacientes sometidos a cirugía cardíaca. Aunque las muestras correspondían a tejido auricular que se desecha durante la cirugía, se pidió permiso a cada paciente para utilizarlas. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital de Sant Pau (Barcelona, España).

Diecisiete de los 54 pacientes tuvo una historia de fibrilación auricular mientras que el resto no tenía la arritmia. Veinticinco pacientes no tenían fibrilación auricular pero sí dilatación auricular izquierda (diámetro de la aurícula izquierda > 40 mm). Cuando es pertinente se indica el número de pacientes empleados en series experimentales específicas. Los pacientes tratados con antagonistas de Ca²⁺ se excluyeron del estudio. Otro tipo de medicación no se consideró que pudiera afectar significativamente los parámetros medidos. En los estudios inmunohistoquímicos se emplearon un total de 8 pacientes con fibrilación auricular (diámetro de aurícula izquierda: 53.8 ± 6.8 mm). 15 pacientes sin dilatación auricular y sin historia de fibrilación auricular sirvieron de control (diámetro de aurícula izquierda: 36.5 ± 3.4 mm).

15 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anticuerpo policlonal VC21-Ab anti-receptor A_{2A} purificado por afinidad; VC21-Ab fue desarrollado contra un péptido que corresponde al segundo bucle intracelular del receptor A_{2A}; anticuerpo anti-receptor A_{2A} de conejo (Clone PA1-042, Affinity BioReagents, Golden, CO, U.S.A.); anticuerpo de ratón anti-miosina muscular (Clone NOQ7.5.4D, Chemicon International, Temecula, California, U.S.A.); anticuerpo de ratón anti- α -actinina (Clone EA-53, Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.); anticuerpo anti-connexina-43 (Clone 2, Transduction Laboratories, Lexington, KY, U.S.A.); anticuerpo anti-receptor de rianodina (Clone C3-33, Calbiochem, San Diego, California, U.S.A.). Los anticuerpos secundarios empleados fueron: IgG de cabra anti-ratón conjugado a ALEXAFLUOR 488® (1/1000), IgG de cabra anti-conejo conjugado a TEXAS RED® (1/2000) (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.), IgG de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (1/60000) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, U.S.A.) e IgG de conejo anti-ratón (1:2000) (Dako, Glostrup, Denmark).

30 Obtención de miocitos

Los miocitos fueron aislados de muestras de tejido auricular humano mediante el protocolo descrito previamente (cfr. L. Hove-Madsen *et al.*, “Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes”, *Circulation* 2004, vol. 110, pp. 1358-63). Brevemente, las muestras se lavaron, se cortaron en pequeñas piezas en una disolución libre de calcio que contenía 30 mM de monoxima de butanodiona (BDM), y se incubaron a 35°C en una disolución libre de Ca²⁺ que contenía 0.5 mg/ml de colagenasa (Worthington type 2, 318 u/mg) y 0.5 mg/ml de proteinasa (Sigma type XXIV, 11 u/mg solid). Después de 45 min, el tejido se extrajo de la disolución enzimática y las células se disgregaron en una disolución libre de Ca²⁺ con ayuda de una pipeta Pasteur. El tejido sobrante se digirió (3x15 minutos) en un medio fresco libre de calcio que contenía 0.4 mg/ml de colagenasa. Las disoluciones que contenían las células disgregadas se centrifugaron a 600 rpm durante 1 min, se resuspendieron en medio libre de calcio y entonces el calcio se añadió gradualmente hasta una concentración de 1 mM. Sólo las células elongadas con estriaciones cruzadas claras y sin granulaciones se usaron en los experimentos.

45 Control positivo: cultivo celular y transfección

Las células HEK-293 se hicieron crecer en un medio de Dulbecco's modificado por Eagle (DMEM, Sigma Aldrich Chemical Co.). Las células se transfecaron transitoriamente con el DNA que codifica para el receptor A_{2A} humano (cfr. M. Canals *et al.*, “Adenosine A_{2A}-dopamine D₂ receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer”, *J. Biol. Chem.* 2003, vol. 278, pp. 46741-9) mediante precipitación con fosfato de calcio. Las células se colectaron a 24 o 48 h después de la transfección.

50 Liberación espontánea de calcio del SR

Las señales de calcio (destellos y ondas de calcio) se detectaron en células cargadas con fluo-3 empleando un microscopio confocal laser (Leica TCS SP2 AOBS, Germany). La solución experimental contenía (en mM): NaCl 136, KCl 4, NaH₂PO₄ 0.33, NaHCO₃ 4, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1.6, HEPES 10, Glucosa 5, ácido pirúvico 5, (pH = 7.4). La emisión de fluorescencia se detectó a 500 y 650 nm con excitación a 488 nm atenuada a 1-5%. Los destellos y las ondas de calcio se midieron en condiciones basales (resting) durante 2 x 10.24 s, a una velocidad de barrido de 1 kHz. Los destellos de calcio se identificaron según el incremento en la cantidad de señal de una sección de 3 μ m a través del centro del destello de calcio, sin incremento detectable en la sección de 3 μ m adyacente. Un incremento en la cantidad de señal en dos o más secciones de 3 pm adyacentes se consideró una onda de calcio. La amplitud de cada destello de calcio, y su vida media fueron determinados a partir de una representación exponencial de la fase de declive de la señal transitoria del destello de calcio. La frecuencia de destellos de calcio se determinó para cada una de las células y se normalizó por la longitud de célula barrida.

Patch-Clamp

La corriente de entrada transitoria de intercambio Na-Ca asociada a las ondas de calcio se cuantificó en configuración de patch perforada utilizando un software de control del amplificador de patch-clamp (EPC 10, HEKA, Germany).

