



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 234**

51 Int. Cl.:
A61K 31/5365 (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03725415 .8**
96 Fecha de presentación : **16.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1503764**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2005**

54 Título: **Antagonistas del receptor 5-HT₄ para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca.**

30 Prioridad: **16.05.2002 GB 0211230**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2010

73 Titular/es: **Serodus AS.**
Gaustadalléen 21
0349 Oslo, NO

72 Inventor/es: **Levy, Finn, Olav**

74 Agente: **Ruo, Alessandro**

ES 2 339 234 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

Antagonistas del receptor 5-HT₄ para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca.

5 La presente invención se refiere a la insuficiencia cardiaca y en particular al uso de antagonistas del receptor 5-HT₄ para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca y los síntomas asociados con la misma.

10 La insuficiencia cardiaca es una enfermedad que afecta principalmente a las personas mayores, y con una población que está envejeciendo progresivamente, es probable que la prevalencia de esta enfermedad siga aumentando. Por lo tanto, se requieren procedimientos nuevos y mejorados para tratar la insuficiencia cardiaca.

15 Las enfermedades o trastornos cardiacos que se caracterizan en general por la función cardiaca deteriorada, p. ej., insuficiencia cardiaca, afectan a un gran número de personas en todo el mundo y en particular en el mundo occidental. Las enfermedades o trastornos cardiacos son responsables de una peor calidad de vida y muerte prematura en una proporción significativa de los que los padecen. Los trastornos cardiacos se dan en hombres, mujeres y niños de ambos sexos, pero son particularmente prevalentes en hombres y en personas de edad mediana o mayores.

20 La insuficiencia cardiaca se caracteriza por la función cardiaca deteriorada debido a una función de la bomba reducida (disfunción sistólica) o a un llenado reducido (disfunción diastólica). Hay una serie de causas diferentes de la insuficiencia cardiaca, de las cuales la más común en el mundo occidental es la enfermedad arterial coronaria. Otras causas comunes son la miocardiopatía (primaria o secundaria), hipertensión, enfermedades valvulares y defectos congénitos.

25 Aproximadamente el 70% de las insuficiencias cardiacas en el mundo occidental son causadas por la enfermedad arterial coronaria, que normalmente se debe a la aterosclerosis. La aterosclerosis dará como resultado el estrechamiento de los vasos en el corazón, conduciendo a un suministro de sangre inadecuado al miocardio (células musculares). Dichos trastornos cardiacos que implican un suministro de sangre reducido al corazón a veces se denominan con la expresión general "enfermedad cardiaca isquémica". La enfermedad cardiaca isquémica (o miocardiopatía isquémica) es el grupo etiológico principal de la insuficiencia cardiaca en el mundo occidental.

30 Un suministro de sangre reducido al corazón se puede manifestar como angina de pecho (dolor en el pecho), infarto de miocardio agudo (que es el resultado de la oclusión arterial coronaria aguda que produce daño en el miocardio con tejido cicatrizado; dicha zona no puede mantener la función del músculo cardiaco), y a menudo la muerte. Si el suministro de sangre al corazón se reduce durante periodos de semanas a años, o si el miocardio se ha debilitado sustancialmente por infarto con tejido cicatrizado, la función del corazón se volverá más débil con una menor capacidad de bombeo, conduciendo a la manifestación clínica de la insuficiencia cardiaca crónica.

35 La insuficiencia cardiaca congestiva (ICC, de la cual la insuficiencia cardiaca congestiva crónica (ICCC) es un subtipo) se caracteriza por la función del ventrículo izquierdo deteriorada, mayor resistencia vascular periférica y pulmonar y menor tolerancia al ejercicio y disnea. La congestión circulatoria es resultado de la disminución de la capacidad cardiaca o de la retención de sangre en las venas detrás de la izquierda o derecha del corazón.

45 Las formas más comunes de insuficiencia cardiaca que son resultado del daño al corazón a menudo no se pueden curar, pero el tratamiento puede mejorar los síntomas.

50 El tratamiento actual de la insuficiencia cardiaca se basa parcialmente en medidas preventivas tales como el control de la dieta, por ejemplo reducir o excluir la cafeína y el sodio, pérdida de peso y ejercicio. Los medios quirúrgicos se usan en casos más graves, por ejemplo, la cirugía de derivación coronaria que alivia los síntomas aumentando el flujo sanguíneo al corazón, la angioplastia o trasplante coronarios, si el corazón ha perdido una capacidad de bombeo significativa.

55 También se usan los tratamientos con fármacos. Por ejemplo los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) ralentizan el avance de la insuficiencia cardiaca al inhibir la formación de angiotensina y produciendo vasodilatación. También es habitual el uso de otros diuréticos, que alivian la retención de agua en el cuerpo facilitando así la carga de trabajo del corazón. Las preparaciones de digitalis tales como la digoxina también se usan para aumentar la fuerza de las contracciones del corazón.

60 Los betabloqueantes son otro tratamiento usado habitualmente para la insuficiencia cardiaca, solos o en combinación con inhibidores de ACE. El corazón con insuficiencia se activa adrenérgicamente, en contraste con el funcionamiento normal del ventrículo humano en un estado de reposo (Bristow, 2000, *Circulation*, Vol 101, 558-569). El aumento de la función adrenérgica cardiaca parece que daña al corazón con insuficiencia y esto se denomina respuesta mal adaptada. Parece que esta respuesta está asociada con cambios en la composición de los receptores adrenérgicos durante la insuficiencia cardiaca con regulación positiva de los receptores adrenérgicos α_1 y regulación negativa de los receptores β -adrenérgicos. Además, los modelos de ratón que sobreexpresan los receptores adrenérgicos activados presentan miocardiopatía y disfunción sistólica. Por lo tanto, se considera que la señalización adrenérgica crónica es un mecanismo compensatorio dañino en el corazón humano con insuficiencia.

En la etapa final de la insuficiencia cardiaca, 50-60% del potencial de transducción de señales total se pierde. El bloqueo del resto de la capacidad de señalización usando betabloqueantes complementa la estrategia antiadrenérgica endógena del corazón de desensibilización, que se considera que es un cambio adaptativo (Bristow, 2000, *Circulation*, Vol 101, 558-569).

5

Mediante la inhibición del potencial de señalización restante de los receptores adrenérgicos β usando β -bloqueantes, se ha desarrollado y usado con algún éxito un método relativamente eficaz de tratamiento de la insuficiencia cardiaca.

10

Sin embargo, mientras que se han usado β -bloqueantes con éxito relativo, siguen siendo necesarios medicamentos y tratamientos para la enfermedad cardiaca. El tratamiento con β -bloqueantes no es satisfactorio para todos los pacientes, ya que algunos pacientes presentan contraindicaciones al bloqueo β , tal como enfermedad reactiva de las vías respiratorias, nodo sinusal o enfermedad del sistema de conducción con bradicardia. Además, las dosis objetivo requieren la manipulación y gestión cuidadosas para lograr el resultado deseado. Otra desventaja es que algunos individuos no responden al bloqueo β (Bristow, 2000, *Circulation*, Vol 101, 558-569). Las desventajas de los tratamientos conocidos y el aumento de incidencia de la enfermedad cardiaca a medida que aumenta la edad de la población, supone que se necesitan más tratamientos.

15

La presente invención se dirige a esta necesidad y se basa en el descubrimiento sorprendente de que los receptores de 5-HT₄ median una respuesta inotrópica en los músculos papilares cardiacos de rata de corazones con insuficiencia, una respuesta que no se observa en los músculos papilares cardiacos de rata normales. Por lo tanto, parece que se induce una respuesta inotrópica a la serotonina (5-HT) en los ventrículos de los corazones con insuficiencia. Esta observación sorprendente sugiere que esta respuesta inotrópica puede ser un mecanismo compensatorio adicional de mala adaptación en el corazón con insuficiencia. Basándose en esto, se propone una nueva terapia, en particular reducir o prevenir esta respuesta inotrópica a la 5-HT (5-hidroxitriptamina; serotonina) bloqueando los receptores 5-HT₄, p. ej., usando antagonistas de receptores 5-HT₄. Por lo tanto, los autores de la invención proponen un nuevo tratamiento potencial para la insuficiencia cardiaca basado en el uso de antagonistas de receptores 5-HT₄.

20

Se sabe que la 5-HT afecta al sistema nervioso central, el corazón y el tracto gastrointestinal. Los efectos en el corazón incluyen efectos inotrópicos, cronotrópicos y lusitropicos positivos, todos los cuales se han detectado hasta la fecha solo en el tejido auricular humano y no en el tejido ventricular. En el atrio humano, estos efectos son mediados por los receptores 5-HT₄. La activación del receptor 5-HT₄, que es un receptor acoplado a proteína G con 7 dominios transmembranales, produce la estimulación de la actividad de la adenilil-ciclasa, la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc y la fosforilación de proteínas implicadas en el acoplamiento excitación-contracción.

25

La clase de receptores 5-HT₄ es una de las 7 clases conocidas de receptores de 5-HT (5-HT₁₋₇). Todos, excepto uno de los receptores identificados, son receptores acoplados a proteínas G con 7 dominios transmembranales. Algunas de estas clases contiene más de un miembro, codificados por genes separados o por variantes de corte y empalme. El receptor 5-HT₄ tiene al menos 8 variantes de corte y empalme (5-HT_{4(a)}}-5-HT_{4(b)}}). Los estudios preliminares han sugerido que se puede producir la expresión diferencial de estas variantes de corte y empalme en diferentes tejidos, aunque también se ha mostrado que determinados tipos de variantes de corte y empalme pueden coexpresarse en algunos tejidos. La función exacta de las diferentes variantes de corte y empalme no está clara.

30

Estudios previos han identificado las respuestas a la 5-HT en el tejido auricular humano y porcino, que se producen a través del receptor 5-HT₄, que incluyen la mayor frecuencia cardiaca, fuerza contráctil y activación de la relajación. Estos estudios no pudieron demostrar ningún efecto de la 5-HT en los ventrículos humano (Jahnel y col., 1992, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, Vol 346:482-485; Schoemaker y col., *European Journal of Pharmacology*, 1993 Vol 230, 103-105) y porcino (Schoemaker y col., 1992, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 346: 486-489; Lorrain y col. 1992, *Eur. J. Pharmacol.* 229: 105-108; Saxena, 1992, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 346: 629-636). Además, se pensaba que los receptores 5-HT₄ estaban localizados exclusivamente en el atrio (Blondel y col., 1998, *Journal of Neurochemistry* Vol 70(6), 2252-2261, Blondel y col., 1997, *FEBS Letters* Vol. 412, 465-474).