- 5 La resistencia de la pipeta fue de 1.5-4 MΩ. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y se iniciaron cuando la resistencia del sistema fue estable y hubo decrecimiento hasta menos de 5 veces la resistencia de la pipeta. La solución intracelular contenía (en mM): NaCl 127, tetraetilamonio (TEA) 5, HEPES 10, NaHCO₃ 4, NaH₂PO₄ 0.33, glucosa 10, ácido pirúvico 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1.8, (pH = 7.4). La solución de la pipeta contenía (en mM): ácido aspártico 109, CsCl 47, Mg₂ATP 3, MgCl₂ 1, Na₂fosfocreatina 5, Li₂GTP 0.42, HEPES 10 and 250 µg/ml anfotericina B, (pH = 7.2). El agonista de receptor A_{2A}, CGS 21860, los antagonistas ZM 241385 y SCH 58261, y el inhibidor de PKA, H-89, se disolvieron en DMSO y se mantuvieron en soluciones stock de 10 mM. El contenido de calcio liberable por cafeína se determinó por exposición transitoria de las células a 10 mM de cafeína. La corriente de intercambio Na-Ca resultante se convirtió a pmoles (10⁻¹⁸ mol) de calcio liberado del SR asumiendo una estequiometría de 3Na⁺:1Ca²⁺ para el intercambiador Na-Ca.
- 10

15 Tratamiento de datos y estadística

Los experimentos de determinación de calcio por técnicas electrofisiológicas y de microscopía confocal se llevaron a cabo sin conocimiento de los datos clínicos de los pacientes. Se hizo la media de los destellos de Ca²⁺ y de las ondas de Ca²⁺ cuantificados en células de un mismo paciente. Excepto cuando se mantenía lo contrario, los valores medios de cada paciente se usaron para el análisis estadístico y se expresaron como media ± S.E.M. Se comprobó el test de normalidad para el conjunto de los datos. El test de la t de Student se empleó para saber si las diferencias eran estadísticamente significativas para cada efecto específico. Se empleó el test de ANOVA para comparar múltiples efectos y el post-test de Student-Newman-Keuls se usó para evaluar la significación de los efectos específicos.

20 25 Preparación de membranas

Las membranas se obtuvieron por centrifugación después de una disruptión de las células con un homogenizador tipo Polytron (Kinematica, PTA 20TS rotor, nivel 5, tres períodos de 15 s) en una disolución refrigerada en hielo que contenía 0.32 M de sacarosa y 5 mM de Tris-HCl (pH 7.4; tampón A). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 1000 x g durante 30 min a 4°C (3500 rpm en un rotor 75Ti). El sobrenadante se centrifugó a 26000 x g durante 30 min a 4°C (20000 rpm en un rotor 75Ti) y el residuo se resuspendió en tampón A, se incubó a 37°C durante 30 min y se centrifugó en las mismas condiciones. El residuo se resuspendió en 0.3 M de KCl, se agitó durante la noche a 4°C, se centrifugó a 26000 x g durante 30 min a 4°C (20000 rpm en un rotor 75Ti) y se lavó una vez con el tampón tal como se describe arriba. El residuo final (preparación de membranas) se resuspendió en 50 mM de Tris-HCl y se congeló a -80°C. La suspensión de membranas de células HEK transfectadas se obtuvieron como se ha descrito previamente (cfr. C. Herrera, *et al.*, "Adenosine A_{2B} receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells", *Mol. Pharmacol.* 2001, vol. 59, pp. 127-34). La proteína se cuantificó por el método del ácido bicinconínico (Pierce Chemical Co.).

40 Electroforesis en gel e inmunoblot

Las membranas de células humanas o de células HEK transfectadas transitoriamente se trajeron con tampón de SDS-PAGE (8 M urea, 2% SDS, 100 mM DTT, 375 mM Tris, pH 6.8), se calentaron a 37°C durante 2 h y las proteínas se resolvieron por electroforesis en gel de polyacrilamide (10%). Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF mediante un sistema de transferencia semi-seco y el inmunoblot se llevó a cabo con el anticuerpo indicado en cada caso y subsecuentemente con IgG de cabra anti-conejo conjugada a peroxidasa de rábano (1/60,000). Las bandas inmunoreactivas se desarrollaron usando un kit de detección por quimioluminiscencia (SuperSignal, West Pico Chemiluminescent substrate, Pierce).

50 Tinción inmunológica

Para la inmunohistoquímica, el tejido humano se embebió en OCT y se congeló en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Secciones de ocho micrómetros se cortaron en un criostato enfriado a -18°C. Las secciones se recogieron sobre láminas SUPERFROST PLUS® (BDH Chemicals Ltd., Poole, United Kingdom), se secaron al aire y se guardaron a -70°C. Para la inmunofluorescencia, las secciones se bloquearon 30 min en un medio de 10% de suero de mulo en tampón Tris-salino (TBS) (150 mM NaCl/50 mM Tris-HCl, pH 7.5). Las muestras se incubaron con anticuerpo anti-receptor A_{2A} purificado por afinidad (VC21, 25 µg/ml) y con anticuerpos anti-α-actinina (1:500 dilución), anti-miosina (2 µg/ml), anti-connexina-43 (2.5 µg/ml) y anti-receptor de rianodina (6.5 µg/ml) durante una hora a temperatura ambiente y después lavadas tres veces durante 10 min en TBS. Las IgG de cabra anti-ratón conjugadas con ALEXA FLUOR 488® y las IgG de cabra anti-conejo conjugadas a TEXAS RED® se aplicaron en disolución de bloqueo a una dilución de 1:2000. Las secciones se lavaron y se montaron en medio de inmunofluorescencia VECTASHIELD® (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, U.S.A.). Para la inmunocitoquímica, miocitos humanos recién aislados se plaquearon en cubres de 24 mm recubiertos con poly-D-lysina. Tras la adhesión de las células los miocitos se lavaron con tampón fosfato-salino (PBS) y se fijaron con un 2% de paraformaldehido en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS y se incubaron con 0.1 M de glicina 5 min para bloquear los grupos aldehido. Despues de lavar con PBS, los miocitos se permeabilizaron con 0.2% de Triton-X-100 en PBS 15 min. Las células fueron después lavadas con PBS, bloqueadas 30 min con suero de caballo al 10% a temperatura ambiente y

ES 2 273 599 B1

se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: polyclonal anti-receptor A_{2A} (10 µg/ml), anti- α -actinina (1:500 dilución), anti-miosina (1:500 dilución) y anti-connexina-43 (1:150 dilución) durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con anticuerpo anti-ratón conjugado a ALEXA FLUOR 488® y/o anticuerpo anti-conejo conjugado TEXAS RED®. Finalmente las células se lavaron de nuevo tres veces y se montaron en medio 5 VECTASHIELD®. Las observaciones de microscopía confocal se llevaron a cabo con el equipo Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg, Germany).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

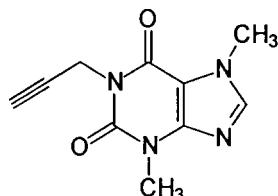
65

REIVINDICACIONES

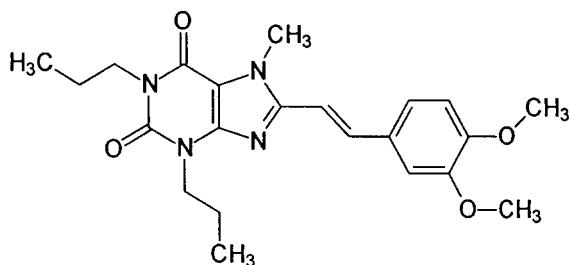
1. Uso de un antagonista del receptor de adenosina A_{2A} para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la fibrilación auricular en un mamífero, incluyendo un humano.

5 2. Uso según la reivindicación 1, donde el antagonista A_{2A} es un derivado de xantina o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

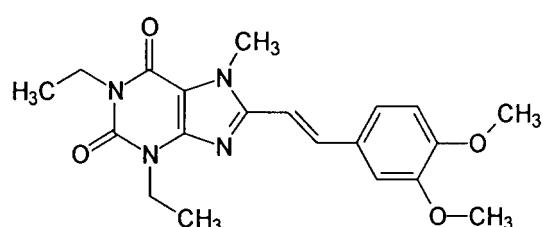
10 3. Uso según la reivindicación 2, donde el antagonista A_{2A} es un compuesto que se selecciona del grupo que consiste de aquéllos con las siguientes fórmulas:



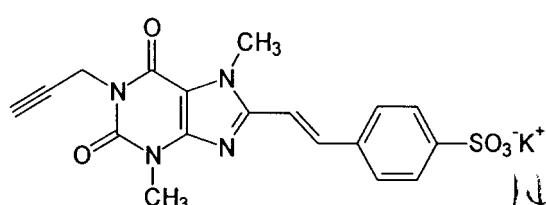
(1)



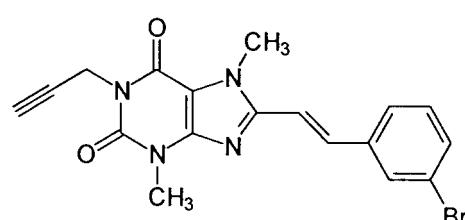
(2)



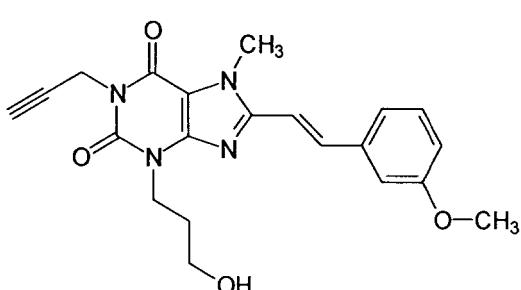
(3)



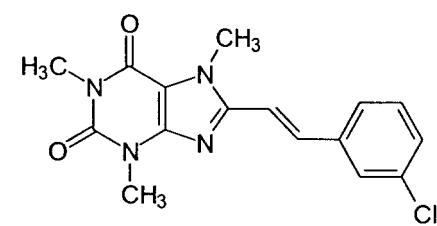
(4)



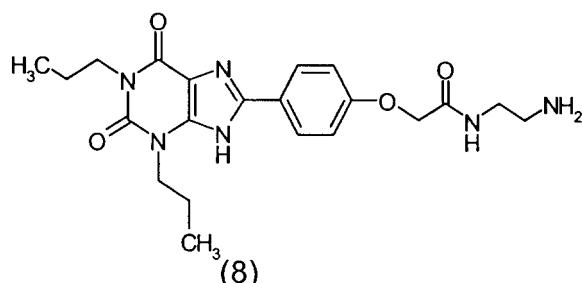
(5)



(6)



(7)



(8)

65 4. Uso según la reivindicación 3, donde el antagonista A_{2A} es el compuesto de fórmula (3) también conocido como KW 6002.

ES 2 273 599 B1

5. Uso según la reivindicación 3, donde el antagonista A_{2A} es el compuesto de fórmula (6) también conocido como MSX-2.