35

Sin embargo, una publicación reciente de Bach y col. (2001, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 363; 146-160) muestra por RT-PCR que el ARNm que codifica los receptores 5-HT₄ es detectable en las 4 cámaras del corazón humano normal. Se mostró la coexpresión de las variantes 5-HT_{4(a)}} y 5-HT_{4(b)}} tanto en la aurícula como en el ventrículo cardiacos. Sin embargo, no se publicaron estudios funcionales de los receptores.

40

Se han propuesto antagonistas del receptor 5-HT₄ (tales como los descritos en el documento WO 93/02677) para usar en el tratamiento de arritmias auriculares y accidente cerebrovascular, además del síndrome del intestino irritable, enfermedad de reflujo gastroesofágico, ansiedad y/o migraña (WO 91/16045, Kaumann 1994 TiPS Vol 15, 451-455). El documento WO 02/11766 describe el uso de un antagonista del receptor 5HT₄ en la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento del remodelado auricular en un mamífero. Rahme y col. 1999 *Circulation* vol. 100, 2010-2017 describen los efectos electrofisiológicos y antiarritmia del antagonista del receptor 5-HT(4) auricular selectivo RS-100302 en el aleteo auricular y la fibrilación. El documento EP1325921 describe compuestos oxo y de oxipiridina como moduladores del receptor 5-HT4 y el documento WO 03/35649 describe compuestos de imidazopiridina como moduladores del receptor 5-HT₄. En *The Merck Manual* 1999 páginas 1682-1693, se discute la insuficiencia cardiaca.

45

50

55

No hay estudios previos que hayan sugerido ninguna implicación o efecto del receptor 5-HT₄ en la insuficiencia cardiaca, o ningún efecto de la insuficiencia cardiaca en este receptor. Como se ha mencionado antes, ahora se ha mostrado sorprendentemente que la potencial respuesta inotrópica (la fuerza de la contracción muscular) a la 5-HT difiere en los músculos papilares del corazón de rata con y sin insuficiencia, y en particular, que sólo los músculos papilares de los corazones de rata con insuficiencia presentan una respuesta a la 5-HT (véase el Ejemplo 1).

Además, los autores de la invención han mostrado sorprendentemente que este efecto inotrópico es mediado por receptores 5-HT₄. La observación de que los receptores 5-HT₄ son funcionales en el músculo cardiaco de rata con insuficiencia, y no en el músculo cardiaco de rata normal, indica que esta inducción y señalización pueden ser un nuevo mecanismo de compensación en la insuficiencia cardiaca. Por la expresión “mecanismo de compensación” se entiende que el corazón se adapta a su capacidad reducida de funcionar, en un intento de compensar el menor bombeo. La adaptación, como en este caso, y en el caso del sistema β -adrenérgico, puede tener forma de una adaptación o cambios inducidos en mecanismos y rutas de señalización. Por lo tanto, el bloqueo de este mecanismo de compensación, por ejemplo, usando un antagonista de receptores 5-HT₄, presenta una modalidad de tratamiento nueva y hasta ahora no prevista para combatir la insuficiencia cardiaca.

El hecho de que los músculos papilares humanos cogidos de pacientes con diferentes tipos de insuficiencia cardiaca también presentan una respuesta inotrópica a la serotonina, que es mediada por receptores 5-HT₄ (Ejemplo 6) confirma que este efecto no está limitado a las ratas.

También se ha mostrado que los niveles de ARNm de 5-HT_{4(b)} son mayores en el ventrículo izquierdo y en el músculo capilar en ratas con ICC.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona el uso de antagonistas del receptor 5-HT₄ en la fabricación de un medicamento para usar en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva.

Los antagonistas del receptor 5-HT₄ se pueden usar en un procedimiento para tratar la insuficiencia cardiaca congestiva en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento administrar un antagonista del receptor 5-HT₄ a dicho mamífero. En particular, se administra una cantidad eficaz de dicho antagonista.

En un aspecto adicional más, la invención también proporciona un antagonista del receptor 5-HT₄, o una composición farmacéutica que contiene dicho antagonista, para usar en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva.

El mecanismo por el que es inducida la respuesta inotrópica a la 5-HT en la insuficiencia cardiaca todavía no se ha elucidado, pero en cualquier caso, no es crítico para el nuevo procedimiento terapéutico propuesto. Sin embargo, aunque sin querer ligarse por la teoría, el mecanismo de inducción de la respuesta inotrópica puede resultar de una activación funcional de receptores inactivos preexistentes por un cambio estructural o topológico, o liberación de la inhibición. Alternativamente, los receptores preexistentes pueden ser transportados a un sitio donde pueden actuar. Alternativamente, el mecanismo puede ser la mayor síntesis, o la inducción, de receptores nuevos por la mayor transcripción o traducción. Por lo tanto, debe entenderse que “inducción” puede referirse a cualquier mecanismo por el que aumenta la actividad de la ruta de señalización del receptor 5-HT₄ comparado con la actividad en un corazón normal (p. ej., sin insuficiencia).

En particular, la “inducción” incluye cualquier mecanismo por el que es inducida o aumentada la respuesta inotrópica mediada por el receptor 5-HT₄. Un “aumento” es preferible o convenientemente un aumento estadísticamente significativo, por ejemplo en un ensayo de la respuesta mediada por el receptor 5-HT₄ como se describe en el Ejemplo 1, o en cualquier otro ensayo de respuesta inotrópica conocido en la materia o descrito en la bibliografía.

La expresión “insuficiencia cardiaca” como se usa en el presente documento, incluye cualquier afección caracterizada por la función cardiaca deteriorada sea debido a una acción reducida de la bomba (disfunción sistólica) o llenado reducido (disfunción diastólica). Más en particular, la insuficiencia cardiaca implica la función deteriorada del miocardio del corazón. La presente invención reivindicada se refiere a la insuficiencia cardiaca congestiva, y en particular a formas crónicas de la insuficiencia cardiaca congestiva (es decir, insuficiencia cardiaca congestiva crónica (ICCc)). Sin embargo, la invención no incluye otras enfermedades o afecciones cardiacas que no entren en la definición general anterior de insuficiencia cardiaca, tales como arritmias auriculares que están excluidas del alcance de esta invención.

La insuficiencia cardiaca se puede definir como un trastorno que puede resultar de cualquier afección que reduce la capacidad del corazón para bombear sangre. A menudo la causa es contractilidad reducida del miocardio que resulta de un flujo sanguíneo coronario disminuido (p. ej., insuficiencia cardiaca causada por enfermedad arterial coronaria (EAC) o enfermedad isquémica coronaria), pero el fracaso del bombeo de cantidades adecuadas de sangre también puede estar causado por daño de las válvulas cardiacas, presión exterior alrededor del corazón, enfermedades musculares cardiacas primarias (p. ej., miocardiopatía dilatada idiopática) o cualquier otra anomalía que hace del corazón una bomba hipoficaz. Como se ha mencionado antes, la insuficiencia cardiaca congestiva está particularmente implicada.

Por lo tanto, está incluida en el alcance de la invención, la insuficiencia cardiaca congestiva debida a enfermedad cardiaca isquémica (miocardiopatía isquémica), en particular enfermedad cardiaca isquémica crónica, miocardiopatía no isquémica crónica incluyendo miocardiopatía dilatada idiopática y cardiopatía debido a la hipertensión.

La insuficiencia cardiaca se puede manifestar de cualquier de dos formas: (1) una disminución de la capacidad cardiaca o (2) por una retención de la sangre en las venas detrás del lado izquierdo o derecho del corazón. El corazón puede fallar como una unidad entera o pueden fallar independientemente entre sí el lado izquierdo o el lado derecho. De cualquier forma, este tipo de insuficiencia cardiaca conduce a una congestión circulatoria y, como resultado se denomina insuficiencia cardiaca congestiva (ICC).

La insuficiencia cardiaca congestiva se puede dividir en 2 fases, ICC aguda (duración corta e inestable) e ICC crónica (larga duración y relativamente estable). Esta división entre las dos es difícil de definir con precisión, pero en general la ICC aguda es la etapa de fallo que ocurre inmediatamente después del daño del corazón (es decir, tiene un inicio rápido y un curso corto) y está asociada con la inestabilidad en la función y circulación cardiacas, por ejemplo, una caída repentina del gasto cardiaco. Si la fase aguda no es grave con resultado de muerte, se activan inmediatamente los reflejos simpáticos del cuerpo y pueden compensar la pérdida repentina de la función cardiaca. Dicha compensación a menudo puede ser tan eficaz y rápida, que es posible que el paciente no note ningún efecto si permanece en calma.

Después de los primeros minutos de un ataque cardiaco agudo, empieza un estado secundario prolongado. Este se caracteriza por una retención de fluido por los riñones y por la recuperación progresiva del corazón a lo largo de un periodo de varias semanas a meses, hasta el punto en el que se estabiliza la afección cardiaca. Esta fase de estabilidad se conoce como ICC crónica. Aunque el corazón se ha estabilizado y compensado, todavía está débil y se puede hacer progresivamente más débil.

Por lo tanto, esto significa que aunque los síntomas varían mucho entre pacientes, los pacientes con ICC crónica tienen de forma característica una función cardiaca reducida. La manifestación más común de la capacidad cardiaca reducida es la disfunción sistólica. Por ejemplo, dichos pacientes presentan una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) reducida comparado con una persona "normal" que no ha padecido insuficiencia cardiaca. En personas normales, la fracción de eyección ventricular izquierda normalmente está por encima de 60%, mientras que una fracción de eyección menor de 40% se caracteriza como disfunción sistólica. Por lo tanto, una FEVI menor de 40% es una característica de la función cardiaca reducida en pacientes con ICC crónica. Menos común que la disfunción sistólica es la disfunción diastólica en la que la fracción de eyección está relativamente conservada (FE ventricular izquierda > 40%) o normal, pero en la que el llenado ventricular izquierdo es menor.

Otras características de la función cardiaca reducida, tales como por ejemplo, una fracción de eyección ventricular derecha reducida, capacidad de ejercicio reducida y variables hemodinámicas deterioradas tales como un menor gasto cardiaco, mayor presión arterial pulmonar y mayor frecuencia cardiaca y presión sanguínea baja, se observan a menudo en pacientes con ICCc.

El sistema de clasificación de The New York Heart Association (NYHA) divide la enfermedad cardiaca en 4 clases, dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Clase I de la NYHA: paciente con enfermedad cardiaca pero sin limitaciones resultantes de actividad física; Clase II: pacientes con enfermedad cardiaca que causa ligeras limitaciones de actividad física. Clase III: pacientes con enfermedad cardiaca que causa notable limitación del rendimiento físico. Están cómodos en reposo. Clase IV: paciente con enfermedad cardiaca que causa incapacidad para llevar a cabo cualquier actividad física sin incomodidad. Los síntomas pueden estar presentes en reposo.