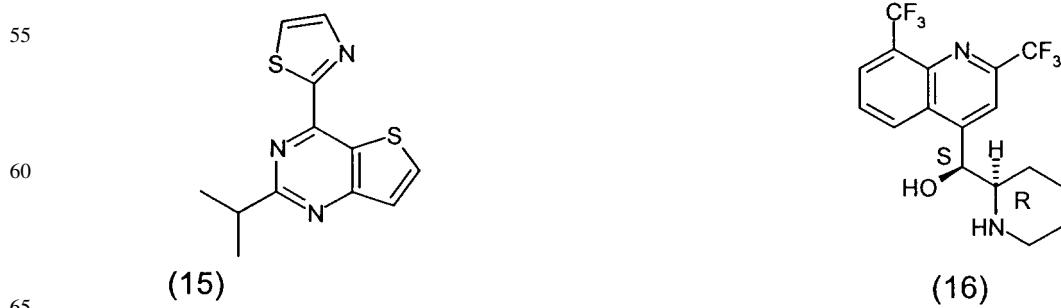
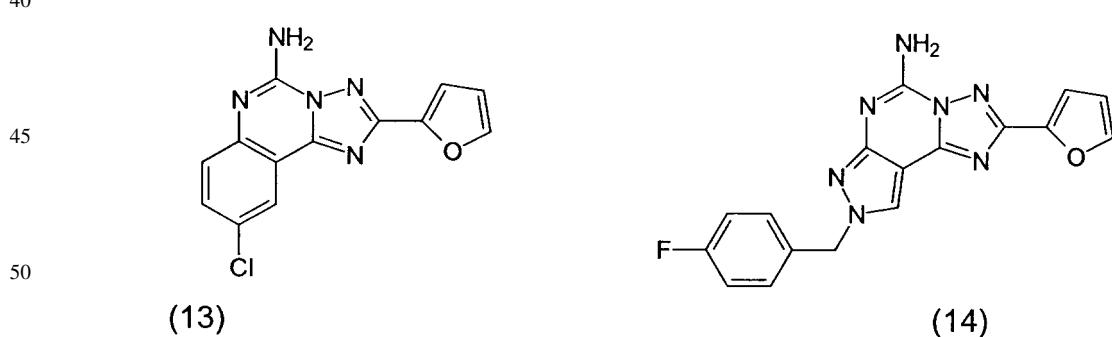
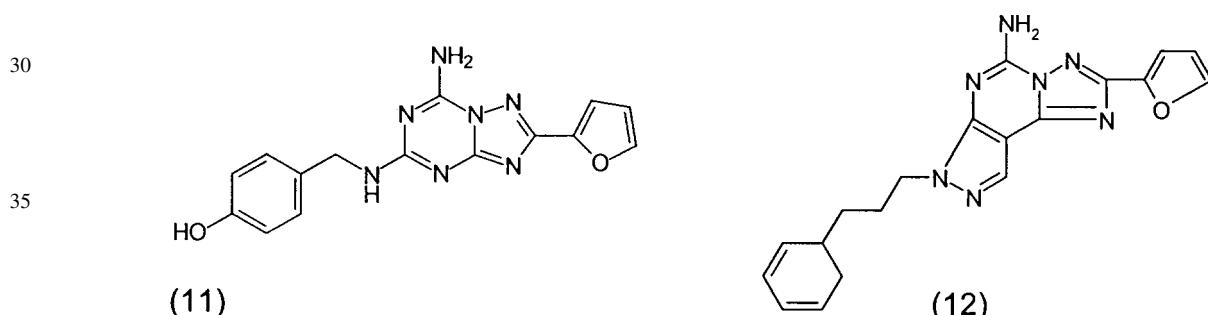
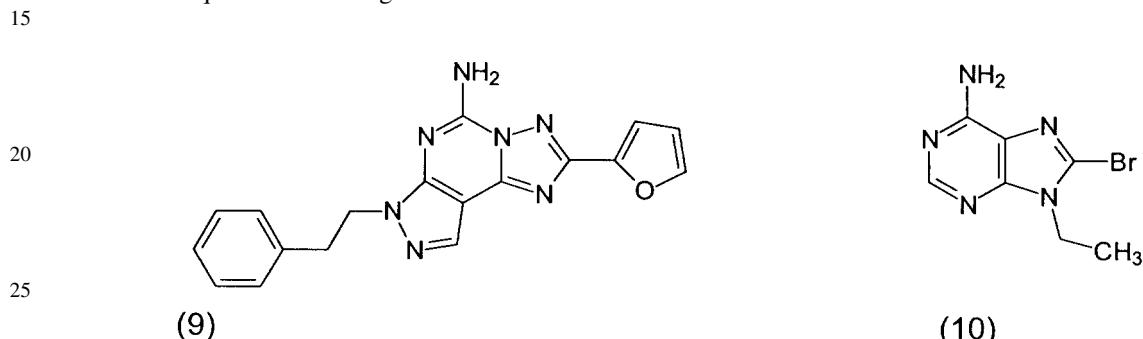
6. Uso según la reivindicación 2, donde el antagonista A_{2A} es el éster de ácido fosfórico del compuesto de fórmula (6) como se define en la reivindicación 3.

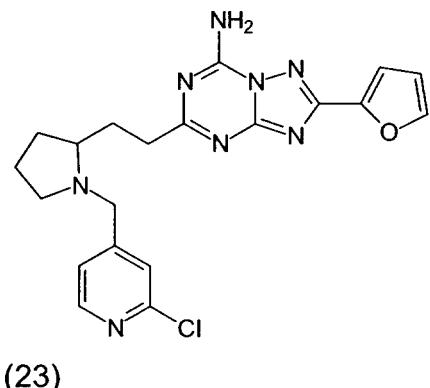
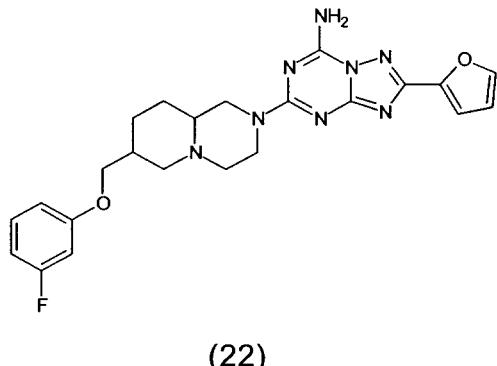
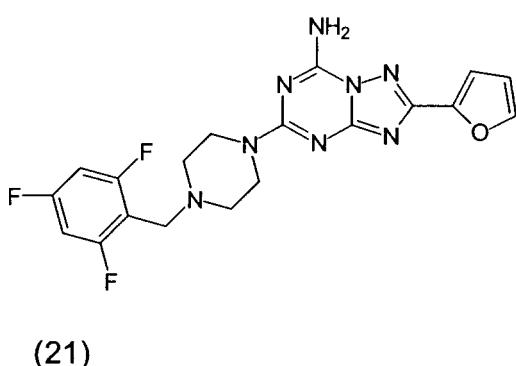
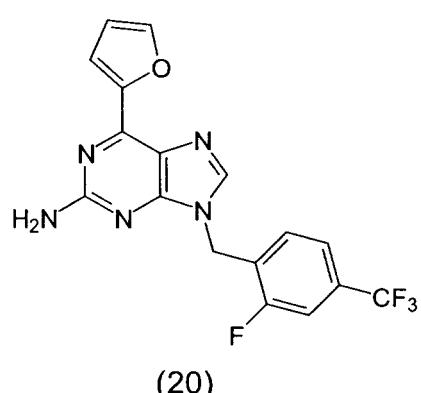
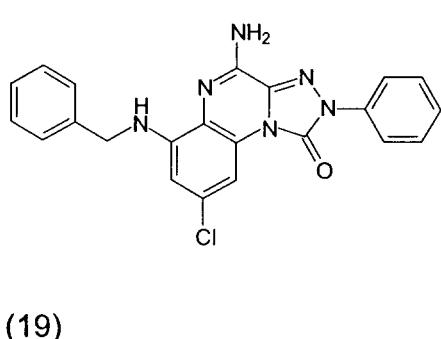
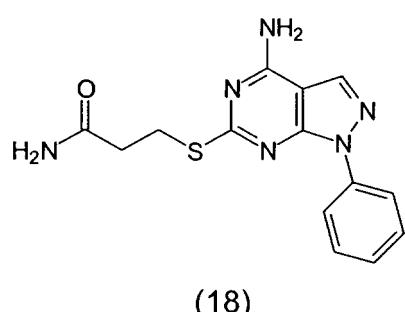
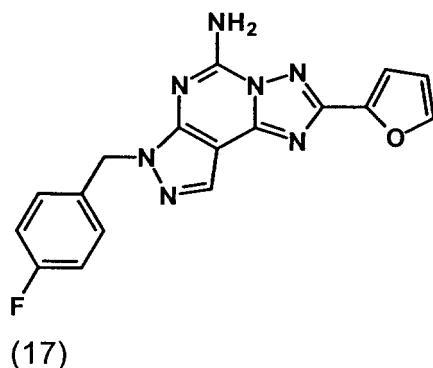
7. Uso según la reivindicación 1, donde el antagonista A_{2A} es un derivado de pirazolopirimidina.

8. Uso según la reivindicación 1, donde el antagonista A_{2A} es un derivado de triazoloquinoxalina.

10 9. Uso según la reivindicación 1, donde el antagonista A_{2A} es un derivado de triazolotriazina.

15 10. Uso según la reivindicación 1, donde el antagonista A_{2A} es un compuesto que se selecciona del grupo que consiste de aquéllos con las siguientes formulas:





60 11. Uso según la reivindicación 10, donde el antagonista A_{2A} es el compuesto de fórmula (15) también conocido como VER-6623.