La invención se puede usar para el tratamiento de todas las clases de insuficiencia cardiaca congestiva, pero en particular de las clases II-IV.

Como se ha aludido antes, la insuficiencia cardiaca en general puede ser crónica o aguda. Por lo tanto, mientras que la fase aguda de la insuficiencia cardiaca (por ejemplo ICC) se pasa relativamente rápido, la estabilidad asociada con la fase crónica de la insuficiencia cardiaca (p. ej., ICC) puede tardar meses en desarrollarse. En general, un paciente que presenta síntomas de insuficiencia cardiaca durante más de 3 meses o preferiblemente más de 6 meses, se puede considerar que tiene insuficiencia cardiaca crónica estable, siempre que no se hayan dado síntomas adicionales de insuficiencia cardiaca (p. ej., congestiva) aguda, tales como angina o pruebas de infarto de miocardio, durante este periodo de 3 ó 6 meses.

Como se ha aludido brevemente antes, la insuficiencia cardiaca crónica que se va a tratar de acuerdo con la presente invención puede ser resultado de cualquier causa, p. ej., puede ser resultado de una enfermedad primaria o puede ser secundaria a otra enfermedad. En una realización preferida de la invención, la insuficiencia cardiaca crónica que se va a tratar es secundaria a la miocardiopatía dilatada idiopática (MCDI) y/o enfermedad isquémica coronaria (enfermedad arterial coronaria - EAC).

En particular, en una realización preferida adicional, la insuficiencia cardiaca congestiva que se va a tratar de acuerdo con la invención es la insuficiencia cardiaca postinfarto. En relación con esto, debe señalarse que el modelo de rata usado en el ejemplo 1, 2, 4 y 7, es un modelo de insuficiencia cardiaca postinfarto, causada por ligado arterial coronario, que es un modelo de insuficiencia cardiaca bien caracterizado.

Otros tipos de insuficiencia cardiaca congestiva que se pueden tratar de acuerdo con la invención, incluyen la insuficiencia cardiaca congestiva inducida por una poscarga constantemente aumentada, tal como la insuficiencia cardiaca hipertensiva. También está disponible un modelo de rata para esto, en el que la insuficiencia cardiaca es

inducida por estrechamiento aórtico con banda. Este modelo también se ha usado para mostrar que el efecto mediado por el receptor 5-HT₄ no es específico de la insuficiencia cardiaca postinfarto (véase Ejemplo 5).

La expresión “antagonista del receptor 5-HT₄” como se usa en el presente documento incluye cualquier agente, es decir, cualquier compuesto, sustancia, molécula o composición (o cualquier otro agente) que pueda reducir o prevenir cualquier respuesta, por ejemplo, una respuesta inotrópica a la 5-HT en la insuficiencia cardiaca (es decir, la respuesta (p. ej., respuesta inotrópica) del corazón, o preferiblemente del miocardio): Por lo tanto, el antagonista se puede ver como cualquier agente capaz de inhibir la respuesta inotrópica a la 5-HT, o cualquier otra respuesta fisiológica o biológica a la 5-HT. Esta actividad se puede evaluar fácilmente usando cualquier ensayo de respuesta adecuado, por ejemplo, cualquier ensayo de respuesta inotrópica disponible en la técnica, por ejemplo, como se detalla en el ejemplo 1. Por lo tanto, una inhibición se puede observar como una disminución (p. ej., una disminución significativamente estadística) en la respuesta en cuestión (p. ej., respuesta inotrópica) en presencia del agente, comparado con la respuesta (p. ej., respuesta inotrópica) en ausencia del agente (es decir, antagonista).

Se puede usar cualquier agente conocido en la técnica y/o publicado en la bibliografía como un antagonista de los receptores 5-HT₄ (incluyendo agonistas inversos y agonistas parciales, etc. que pueden funcionar como antagonistas en condiciones particulares, p. ej., dosificaciones/concentraciones etc.).

Por lo tanto, la expresión “antagonista del receptor 5-HT₄” como se usa en el presente documento, incluye cualquier compuesto, molécula, sustancia, agente o composición que atenúe el efecto de la 5-HT en el receptor 5-HT₄. Dicho antagonismo puede ser competitivo o no competitivo. Los antagonistas competitivos se unen al receptor en una región que solapa con el sitio de unión del agonista, evitando así la unión del agonista. El logaritmo negativo de la concentración molar que en el equilibrio ocuparía 50% de los receptores en ausencia del ligando (pK_B) es la medida de la potencia de un antagonista competitivo. Los antagonistas no competitivos se unen a un sitio en los receptores distinto del sitio de unión del agonista y evitan la unión del agonista y/o la activación del receptor por un mecanismo alostérico. Además, los antagonistas pueden ser reversibles o irreversibles. Los antagonistas se pueden identificar fácilmente por su actividad en el receptor 5-HT₄ usando cualquier valoración o sistema de ensayo adecuados, convenientemente cualquier sistema in vitro que use células que expresen receptores 5-HT₄ recombinantes transfectados de forma estable o transitoria o receptores 5-HT₄ endógenos, tales como los descritos por Bach y col. (2001, véase antes).

Habitualmente, los antagonistas de receptores son compuestos orgánicos pequeños y estos representan una clase preferida de antagonistas del receptor 5-HT₄ para usar de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, también se pueden usar otros “compuestos” o “agentes”; y siempre que cumplan el criterio funcional de inhibir una respuesta inotrópica (o cualquier otra) a la 5-HT (p. ej., por bloqueo o inhibición de un receptor 5-HT₄) su naturaleza química o física no es importante. Así, por ejemplo, se pueden usar moléculas de proteínas o peptídicas, que pueden ser naturales o sintéticas, o derivados o modificaciones de moléculas naturales. Una de dichas clases de moléculas de proteína/péptido son los anticuerpos y sus fragmentos o derivados, incluyendo moléculas de tipo anticuerpo sintéticas. Muchas de dichas “moléculas de unión” basadas en anticuerpos son conocidas en la técnica, p. ej., anticuerpos monocatenarios, anticuerpos injertados en CDR, anticuerpos quiméricos, etc. y todas dichas moléculas están incluidas. Alternativamente, se pueden usar otros productos moleculares de presentación u otras bibliotecas (p. ej., combinatorias); la bibliografía describe la síntesis y selección de muchas de dichas moléculas de unión o entidades de unión por dicha presentación u otros procedimientos, y estos se pueden usar, seleccionar para unirse al receptor 5-HT₄.

También están incluidas las sales de dichos compuestos, incluyendo sales tanto orgánicas como inorgánicas (p. ej., con contraiones de metales alcalinos y alcalinotérreos, amonio, etanolamina, dietanolamina, meglumina, cloruro, hidrogenocarbonato, fosfato, sulfato y acetato). Las sales farmacéutica y/o fisiológicamente aceptables adecuadas están bien descritas en la bibliografía farmacéutica. Además, algunas de estas sales pueden formar solvatos con agua o disolventes orgánicos tales como etanol. Dichos disolventes también están incluidos dentro del alcance de esta invención.

Los antagonistas del receptor 5-HT₄ también se pueden preparar como profármacos de acuerdo con los principios conocidos en la técnica (p. ej., como compuestos que liberan o que se convierten en la forma de antagonista activo cuando se administran al paciente).

Los antagonistas del receptor 5-HT₄ son conocidos en la técnica y están descritos en la bibliografía (Clark, R.D. en “5-HT₄ Receptors in the Brain and Periphery”, ed R. Eglen 1998 Springer Verlag and R.G. Landes Company). Se puede usar cualquier de dichos compuestos de acuerdo con la presente invención. Así, por ejemplo, los antagonistas del receptor 5-HT₄ se pueden seleccionar de compuestos que comprenden una estructura de anillo aromático con un aceptor de enlace de hidrógeno como un sustituyente y un aceptor de enlace de hidrógeno como un segundo sustituyente y una amina terciaria separada al menos 3 enlaces del anillo aromático.

Los antagonistas del receptor 5-HT₄ se seleccionan preferiblemente de compuestos que comprenden un anillo aromático al que está unido un grupo carbonilo, y un nitrógeno básico en la cadena lateral adjunta. Preferiblemente hay un átomo de oxígeno adyacente al grupo carbonilo.

Las clases representativas de compuestos adecuados incluyen ésteres de benzoato, amidas de benzoato, imidazoli-piridinas, arilcetonas, indoles, carbazimidamidas, fenilcarbamatos y fenilureas.