FIG. 1A

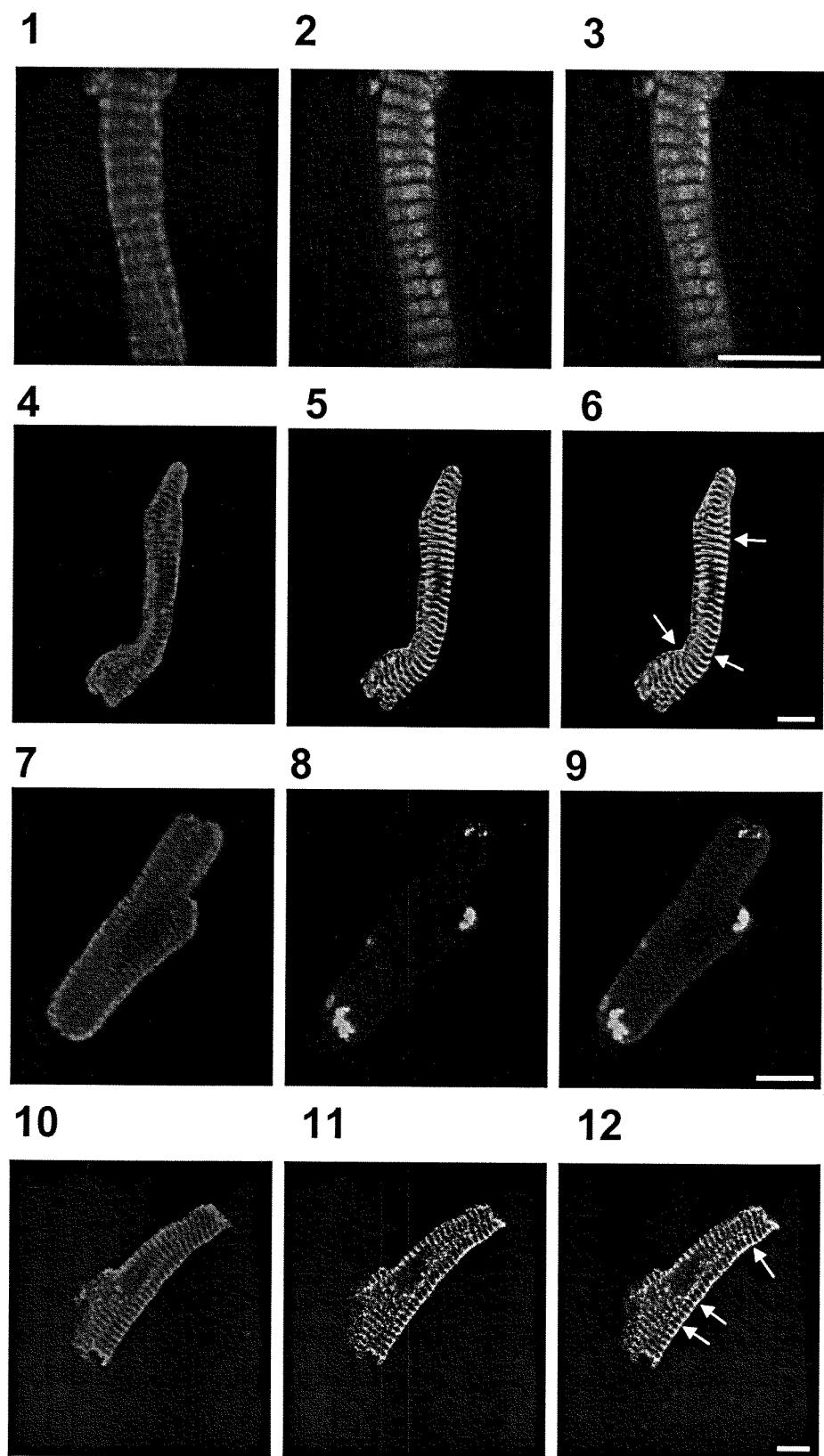


FIG. 1B

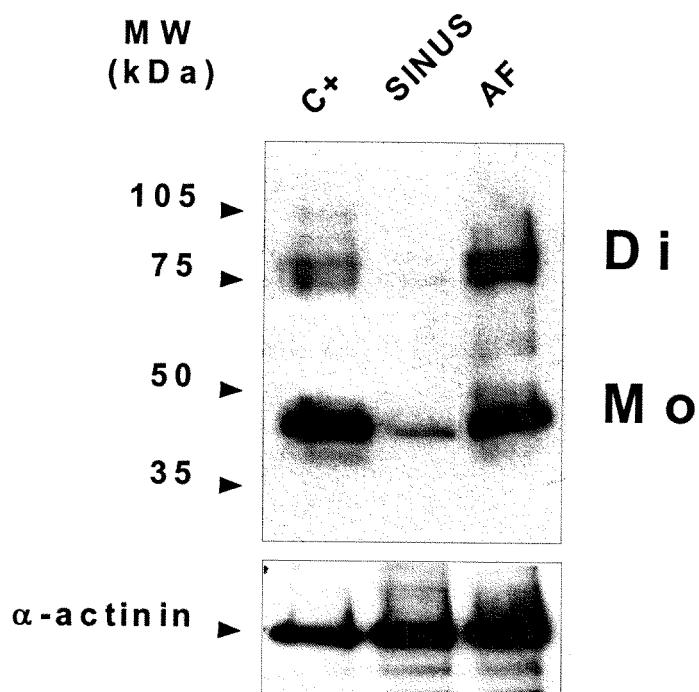


FIG. 1C

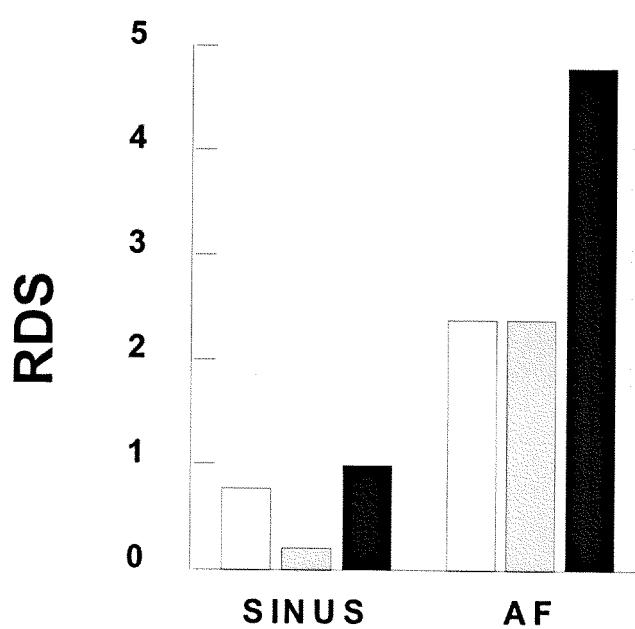


FIG. 2A

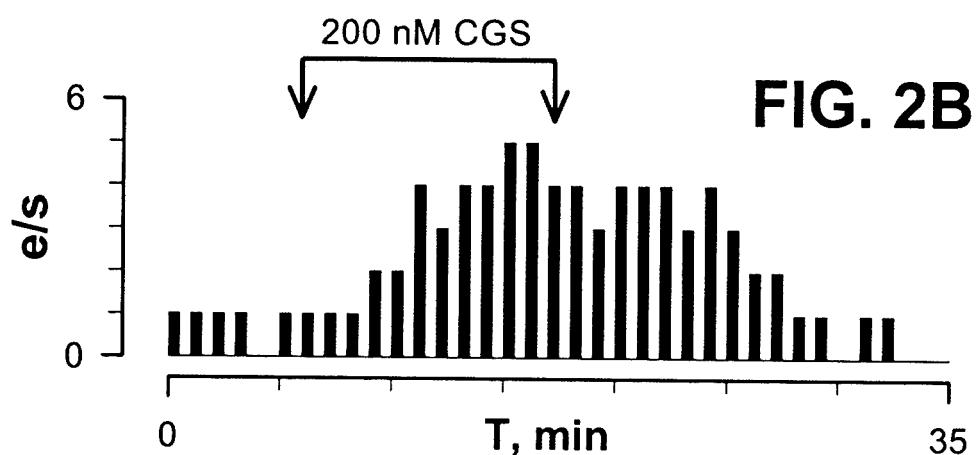
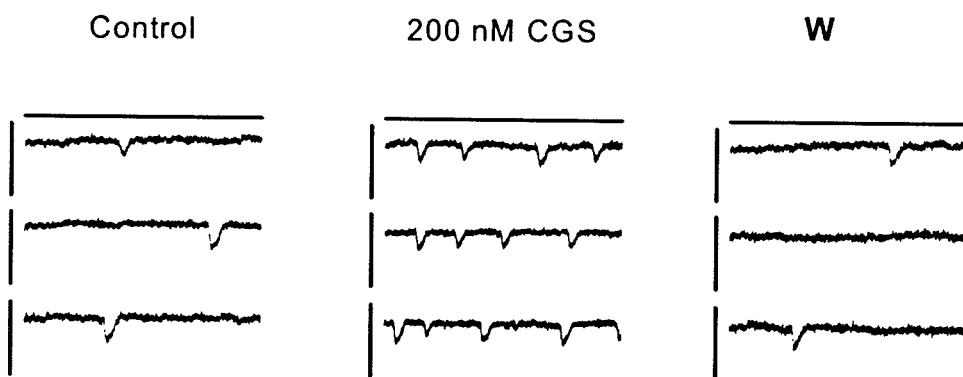
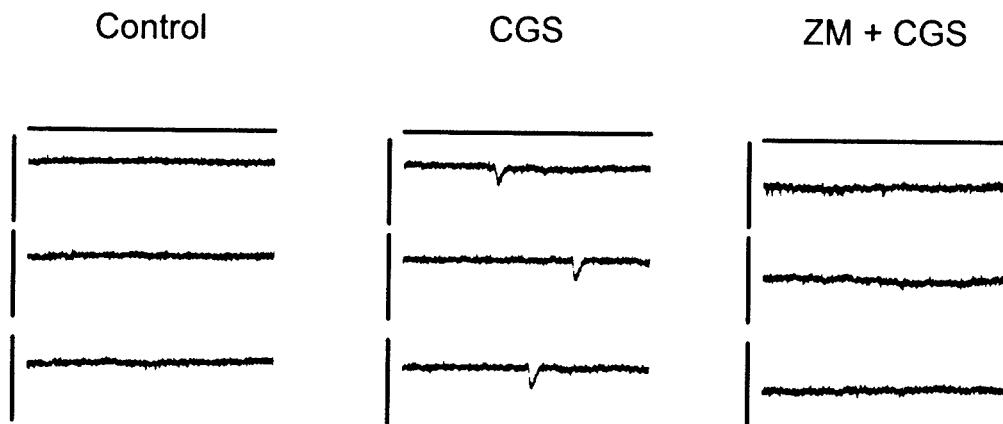


FIG. 2C



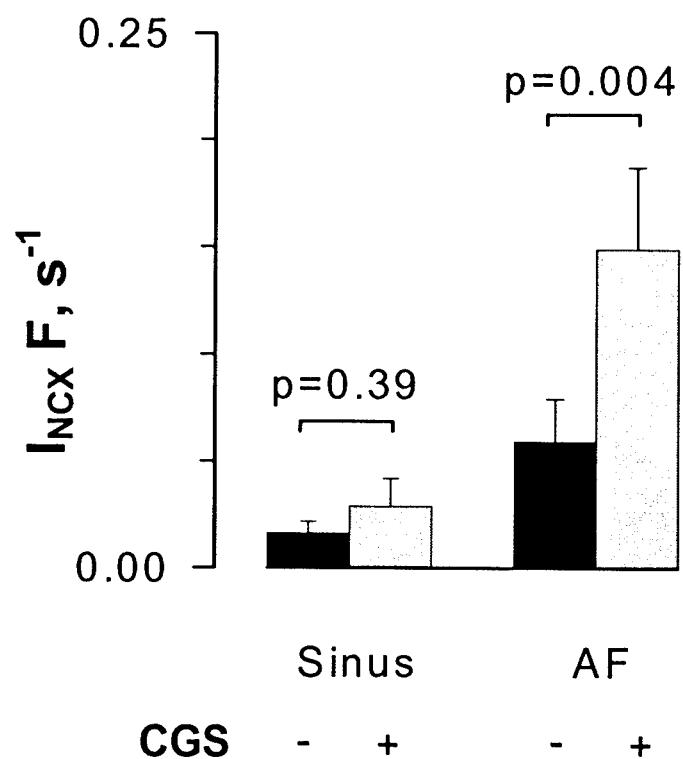
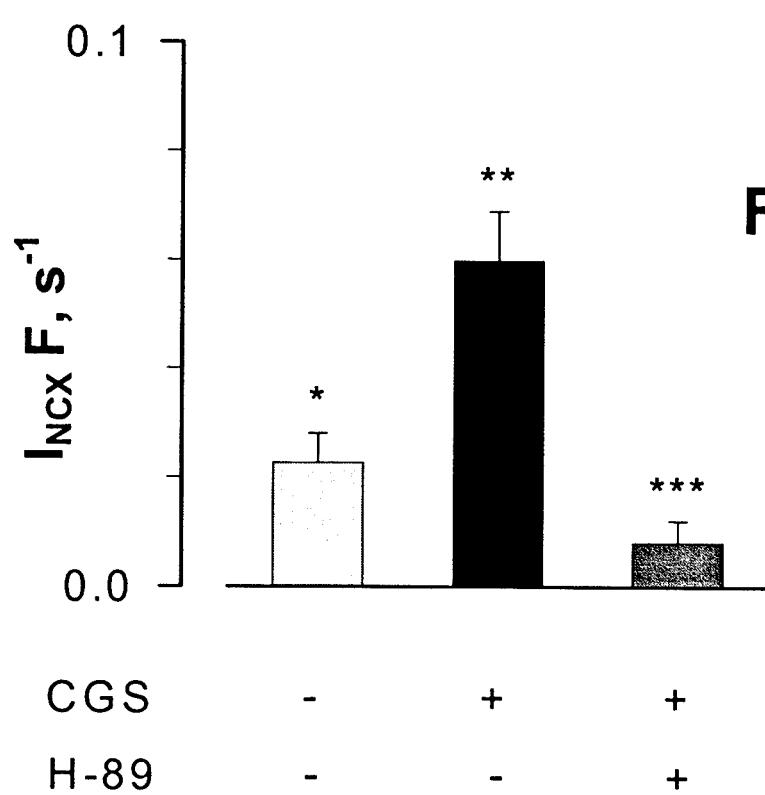
**FIG. 2D****FIG. 2E**