Ejemplos adicionales de antagonistas del receptor 5-HT₄ que se podrían usar en la invención, incluyen SB203186, 1H-indol-3-carboxilato de 1-piperidinil-etilo (Parker SG y col. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Dic. 1995; 353 (1): 28-35); GR113808, 1-metil-1H-indol-3-carboxilato de [1-[2-metilsulfonilaminoetil]-4-piperidinil]metilo (Kaumann A.J., *Br. J. Pharmacol.* 1993 Nov; 110(3): 1172-4); SB207710, 8-amino-7-yodo-1,4-benzodioxan-5-carboxilato de (1-butil-4-piperidinil)metilo (Kaumann A.J. y col., *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1994 Mayo; 349(5): 546-8); SDZ205557, (2-metoxi-4-amino-5-cloro)benzoato de 2-dietilaminoetilo (Lorrain J. y col., *Eur. J. Pharmacol.* Dic. 1992, 8; 229(1): 105-8); DAU 6285, endo-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il-2,3-dihidro-6-metoxi-2-oxo-1H-benzimidazol-1-carboxilato (Torres GE y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Oct. 1994; 271(1): 255-61); RS39604, hidrocloreuro de 1-[4-amino-5-cloro-2-(3,5-dimetoxibenciloxi)fenil]-3-[1-[2-[(metilsulfonil)amino]etil]-4-piperidinil]-1-propanona (Leung E y col., *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Jul. 1996; 354(2): 145-56); SB204070, 8-amino-7-cloro-1,4-benzodioxano-5-carboxilato de (1-n-butil-4-piperidinil)metilo (Leung E. y col., véase antes); SB207266, hidrocloreuro de N-[(1-butil-4-piperidiri-il)-metil]-3,4-dihidro-2H-[1,3]oxazino[3,2-a]indol-10-carboxamida (Gaster LM y col., *J. Med. Chem.* 24 Nov. 1995; 38(24): 4760-3); SB205008, yoduro de 8-amino-7-cloro-1,4-benzodioxan-5-carboxilato de (1-butil-1-metil-4-piperidinil)metilo (McLean PG y Coupar IM., *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Agosto 1995; 352(2): 132-40); hidrocloreuro de (8-amino-7-cloro-1,4-benzodioxano-5-carboxilato de 1-butil-4-piperidinil)metilo (Gaster L.M. y col., *J. Med. Chem.*, 10 Dic. 1993; 36(25): 4121-3); N-3389, (dihidrocloreuro de endo-3,9-dimetil-3,9-diazabicyclo[3.3.1]non-7-il-1H-indazol-3-carboxamida) (Hagihara K y col., *Eur. J. Pharmacol.*, 12 Dic. 1994; 271(1): 159-66); FK1052, [hidrocloreuro de (+)-8,9-dihidro-10-metil-7-[(5-metil-4-imidazolil)metil]pirido-[1,2-a]-indol-6(7H)-ona] (Kadowaki M y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Jul 1993; 266 (1): 74-80); ML10375, 4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoato de 2-(cis-3,5-dimetilpiperidino)etilo (Blondel O. y col., *Br. J. Pharmacol.* Oct. 1998; 125(4): 595-7); RS-23597-190, [hidrocloreuro de 4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoato de 3-(piperidina-1-il)propilo] (Bonhaus DW. y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Oct 1994; 271(1): 484-93); GR125487, (5-fluoro-2-metoxi-1H-indol-3-carboxilato de 1-[2-[(metilsulfonil)amino]etil]-4-piperidinil-metilo) (Gale y col., 1994 *Br. J. Pharmacol.*, 113, 120P); ácido (3- α -tropanil)-1H-indazol-3-carboxílico (WO91/16045); ICS205-930 (tropisetron) (Dumuis A. y col. (1998), *Eur. J. Pharmacology* 146, 187-188); R50595 (FR76530) (Meulemans AL y Schuurkes JA. (1992), *Eur. J. Pharmacol.* 212(1):51-9); RS100235 (Clark R.D. y col. (1995) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; 5; 2119-2122); RS100302 (Rahme y col., 1999, *Circulation* 100(9): 1942-4); LY353433, 1-(1-metiletil)-N-[2-[4-[tricyclo [3.3.1.1(3,7)]dec-1-ilcarbonil)amino]-1-piperidinil]etil-1H-indazol-3-carboxamida, (Cohen M.L. y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; 277(1): 97-104); RO116-0086, sal de hidrocloreuro del éster de 1-butil-piperidin-4-ilmetilo del ácido 2,3-dihidrobenczo[1,4]dioxina-5-carboxílico, (Joubert L. y col., *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 2250); RO116-1148 (sal de hidrocloreuro de la 1-butil-piperidin-4-ilmetilamida del ácido 2,3-dihidrobenczo[1,4]-dioxina-5-carboxílico) Joubert y col. 2002, véase antes) A-85380 (WO94/08994); SB205800 (*Drug Data Report* (1993) 15 10:949); SB207058 (*Exp. Opin. Invest. Drugs* (1994) 3 (7):767); SB 207226 (Marketletter 22-1 en 22-18 (1995)); SC-53606 (Yang DC y col. (1993) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 266(3): 1339-47); SC 56184 (R&D Focus (1993) 2(37)10).

35

Sin embargo, se pueden usar otros antagonistas del receptor 5-HT₄.

Los antagonistas de receptor 5-HT₄ se describen además en los siguientes documentos de patentes: WO 91/16045, WO 93/02677, WO 93/18036, WO 93/05040, WO 93/03725, WO 93/05038, PCT/EP93/03054, PCT/GB93/01895, PCT/EP93/02808, PCT/GB93/02028, PCT/EP93/02775, PCT/EP93/02809, PCT/GB93/02130, PCT/GB94/00172 (todos de Smith Kline Beecham plc), EP-A-501322 (Glaxo), US 6.331.401 (Synaptic Pharmaceutical Corporation), US 20020128172 (GlaxoSmithKline), US 20030045452 (GlaxoSmith Kline), US20020019386 (GlaxoSmithKline), EP-A-322973 (GlaxoSmithKline), EP-A-18002 (Sandoz Limited), US 5,872,134 (Smith Kline Beecham), EP-A-387431 (Beecham Group plc), EP-A-201165 (Beecham Group plc), EP-A-201165 (Beecham Group plc), EP-A-234872 (Adria), US 4.859.683 (Rorer), EP-A-307172 (Lilly), US 6.127.379 (Smith Kline Beecham), US 6.002.009 (Boehringer Ingelheim), US 5.929.089 (Synthelabo) y US 5.726.187 (Smith Kline Beecham).

Por definición, como se ha explicado antes, los antagonistas del receptor 5-HT₄ inhibirán cualquier acción de la 5-HT mediada por el receptor 5-HT₄ en el corazón con insuficiencia. El antagonista puede así, por ejemplo, inhibir todas las acciones mediadas por el receptor 5-HT₄. Por inhibición se entiende que se reduce la respuesta a la 5-HT, por ejemplo la respuesta inotrópica, cuando se compara con un individuo no tratado. Esta reducción incluye cualquier disminución medible en una respuesta a la 5-HT (p. ej., la respuesta inotrópica ventricular) en un individuo, cuando se compara con la respuesta a la 5-HT (p. ej., la respuesta inotrópica ventricular) en un individuo cuando se considera con anterioridad, antes del tratamiento. La disminución medible será preferiblemente estadísticamente significativa. Más preferiblemente, la disminución medible será tal que la respuesta a la 5-HT (p. ej., la respuesta inotrópica ventricular) es inhibida sustancialmente por el antagonista del receptor 5-HT₄. Más preferiblemente, la respuesta se bloquea. Por bloqueo se entiende que no se detecta respuesta medible (p. ej., la respuesta inotrópica ventricular) a la 5-HT en presencia del antagonista del receptor 5-HT₄.

60 En especial, preferiblemente la disminución estará asociada con la capacidad cardiaca mejorada del paciente.

La capacidad cardiaca se puede evaluar de acuerdo con procedimientos y prácticas conocidos en la materia.

65 Dada la naturaleza de la mayoría de las formas de enfermedad cardiaca, no se espera que el "tratamiento" de acuerdo con la presente invención de como resultado la cura completa de la insuficiencia cardiaca en cuestión. Más bien, el "tratamiento" de acuerdo con la presente invención incluye una mejora o alivio de cualquiera de los síntomas asociados con la insuficiencia cardiaca y también una mejor calidad de vida para el paciente, y finalmente una vida prolongada y mayor supervivencia. El "tratamiento" de acuerdo con la presente invención también incluye una mejora

o aumento de la funcionalidad del corazón, o en otras palabras, una mejora o aumento de la función o capacidad cardíaca. En particular, el tratamiento de acuerdo con la presente invención puede dar como resultado una mejora o aumento de uno cualquiera o más de los síntomas y parámetros funcionales asociados con pacientes con insuficiencia cardíaca y en particular los siguientes síntomas y parámetros del paciente.

El primer síntoma y parámetro asociado con la función cardíaca mejorada en los pacientes con insuficiencia cardíaca es un aumento de la fracción de eyección ventricular y en particular de la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI). Esta se puede evaluar por procedimientos estándar conocidos y documentados en la materia, por ejemplo por ecocardiografía, ventriculografía con radionucleidos de compuerta sincronizada con ECG (barrido MUGA), angiografía o por imágenes por resonancia magnética (RM), y normalmente se llevan a cabo cuando el sujeto está en reposo. Se ha encontrado una mejora de la FEVI asociada con mayor supervivencia entre los pacientes con ICC (Cintran y col., 1993, *Circulation* Vol 87, Suplemento VI, 17-23). Por lo tanto, este es un parámetro importante y ventajoso para mejorar en los sujetos tratados de acuerdo con la presente invención. La FEVI también se puede aumentar.

Aunque una mejora de la FEVI es particularmente importante para la mejora general de la función cardíaca, se puede mejorar una serie de otros parámetros asociados con la capacidad cardíaca, de acuerdo con la presente invención. Uno de estos es una mejora significativa del estado clínico general y por lo tanto del rendimiento clínico evaluado por la clase funcional de NYHA. En otras palabras, la clase funcional de NYHA de un paciente se puede reducir después de tratamiento con antagonistas de 5-HT₄ de acuerdo con la presente invención. Dicha evaluación clínica normalmente la puede llevar a cabo un cardiólogo experimentado.

También se puede ver una mejora en la capacidad de ejercicio de los pacientes, medido por el consumo de oxígeno máximo y la carga de trabajo máxima. Como se ha indicado antes, una disminución de la capacidad de ejercicio es un inconveniente y un síntoma potencialmente debilitante de muchos pacientes con insuficiencia cardíaca. Los procedimientos para medir la capacidad de ejercicio son conocidos y están bien documentados en la materia. Por ejemplo, la prueba de ejercicio se puede realizar usando una bicicleta con ergómetro con frenado eléctrico. Un protocolo ilustrativo puede consistir en una velocidad de trabajo inicial de 20 W que aumenta 20 W cada segundo minuto hasta el agotamiento (definido como la incapacidad para mantener la velocidad de pedaleo constante a 60 rpm). El consumo de oxígeno (VO₂) se puede medir usando por ejemplo el sistema EOS/SPRINT. El VO₂ máximo se toma como el VO₂ más alto observado.

Además, también se pueden observar diferentes mejoras en el estado hemodinámico y variables ecocardiográficas. Estas también son indicativas de la función cardíaca mejorada. Por ejemplo, se puede observar una disminución significativa de la presión capilar pulmonar en cuña y de la presión arterial pulmonar, junto con un aumento de la frecuencia cardíaca máxima, presión sanguínea sistólica máxima y tiempo de deceleración de la velocidad mitral. Las variables ecocardiográficas se pueden medir convenientemente por ecocardiografía realizada por un cardiólogo experimentado y las variables hemodinámicas se pueden evaluar convenientemente por cateterización del lado derecho del corazón por técnicas estándar.

Otra variable importante que se puede evaluar es el nivel en el plasma de Nt-proANP. Un aumento o un nivel generalmente alto de Nt-proANP se ha reconocido como un marcador de la disfunción cardíaca. Además, se ha mostrado en el pasado que los niveles de Nt-proANP se correlacionan con presiones arteriales pulmonares en la ICC y proporcionan información de pronóstico importante en pacientes con ICC (Gottlieb y col., *J. Am. Coll. Cardiol.* 1989; 13; 1534-1539). Los niveles de Nt-proANP en una muestra de sangre se pueden medir de una serie de formas conocidas y documentadas en la materia, por ejemplo por radioinmunoensayo. Antes del inmunoensayo, se separa el plasma de una muestra de sangre tomada de un paciente, de nuevo por procedimientos bien conocidos y documentados en la materia.

La “mejora” o “aumento” descritos antes de los síntomas y parámetros, incluye cualquier mejora o aumento medibles cuando el parámetro en cuestión se compara con el parámetro equivalente en un individuo no tratado o cuando el parámetro en cuestión se compara con el parámetro equivalente en el mismo individuo tomado con anterioridad (p. ej., comparación con un nivel “inicial”). Preferiblemente, la mejora o aumento será estadísticamente significativo. En especial, preferiblemente la mejora o aumento de los síntomas y parámetros estará asociada con la mejora de la salud del paciente considerado y más preferiblemente con una supervivencia prolongada.