FIG. 3A

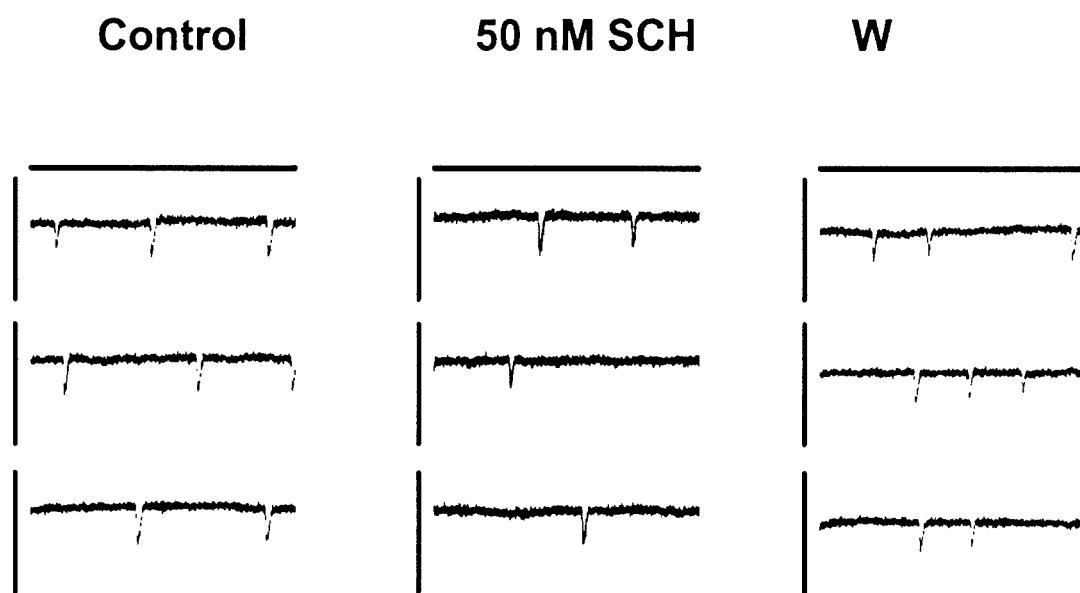
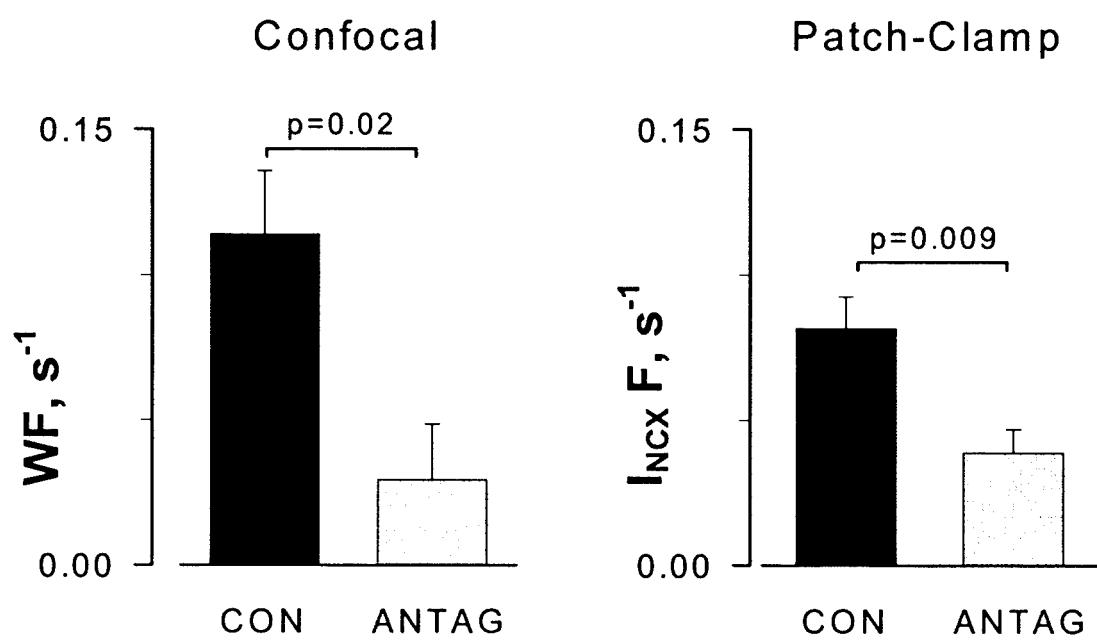


FIG. 3B





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- (11) ES 2 273 599
(21) N° de solicitud: 200502545
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 14.10.2005
(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BERTOLET, B.D et al.: "Myocardial infarction related atrial fibrillation: role of endogenous adenosine". Heart, 1997, vol. 78, páginas 88-90, todo el documento.	1,2
X	US 4772607 A (BADGER et al.) 20.09.1988, columnas 2,3.	1,2
X	US 5998387 A (BELARDINELLI et al.) 07.12.1999, columnas 5,9,10; columna 12, líneas 34-40.	1,2,7
X	WO 0140245 A1 (CV THERAPEUTICS, INC) 07.06.2001, página 6; página 28, líneas 26-31.	1,7
X	US 2003022890 A1 (ATWAL et al.) 30.01.2003, página 10, párrafo 116; reivindicaciones 1,2.	1,7
A	US 2004192698 A1 (BENBOW et al.) 30.09.2004, todo el documento.	1,8,10
A	EP 544444 A1 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 02.06.1993, todo el documento.	1,9,10
A	WO 02055524 A1 (VERNALIS RESEARCH LIMITED) 18.07.2002, todo el documento.	1,10,11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

A: refleja el estado de la técnica

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 21.03.2007	Examinador H. Aylagas Cancio	Página 1/2
--	---------------------------------	---------------

INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 200502545

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 31/522 (2006.01)

A61K 31/498 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

A61K 31/42 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)