Los procedimientos para determinar la significancia estadística de las diferencias de los parámetros, son bien conocidos y están documentados en la materia. Por ejemplo, en el presente documento un parámetro se considera en general como significativo si una comparación estadística usando un ensayo de significancia de doble cola tal como un ensayo t de Student o ensayo U de suma de rangos de Mann-Whitney muestran un valor de probabilidad <0,05.

Los antagonistas del receptor 5-HT₄ se podrían usar en la mejora de la función cardíaca, en particular de la función cardíaca en la insuficiencia cardíaca.

Los antagonistas del receptor 5-HT₄ se podrían usar también para aumentar la función ventricular, en particular la función ventricular izquierda (p. ej., la FEVI), más en particular en la insuficiencia cardíaca.

Los antagonistas del receptor 5-HT₄ de acuerdo con la presente invención pueden dar como resultado la reducción de los niveles de Nt-proANP en el plasma. Como se ha mencionado antes, una reducción de los niveles en el plasma

ES 2 339 234 T3

de Nt-proANP es un indicador de la función y capacidad cardiacas mejoradas. La “reducción” como se usa en el presente documento incluye cualquier reducción medible cuando el parámetro en cuestión se compara con el parámetro equivalente en un individuo no tratado, o cuando el parámetro en cuestión se compara con el parámetro equivalente en el mismo individuo tomado anteriormente (p. ej., comparación con un nivel “inicial”). Preferiblemente, la reducción es estadísticamente significativa como se ha discutido antes. En especial, preferiblemente la reducción de los niveles de Nt-proANP estará asociada con una mejor sensación de salud en el paciente considerado y más preferiblemente una supervivencia prolongada.

Un procedimiento para mejorar la función cardiaca en un mamífero (por ejemplo, un mamífero con insuficiencia cardiaca) puede comprender administrar a dicho mamífero una cantidad farmacéuticamente eficaz de un antagonista del receptor 5-HT₄.

Los usos y procedimientos antes descritos se llevan a cabo en general en mamíferos. Se puede tratar cualquier mamífero, por ejemplo seres humanos y cualquier animal de ganadería o doméstico, por ejemplo, ratones, ratas, cerdos, gatos, perros, ovejas, conejos, caballos, vacas o monos. Sin embargo, preferiblemente los mamíferos son seres humanos.

El antagonista del receptor 5-HT₄ se formula convenientemente en una composición farmacéutica para usar de acuerdo con la presente invención. Una composición farmacéutica para usar para combatir la insuficiencia cardiaca puede comprender un antagonista del receptor 5-HT₄ junto con al menos un vehículo diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El contenido adecuado de principio activo en dichas composiciones se puede determinar de acuerdo con principios y procedimientos rutinarios en la materia y lo puede determinar el médico experto. Así, por ejemplo, el principio activo en dichas composiciones puede comprender de 0,05% a 99% en peso de la formulación, por ejemplo de 0,1% a 1,0% o alrededor de 0,5%. La concentración del principio activo en la formulación dependerá del tipo de formulación. Por ejemplo, los productos enterales (p. ej., comprimidos y cápsulas) pueden tener típicamente de 5% a 50% en peso de principios activos, mientras que las formulaciones parenterales normalmente tendrán una concentración más baja del compuesto activo, p. ej., de 0,1% a 3% en peso de principio activo, por ejemplo en una disolución para inyección.

Por “farmacéuticamente aceptable” se entiende que los ingredientes pueden ser compatibles con otros ingredientes de la composición, así como fisiológicamente aceptables para el receptor.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de acuerdo con cualquiera de los procedimientos convencionales conocidos en la materia y ampliamente descritos en la bibliografía. Por lo tanto, el principio activo (es decir, antagonista del receptor 5-HT₄) se puede incorporar, opcionalmente junto con otras sustancias activas, con uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes convencionales, para producir preparaciones galénicas convencionales, que son adecuadas o que se pueden hacer adecuadas para la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa o cualquier otra administración, tal como polvos, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, pomadas, disoluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles, y similares. La composición farmacéutica que comprende el antagonista del receptor 5-HT₄ se puede preparar en una forma adecuada para la infusión o inyección en un paciente. Dicha infusión o inyección es preferiblemente intravenosa (i.v.) pero también se puede dar por vía subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.).

Preferiblemente, las composiciones se pueden proporcionar en una forma adaptada para la administración oral o parenteral. Por lo tanto, las formas farmacéuticas alternativas incluyen comprimidos simples o recubiertos, cápsulas, suspensiones y disoluciones que contienen el componente activo opcionalmente junto con uno o más vehículos y/o diluyentes inertes convencionales.

Los ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados son lactosa, dextrosa, sacarosa, maltosa, glucosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua/jarabe, agua, agua/etanol, agua/glicol, agua/polietileno, glicol, propilenglicol, metilcelulosa, hidroxibenzoatos de metilo, hidroxibenzoatos de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral o sustancias grasas tales como grasa dura o mezclas adecuadas de los mismos. Las composiciones pueden incluir además agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agentes de sabor y similares. Las composiciones de la invención se pueden formular para proporcionar la liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración al paciente, usando procedimientos conocidos en la materia.

También se pueden usar agentes solubilizantes y/o estabilizantes, p. ej., ciclodextrinas (CD) α , β , γ y ciclodextrina HP- β .

Las dosis adecuadas variarán de un paciente a otro y las puede determinar el médico de acuerdo con el peso, edad y sexo del paciente, modo de administración y la gravedad de la afección, y también en antagonista particular usado para el tratamiento. Las dosis unitarias de ejemplo para la administración oral contienen de 1 a 250 mg (y para la administración parenteral contienen preferiblemente de 0,1 a 50 mg) del principio activo. La dosis diaria para la administración oral normalmente está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg/día, más habitualmente de 0,1 a 5 mg/kg/día, por ejemplo de 0,1 a 2 mg/kg/día. Por ejemplo, un adulto de 70 kg recibiría una dosis diaria de 1

a 700 mg o de 0,7 a 700 mg, más habitualmente de 1 a 350 mg o de 7 a 350 mg, por ejemplo de 7 a 140 mg. Para la administración intravenosa o intramuscular, las dosis pueden estar entre 0,1 mg y 100 mg, preferiblemente entre 0,1 mg y 25 mg, administrándose el compuesto de 1 a 4 veces al día.

5 Las mejoras vistas en los pacientes tratados de acuerdo con la presente invención pueden ser inmediatas (p. ej., después de algunos días) o se pueden ver después de algunas semanas o algunos meses, dependiendo del paciente individual. Una vez vista la mejora inicial, también se puede producir la mejora continuada a lo largo de las siguientes semanas y meses. Como se ha indicado antes, el tratamiento se puede continuar tanto tiempo como se desee o sea necesario.

10 El uso de un antagonista del receptor 5-HT₄ de acuerdo con la presente invención puede ser en lugar de o preferiblemente además de (es decir, combinado con) el uso de otros fármacos para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca. Se pueden incluir otros fármacos conocidos para tratar la insuficiencia cardiaca en las composiciones farmacéuticas descritas antes o se pueden administrar por separado, de una forma adecuada para el fármaco considerado.

15 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un producto que comprende (a) un antagonista del receptor 5-HT₄ y (b) un segundo fármaco (p. ej., un segundo agente eficaz para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva) en forma de una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva.

20 Los antagonistas del receptor 5-HT₄ adecuados se han definido antes. Los segundos fármacos o agentes adecuados son conocidos y están documentados en la materia e incluyen fármacos conocidos para usar en el tratamiento de trastornos cardiacos, por ejemplo, diuréticos, vasodilatadores, fármacos inotrópicos tales como digoxina, o se pueden usar otros compuestos tales como anticoagulantes, β -bloqueantes, bloqueantes de la angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o antagonistas de aldosterona, como se ha discutido antes.

Una combinación particularmente ventajosa del antagonista del receptor 5-HT₄ es con β -bloqueantes.

30 La invención se describirá además con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes con referencia a los siguientes dibujos, en los que:

la fig. 1 muestra el efecto inotrópico de la serotonina en ratas con insuficiencia cardiaca. Registro en papel original de un músculo papilar de una rata con insuficiencia cardiaca crónica representativa. La serotonina (10 μ mol/l) inducía una respuesta inotrópica positiva en presencia de atropina, timolol y prazosina. Inserto: desarrollo de la respuesta inotrópica, expresada como F_{\max} en porcentaje de la respuesta máxima individual, en músculos papilares con insuficiencia cardiaca crónica, seguido de la adición de serotonina hasta 10 μ mol/l. La barra de error horizontal representa tiempo \pm ETM a 50% de respuestas relativas. Este tiempo necesario para alcanzar cada percentil es el valor medio de 10 músculos papilares;

40 la fig. 2 muestra la respuesta inotrópica a la serotonina (10 μ mol/l) y a la isoprenalina (100 μ mol/l) en músculos papilares de ratas con insuficiencia cardiaca crónica y ratas con simulación de operación. a) Aumento del desarrollo de la fuerza expresado como porcentaje por encima del control. b) Ejemplos representativos de registros sencillos de ciclos de contracción-relajación en un músculo papilar expuesto a la serotonina y a la isoprenalina. La figura muestra contracciones representativas antes de adición de agonista ($_$), en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima a la serotonina 10 μ mol/l ($---$) y en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima a la isoprenalina 100 μ mol/l ($...$). Ordenadas: Desarrollo de la tensión en unidades arbitrarias. Abscisas: Tiempo después de iniciar el estímulo;

50 la fig. 3 muestra la inversión de la respuesta inotrópica a la serotonina por estimulación colinérgica. La figura muestra el aumento de la fuerza contráctil expresada como porcentaje por encima del control en músculos papilares de ratas con insuficiencia cardiaca crónica en respuesta a la adición acumulativa de serotonina (5-HT) 10 μ mol/l, carbachol (CCh) 30 μ mol/l y atropina (Atropina) 1 μ mol/l. Obsérvese que el carbachol invertía y la atropina restauraba la respuesta inotrópica a la serotonina.

55 la fig. 4 muestra la inversión de la respuesta inotrópica a la serotonina por el antagonista selectivo de 5-HT₄ GR113808. La figura muestra ciclos de contracción-relajación representativos en un músculo papilar de una rata con insuficiencia cardiaca crónica antes de añadir el agonista ($_$), en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima a la serotonina 10 μ mol/l ($...$) y siguiente inversión por GR113808 1 μ mol/l ($---$). Ordenadas: Desarrollo de la tensión en unidades arbitrarias. Abscisas: Tiempo después de iniciar el estímulo;

60 la fig. 5 muestra que la falta de efecto de la ketanserina elimina la implicación de los receptores 5-HT_{2A}. Curvas de concentración-respuesta para la serotonina en músculos papilares de ratas con insuficiencia cardiaca crónica en ausencia y presencia de ketanserina 0,1 μ mol/l. La respuesta inotrópica se midió como dF/dt y se expresa en porcentaje del máximo en cada experimento. La concentración de serotonina necesaria para alcanzar cada percentil se calculó en cada experimento de acuerdo con Ariens y Simonis (1964, *Molecular Pharmacology*, Vol. 1, New York, Academic Press, 119) y se representan los valores medios. Las barras de error horizontal representan el ETM de los valores de pCE₅₀.

ES 2 339 234 T3

la fig. 6 muestra que la alta afinidad de GR113808 confirma la implicación de los receptores 5-HT₄. Curvas de concentración-respuesta para la serotonina en músculos papilares de ratas con insuficiencia cardiaca crónica en ausencia y presencia de GR113808 0,5 nmol/l. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de ketanserina 0,1 μmol/l y los datos se analizaron y expresaron como en la figura 5;

la fig. 7 muestra la expresión de ARNm de 5-HT_{4(b)}, 5-HT_{2A} y ANP en el ventrículo izquierdo y músculo papilar de ratas con ICC y con tratamiento de simulación. El ARN mensajero del receptor 5-HT_{4(b)} (paneles superiores), receptor 5-HT_{2A} (paneles medios) y ANP (paneles inferiores) se cuantificó y se normalizó con respecto a GAPDH. *ICC frente a Simulación p<0,01, **ICC frente a Simulación p<0,05;

la fig. 8 muestra la relación entre la respuesta inotrópica máxima a la serotonina 10 μM en el músculo papilar y el tamaño del infarto (A) y los niveles de ARNm de 5-HT₄, 5-HT_{2A} y ANP en tejido de ventrículo izquierdo no infartado en relación con el tamaño del infarto (B);

la fig. 9 muestra las curvas de concentración-respuesta para la serotonina en músculos papilares de ratas, 6 semanas después de infarto de miocardio en ausencia y presencia de SB203186 5 nM o RS39604 5 nM. La respuesta inotrópica (dF/dt) se expresa en porcentaje del máximo para cada músculo papilar.

La fig. 10 muestra ciclos de contracción-relajación medios representativos en un músculo papilar de corazón de una rata con ICC, 6 semanas después de estrechamiento aórtico con banda y antes de la adición de agonista, en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima a la serotonina 10 μM, seguido de inversión de la respuesta a la serotonina con GR113808 1 μM y en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima al isoproterenol 100 μM;

la fig. 11 muestra ciclos de contracción-relajación medios representativos en un músculo trabecular de un corazón humano explantado antes de la adición de agonista, en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima a la serotonina 10 μM, seguido de inversión de la respuesta a la serotonina con GR113808 1 μM y en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima al isoproterenol 100 μM;

la fig. 12 muestra ciclos de contracción-relajación medios representativos en un músculo trabecular de un corazón humano explantado antes de la adición de agonista, en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima a la serotonina 10 μM, seguido de inversión de la respuesta a la serotonina con GR113808 1 μM y en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima al isoproterenol 100 μM;

la fig. 13 muestra la respuesta inotrópica máxima a la estimulación del receptor β-adrenérgico en ratas con ICC tratadas durante 6 semanas con SB207266 o placebo.

Ejemplo 1

Animales

Los animales se cuidaron de acuerdo con el Acta de Bienestar Animal Noruega que está conforme con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de la Salud de EE.UU. (publicación NIH n° 85-23, revisada 1996). Se pusieron 2 ratas en cada jaula y se alojaron en una habitación de temperatura regulada con un ciclo de 12 h de día/12 h de noche, y se les dejó acceso libre a agua y alimento.

Modelo de insuficiencia cardiaca por inducción de infarto de miocardio

Ratas macho Wistar (Møllegaard Breeding and Research Centre, Skensved, Dinamarca), que pesaban aproximadamente 320 g, se intubaron y se ventilaron con N₂O al 68%, O₂ al 29% e isoflurano al 2-3% (Abbot Laboratories, EE.UU.). Se indujo un infarto de miocardio (IM) extenso mediante la ligación proximal de la arteria coronaria izquierda. Seis semanas después las ratas se anestesiaron y ventilaron en el respirador con isoflurano al 2,2%. Se midieron las presiones ventriculares izquierda (Sjaastad y col., 2000, *J. Appl. Physiol.*, 89: 1445-1454), y las ratas con insuficiencia cardiaca crónica se incluyeron en el estudio si la presión diastólica final ventricular izquierda (PDFVI) era > 15 mm de Hg. Típicamente, el infarto comprendía la mayor parte de la pared libre ventricular izquierda y también se extendía al ápice y base del músculo papilar. El ecocardiograma ha demostrado previamente varias funciones miocárdicas gravemente deprimidas (Sjaastad y col. 200, véase antes). Los animales de simulación de operación (Simulación) se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico pero no se ligó la arteria coronaria.

Músculos papilares aislados

Se aislaron los corazones de los animales anestesiados (véase antes) y se diseccionaron con cuidado del tejido conjuntivo y se transfirieron a NaCl al 0,9% enfriado con hielo y se pesaron. La aorta se canuló y las arterias coronarias se perfundieron a 31°C con una disolución relajante que contenía (mmol/l): NaCl 118,3; KCl 3,0; CaCl₂ 0,5; MgSO₄ 4,0; KH₂PO₄ 2,4; NaHCO₃ 24,9; glucosa 10,0; manitol 2,2 y se equilibraron con O₂ al 95%/CO₂ al 5% a 31°C (pH 7,4). Se ligó el músculo papilar ventricular izquierdo posterior.

ES 2 339 234 T3

Los músculos se transportaron a un laboratorio separado y se montaron en baños de órganos. Con el fin de prevenir la contractura de los músculos papilares durante el transporte y montado, se usó una disolución de relajación con una relación de concentraciones de $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ de 1:8 comparable a la disolución cardioplégica del St. Thomas' Hospital. Los músculos papilares se montaron en baños de órganos que contenían la disolución de relajación y se dejó que se adaptaran a 31°C durante aproximadamente 20 min antes de cambiar la disolución a una que contenía lo siguiente (en mmol/l): NaCl 119,2; KCl 2,0; CaCl_2 2,0; MgSO_4 1,2; KH_2PO_4 2,4; NaHCO_3 24,9; glucosa 10,0; manitol 2,22 y equilibrada con O_2 al 95%/CO₂ al 5% a 31°C (pH 7,4). Los músculos se estimularon en un campo con polaridad alternante a 1 Hz con impulsos de 5 ms de duración y corriente aproximadamente 20% por encima del umbral individual (10-15 mA, determinado en cada experimento). Los músculos que se contraían isométricamente se estiraron hasta el máximo de su curva longitud-tensión. Se registró la fuerza y se analizó como se ha descrito previamente (Skomedal y col., 1997, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280: 721-729). Los músculos se dejaron equilibrar durante 90 minutos. Cuando se usaron la prazosina (antagonista de α_1 -AR), timolol (antagonista de β -AR), ketanserina (antagonista selectivo de 5-HT_{2A}) y GR113808 (antagonista selectivo de 5-HT₄) se dejaron actuar durante 90 minutos antes de añadir el agonista. Se calcularon los ciclos de contracción-relajación (CRC) medios para diferentes periodos experimentales, y estos ciclos se usaron para determinar los parámetros descriptivos como el desarrollo máximo de fuerza $(dF/dt)_{\text{máx}}$, tiempo hasta la fuerza máxima (TPF) y tiempo hasta la relajación a un nivel de 20% (TR20). El tiempo de relajación (RT) se calculó como TR20-TPF. $(dF/dt)_{\text{máx}}$ se usó como un índice de contractilidad. Las respuestas inotrópicas inducidas por los agonistas se expresaron por el aumento de $(dF/dt)_{\text{máx}}$. El RT se usó como índice de relajación. Las respuestas lusitrópicas se expresaron como reducción del RT. La respuesta mecánica al final del periodo de equilibrio se usó como respuesta de control.

Diseño experimental

Se añadió el agonista de forma acumulativa o como un solo bolo directamente a los baños de órganos y se mezcló completamente en la disolución en 2-3 segundos. Las respuestas lusitrópica e inotrópica dependientes de la concentración a la estimulación del receptor 5-HT₄ por la serotonina, se obtuvieron en presencia de prazosina (1 $\mu\text{mol/l}$) y timolol (3 $\mu\text{mol/l}$ o 1 $\mu\text{mol/l}$), atropina (1 $\mu\text{mol/l}$) y ascorbato (10 $\mu\text{mol/l}$), respectivamente. Las curvas de concentración-respuesta para la serotonina se obtuvieron añadiendo serotonina de forma acumulativa en ausencia y presencia de ketanserina (0,1 $\mu\text{mol/l}$). Las curvas de concentración-respuesta para la estimulación del receptor 5-HT₄ en presencia de ketanserina se realizaron en ausencia y presencia de GR113808 0,5 nmol/l y el desplazamiento relativo de las curvas se usó para calcular K_b para GR113808. Cuando se añadió la serotonina como una sola dosis (10 $\mu\text{mol/l}$), los experimentos se realizaron en ausencia de ketanserina. La presencia de cualquier antagonista no influía en la función basal o máxima de los músculos en relación con el rendimiento mecánico o el umbral de estimulación eléctrica (no se muestran los datos). Se añadieron los diferentes agonistas directamente a los baños de órganos en concentraciones crecientes hasta obtener concentraciones supramáximas de agonista con respecto a la respuesta inotrópica máxima.

Cálculo y estadística

Las respuestas para cada concentración de agonista se calcularon en general como porcentaje de la respuesta máxima. Las curvas de concentración-respuesta construidas a partir del experimento del músculo papilar, se construyeron de acuerdo con Ariens y Simonis (1964, véase antes), calculando los percentiles (CE_{10} a CE_{100}) para cada experimento individual y calculando las medias correspondientes. Este cálculo proporciona curvas medias que expresan la respuesta como respuesta fraccionada o porcentaje del máximo y presenta el posicionamiento horizontal y la pendiente media correcta de las curvas. El posicionamiento horizontal de las curvas de concentración-respuesta se expresó como valores de $p\text{CE}_{50}$ ($= -\log\text{CE}_{50}$). Los datos se expresan como media \pm error típico de la media (ETM) y el número de animales se expresa como n. Los niveles de significancia de las diferencias se calcularon de acuerdo con el ensayo t de Student. $P < 0,05$ se considera estadísticamente significativo. Las constantes de inhibición K_b se calcularon a partir de la ecuación de Schild, basada en el desplazamiento relativo de las curvas de concentración-respuesta para la estimulación del receptor.

Fármacos

La serotonina (hidrocloruro de 5-hidroxitriptamina, 5-HT) era de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). El maleato de GR 113808 (1-metil-1H-indol-3-carboxilato de {1-[2-(metil-sulfonilamino)etil]-4-piperidinil}-metilo) era de Tocris (Bristol, Reino Unido). El tartrato de ketanserina (3-[2-[4-(4-fluorobenzoi)-1-piperidinil]etil]-2,4(1H,3H)-quinazolinadiona) era de RBI (Natick, MA, EE.UU.). El hidrocloruro de prazosina, maleato de timolol, hemisulfato de (-)-isoprenalina, ascorbato, carbamilcolina (carbachol) y sulfato de atropina se adquirieron en Sigma. Las disoluciones madre se prepararon en agua doblemente destilada y se mantuvieron a -20°C para evitar la oxidación. Se hicieron diluciones adicionales de los fármacos recientes diarias y se mantuvieron en frío (0-4°C).

*Resultados**Efectos inotrópicos de la serotonina en las ratas con insuficiencia cardíaca*

5 En presencia de prazosina, atropina y timolol, la serotonina 10 $\mu\text{mol/l}$ provocó una respuesta inotrópica positiva monofásica no observadas en los animales con simulación de la operación (n = 6) (Fig. 1, 2a). Con una fase de retraso (retardo por difusión) de aproximadamente 5 segundos, el tiempo desde la adición de la serotonina hasta 50% de respuesta inotrópica relativa era $22 \pm 2,0$ s, y hasta la respuesta inotrópica máxima 1-2 minutos (Figura 1, inserto). El aumento de la fuerza contráctil mediado por la serotonina en músculos papilares de ratas con insuficiencia cardíaca
 10 después de IM era $44,5 \pm 2,9\%$ (ETM, n = 10), comparable con el efecto inotrópico de isoprenalina 10 $\mu\text{mol/l}$, de $60,4 \pm 5,8\%$ (o $58,5 \pm 7\%$) (ETM, n = 10) (Fig. 2a). Las respuestas inotrópicas a través de los respectivos receptores no eran aditivas, lo que indicaba el acoplamiento a la misma ruta de señalización. Sin embargo, en los animales con simulación de la operación, la isoprenalina provocó una respuesta inotrópica positiva de $111,6 \pm 8,6\%$ (media \pm ETM, n = 6) (Fig. 2a) subrayando la atenuación de la respuesta mecánica a la estimulación del receptor β -adrenérgico en
 15 miocardio con insuficiencia.

Características cualitativas de la respuesta inotrópica a la serotonina

20 La respuesta inotrópica a la serotonina inducía cambios cualitativos en los ciclos de contracción-relajación (Fig. 2b) no observados en los animales con simulación de la operación. El tiempo para la fuerza máxima en el periodo de control era $148,0 \pm 3,9$ ms (media \pm ETM, n = 8) y después de la estimulación por la serotonina había un acortamiento de los ciclos de contracción-relajación con una reducción significativa de TPF, TR20 y RT (Tabla 1). Estos cambios reflejan un aumento selectivo de la relajación comparado con la contracción, que es comparable con el observado
 25 durante la estimulación del receptor β -adrenérgico en preparaciones de miocardio (Skomedal y col., 1997, véase antes), y de acuerdo con las rutas de señalización comunes para estos agentes.

Influencia de la estimulación colinérgica en la respuesta inotrópica inducida por la serotonina

30 Es conocido que la estimulación de los receptores muscarínicos de acetilcolina ejerce un antagonismo funcional de efectos inotrópicos mediados por la ruta de G_{as} -adenilil-ciclase, y como procedimiento farmacológico para elucidar la implicación de dicha ruta en la respuesta inotrópica inducida por serotonina, se estimularon estos receptores con carbachol. La serotonina con 10 $\mu\text{mol/l}$ ejercía una respuesta inotrópica positiva de $33,7 \pm 6,6\%$ (media \pm ETM, n = 5) por encima del nivel de control. El carbachol (30 $\mu\text{mol/l}$) invertía la respuesta a $4,8 \pm 6,5\%$ (media \pm ETM, $p < 0,01$)
 35 en 2-3 segundos (o 1-2 minutos) (Fig. 3) e invertía parcialmente TPF, TR20 y RT. La atropina (1 $\mu\text{mol/l}$) restablecía la respuesta a $45,1 \pm 5,1\%$ (media \pm ETM, $p > 0,06$ frente a la serotonina sola, ensayo t pareado de 2 colas) y reestablecía las características del ciclo de contracción-relajación, sugiriendo una implicación de la ruta de la G_{as} -adenilil-ciclase.

Inversión de la respuesta inotrópica inducida por serotonina por el antagonista selectivo de 5-HT₄ GR113808

40 Las características cualitativas de la respuesta inotrópica a la serotonina, su similitud con la respuesta inotrópica a la isoprenalina y la inversión por el carbachol, indicaban todos una implicación de la ruta de la G_{s} -adenilil-ciclase. Tres receptores de serotonina diferentes se acoplan con G_{s} y estimulan la adenilil-ciclase, 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ (Hoyer y col., 1994, *Pharmacol. Rev.* 46:157-203). De estos, se sabe que el receptor 5-HT₄ media los efectos inotrópicos y cronotrópicos en el atrio humano y porcino (Kaumann, 1994, *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 451-455), pero no en la rata (Läery col., 1998, *Br. J. Pharmacol.* 123: 1182-1188). Por lo tanto, se ensayó si el antagonista selectivo del receptor de serotonina 5-HT₄ bloquearía la respuesta inotrópica mediada por la serotonina en el músculo papilar de
 50 ratas con insuficiencia cardíaca crónica. GR113808 es un antagonista selectivo de 5-HT₄ con una pKi de 9,2-9,7 (Gale y col., 1994, *Br. J. Pharmacol.* 111: 332-338), y GR113808 1 $\mu\text{mol/l}$ invertía completamente la respuesta inotrópica provocada por la serotonina 10 $\mu\text{mol/l}$ (Fig. 4). El acortamiento de los ciclos de contracción-relajación inducido por la serotonina también era sensible a GR113808. Sin embargo, como puede verse en la figura 4, estos cambios inducidos por la serotonina no eran invertidos completamente cuando GR113808 se daba con posterioridad a la serotonina. Este
 55 es un descubrimiento típico con la estimulación mediada por el AMPc de la inotropía (Skomedal y col., 1997, véase antes), y no desvirtúa el hecho de que GR113808 podía invertir completamente los efectos de la serotonina.

La falta del efecto de la ketanserina elimina la implicación de receptores 5-HT_{2A}

60 En la medida en que los efectos inotrópicos de la serotonina se han demostrado en el corazón de rata, estos se han limitado al atrio y han sido mediados por los receptores 5-HT_{2A} (Läer y col., 1998, véase antes). Para ensayar si los receptores 5-HT₂ podían estar implicados también en el efecto inotrópico de la serotonina en el músculo papilar de ratas con insuficiencia cardíaca crónica, se usó el antagonista del receptor 5-HT_{2A} ketanserina. La ketanserina (0,1
 65 $\mu\text{mol/l}$) no desplazaba la curva de concentración-respuesta para la serotonina a concentraciones más altas de agonista (valor pD₂ con ketanserina $7,49 \pm 0,08$ (ETM, n = 5) frente a $7,62 \pm 0,06$ (ETM, n = 6) sin ketanserina, $p = 0,24$, ensayo t de Student no pareado), lo que sugería que el receptor 5-HT_{2A} no está implicado en la respuesta inotrópica a la serotonina en los músculos papilares de ratas con insuficiencia cardíaca crónica después de IM (Fig. 5). No había

ES 2 339 234 T3

diferencia significativa entre las respuestas inotrópicas máximas en los dos grupos (con y sin ketanserina) medidas en el máximo de la curva de concentración respuesta (resultado agrupado $17,5 \pm 1,9\%$ (ETM, n = 11)). El efecto inotrópico aparentemente menor en este experimento comparado con el del ejemplo de la figura 2a, ilustra un efecto inotrópico constantemente más bajo en todos los experimentos, cuando se medía después de una curva de concentración-respuesta completa en oposición a una estimulación directa con una concentración alta (p. ej., $10 \mu\text{mol/l}$) de serotonina. Esta diferencia puede reflejar la desensibilización de la respuesta durante la estimulación continua con concentraciones crecientes de serotonina, como se hace para lograr las curvas de concentración-respuesta.

10 *La alta afinidad de GR113808 documenta la implicación de los receptores 5-HT₄*

Para proporcionar la prueba farmacológica de la implicación de los receptores 5-HT₄, se determinó el desplazamiento de la curva de concentración-respuesta para la serotonina por GR113808. El experimento se llevó a cabo en presencia de ketanserina $0,1 \mu\text{mol/l}$ para bloquear los receptores 5-HT_{2A}, si estaban presentes. Las curvas de concentración-respuesta a la serotonina en ausencia y presencia de GR113808 $0,5 \text{ nmol/l}$ eran esencialmente paralelas a los valores de pCE50 de $7,62 \pm 0,06$ (ETM, n = 6) y $7,32 \pm 0,06$ (ETM, n = 6, p < 0,005), respectivamente (Fig. 6), sin diferencia en la respuesta inotrópica máxima inducida por la serotonina entre los grupos (media agrupada $18,7 \pm 2,4\%$ (ETM, n = 12)). La constante de inhibición de GR113808 (K_b) correspondiente calculada a partir de la ecuación de Schild era $0,5 \text{ nmol/l}$, que correspondía a un valor de pK_b de 9,3. Puesto que GR113808 presenta una selectividad por el receptor 5-HT₄ de al menos 1000 veces frente a todos los otros receptores conocidos, esto proporciona una prueba firme de una respuesta inotrópica mediada por el receptor 5-HT₄ a la serotonina en el músculo papilar de ratas con insuficiencia cardíaca crónica.

TABLA 1

Características cualitativas de los ciclos de contracción-relajación (CRC) en animales con insuficiencia cardíaca crónica y con simulación de operación, antes y después de la posterior adición de serotonina ($10 \mu\text{mol/l}$) e isoprenalina ($100 \mu\text{mol/l}$), respectivamente.					
Simulación n=6					
	Control (ms)	5-HT (ms)	5-HT (% del control)	ISO (ms)	Iso (% del control)
TPF	$125,1 \pm 5,5$	$123,7 \pm 5,5$	$99,0 \pm 0,8$	$109,3 \pm 2,7$	$87,4 \pm 2,3$
TR20	$233,6 \pm 11,2$	$231,0 \pm 11,0$	$99,0 \pm 0,7$	$174,0 \pm 4,9$	$74,5 \pm 1,7$
RT (TR20-TPF)	$108,4 \pm 6,2$	$107,3 \pm 5,9$	$99,0 \pm 0,5$	$75,0 \pm 2,5$	$69,4 \pm 3,2$
ICC n=10					
TPF	$148 \pm 3,9$	$134 \pm 3,5$	$90,5 \pm 1,4$	$123,1 \pm 1,6$	$83,2 \pm 1,7$
TR20	$254,3 \pm 6,3$	$224,6 \pm 5,4$	$88,3 \pm 1,5$	$204,1 \pm 2,9$	$80,3 \pm 1,9$
RT (TR20-TPF)	$106,3 \pm 2,5$	$90,6 \pm 2,2$	$85,2 \pm 1,5$	$81,0 \pm 1,8$	$76,2 \pm 1,8$
Los valores son media \pm ETM de resultados medios de 20-40 CRC en cada grupo de músculos papilares.					
TPF = Tiempo para la fuerza máxima					
TR20 = Tiempo para la relajación hasta nivel de 20 %					
RT = Tiempo para la relajación					

Ejemplo 2

Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) cuantitativa para examinar la inducción de ARNm del receptor 5-HT₄ en la ICC

5

El tejido de ventrículo izquierdo no infartado (30-50 mg, principalmente septo), recogido inmediatamente después de sacar el músculo papilar, o músculo papilar (15-30 mg incluyendo algo de pared ventricular izquierda) recogido tras completarse los análisis funcionales, conservado en RNAlater (Ambion) hasta su uso, se congelaron rápidamente y se redujeron a polvo bajo nitrógeno líquido. El ARN total se aisló del tejido en polvo, se homogeneizó en 1 ml de TRIZOL (Invitrogen), seguido de la extracción el ARNm (Bach y col. 2001, véase antes) y síntesis de la primera

10

Se diseñaron grupos de cebadores (dirigidos a los límites intrón/exón para evitar las señales de ADN genómico) y sondas (Oligonucleótido con colorante doble, Eurogentec, marcado en 5' con los colorantes indicadores fluorescentes FAM (5-HT_{4(b)}), GI:924649 (Gerald y col., 1995 *EMBO J.* 14: 2806-2815) y 5-HT_{2A}, GI:207067 (Julius y col., 1990 *PNAS USA* 87: 928-932)), JOE (Eurogentec; gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; GI: 10190788)) o Yakima Yellow (YY; Eurogentec; péptido natriurético atrial (ANP; GI:55711)) e inactivados con TAMRA (5-HT_{4(b)}), 5-HT_{2A} y GAPDH) o Dark Quencher (DQ; Eurogentec; ANP)) para la PCR cuantitativa, como se ha descrito (Bustin y col., 2000 *J. Mol. Endocrinol.* 25: 169-193). Los nombres y secuencias de los cebadores superior (U) e inferior (L) y las sondas (P) usados eran (5'-3'): 5-HT_{4(b)}: ON283(U), *CATGTGCATAGGTATACAGTGGGAATGT*; ON284(L), *GCAGCCACCAAAGGAGAAGTT*; TM14(P), *FAM-CCATCTGCTGCCAGCCTTTGGTCTATAGGA-TAMRA*; 5-HT_{2A}: ON273(U), *TTCACCACAGCCGCTTCAA*; ON274 (L), *ATCCTGTAGTCCAAAGACTGGGATT*; TM9 (P), *FAM-ATGGATATACCTACAGATATGGTCGTCACACGGCAAT-TAMRA*; ANP: ON285(U), *ATCTGATGGATT* CAAGAACC; ON286(L), *CTCTGAGACGGGTTGACTTC*; TM15(P) *YY-CGCTTCATCGGTCTGCTCGCTCA-DQ*; GAPDH: ON279(U), *CCTGCACCACCAACTGCTTA*; ON290(L), *GGCATGGACTGTGGTCATGA*; TM12(P), *JOE-TGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-TAMRA*.

15

20

25

La RT-PCR cuantitativa (Medhurst y col., véase antes) se hizo en reacciones de 25 µl con la mezcla TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) que contenía Mg²⁺ 5 mM, 300 nM de cada cebador, sonda 200 nM y 10 ng de ADNc molde. GAPDH se cuantificó por separado para la normalización con 0,1 ng de ADNc molde. Se recogieron y analizaron los datos en bruto con el software Sequence Detector (SDS versión 1.7; Applied Biosystems) (Bustin y col. 2000, véase antes). Los resultados se expresan como la media ± ETM para n animales. P<0,05 se consideró estadísticamente significativo (ensayo de Mann-Whitney no paramétrico).

30

35

Inducción de ARNm del receptor 5-HT_{4(b)} en la ICC

Se usó la RT-PCR cuantitativa para determinar el nivel de ARNm que codifica el receptor 5-HT_{4(b)}, receptor 5-HT_{2A} y el marcador de insuficiencia cardíaca ANP, normalizado al nivel de ARNm de GAPDH. En el ventrículo izquierdo y el músculo papilar, respectivamente, los niveles de ARNm de 5-HT_{4(b)} eran 4 y 18 veces mayores en la ICC frente a la simulación, mientras que los niveles de ARNm de 5-HT_{2A} no habían cambiado y los niveles de ARNm de ANP aumentaron (Fig. 7). La relación entre los niveles de ARNm de 5-HT_{4(b)} y 5-HT_{2A} normalizados aumentó en la ICC tanto en el ventrículo izquierdo como en el músculo papilar, confirmando el mayor nivel de ARNm de 5-HT_{4(b)} con respecto a 5-HT_{2A}, independientemente de GAPDH (Tabla 2).

40

45

Ejemplo 3

La respuesta inotrópica máxima a la serotonina y ARNm del receptor 5-HT_{4(b)} relacionada con el tamaño del infarto

En los músculos papilares de ratas con IM_{si} (infarto de miocardio sin insuficiencia), es decir ratas en las que no se obtuvieron síntomas de ICC, a pesar de haber sido sometidas a cirugía para inducir el infarto de miocardio, la serotonina (10 µM) provocó una respuesta inotrópica cualitativamente similar a la respuesta observada en los animales con ICC. La magnitud de la respuesta se correlacionaba positivamente con el tamaño del infarto hasta 30-40% de la superficie miocárdica interna en los animales con IM_{si} (Fig. 8A). En los corazones IM_{si} con un tamaño de infarto de 30-40%, el efecto inotrópico era de la misma magnitud que en corazones con ICC que tenían todos un tamaño de infarto >40%. También se observó una correlación positiva con el tamaño del infarto para la expresión del ARNm de 5-HT_{4(b)} y ANP, mientras que los niveles de ARNm de 5-HT_{2A} no cambiaron (Fig. 8B). Estos descubrimientos sugieren una transición gradual relacionada con la extensión de los cambios miocárdicos secundarios al infarto.

55

60

65

ES 2 339 234 T3

TABLA 2

Relación de ARNm del receptor 5-HT_{4(b)} al ARNm del receptor 5-HT_{2A}

	Simulación	ICC
Ventrículo izquierdo	0,87 ± 0,33 (n=7)	3,20 ± 1,09 (n=11)*
Músculo papilar	0,85 ± 0,64 (n=4)	7,48 ± 2,44 (n=5) †

Para ensayar la observación del mayor nivel del receptor 5-HT_{4(b)} independiente de GAPDH, se calculó la relación de ARNm del receptor 5-HT_{4(b)} normalizado al ARNm del receptor 5-HT_{2A} normalizado. *ICC frente a Simulación p<0,06; †ICC frente a Simulación p<0,05.

Ejemplo 4

Se midió la respuesta inotrópica a la serotonina en el músculo papilar de ratas 6 semanas después de infarto de miocardio, en presencia de varios antagonistas del receptor 5-HT₄ químicamente diferentes, como se ha descrito antes.

Los antagonistas de 5-HT₄ SB203186 y RS39604, cada uno añadido en concentración 5 nM, bloquean la respuesta inotrópica a la serotonina en ratas 6 semanas después de IM, con potencias de bloqueo correspondientes a sus afinidades conocidas en los receptores 5-HT₄. La figura muestra las curvas de concentración-respuesta para la serotonina en músculos papilares de ratas 6 semanas después de infarto de miocardio en ausencia y presencia de SB203186 5 nM o RS39604 5 nM. La respuesta inotrópica (dF/dt) se expresa como porcentaje del máximo para cada músculo papilar.

El valor de pCE₅₀ para la serotonina en ausencia del bloqueador era 7,25 ± 0,2. El valor de pCE₅₀ para la serotonina en presencia de SB203186 5 nM era 6,39, que correspondía a un valor de pK_b de 9,1. El valor de pCE₅₀ para la serotonina en presencia de RS39604 5 nM era 6,26, que correspondía a un valor de pK_b de 9,2. Esto está de acuerdo con la respuesta inotrópica a la serotonina mediada por los receptores 5-HT₄.

Ejemplo 5

Respuestas inotrópicas mediadas por el receptor 5-HT₄ en la insuficiencia cardiaca hipertensiva en rata

Después, se usó un segundo modelo de insuficiencia cardiaca para estudiar el efecto inotrópico mediado por el receptor 5-HT₄ de la serotonina; en concreto un modelo de insuficiencia cardiaca hipertensiva de rata. Este estudio usa un modelo de rata de insuficiencia cardiaca obtenido por estrechamiento aórtico con banda. En este modelo, la insuficiencia cardiaca se induce por una poscarga aumentada de forma constante, de alguna forma reminiscente de la insuficiencia cardiaca hipertensiva humana. Este estudio se realizó para clarificar si es la insuficiencia cardiaca como tal, o el infarto de miocardio que precede a la insuficiencia cardiaca, lo que subyace en la inducción de los receptores 5-HT₄ en el modelo de postinfarto.

Se indujo la constricción transaórtica (estrechamiento aórtico con banda) de la aorta ascendente en ratas Wistar macho de 200 g con anestesia, inducido por N₂O al 63%, O₂ al 32% e isoflurano al 5% y mantenido con N₂O al 66%, O₂ al 33% e isoflurano al 1-2%. Se realizó una toracotomía en el lado derecho mediante una incisión cutánea de 3-4 cm de largo, se abrió el pericardio y se identificó la aorta ascendente y se diseccionó para separar del tejido que la rodea. Se unió una ligadura alrededor de la aorta ascendente y de una sonda metálica con un diámetro de 0,9 mm. Después se retiró la sonda metálica. El resultado era una constricción de la aorta ascendente con un diámetro interno de aproximadamente 0,9 mm. Después, se cerró el tórax con suturas de seda de 3-0 y la piel se cerró con suturas Dexon 1. Los animales recibieron analgesia posoperatoria con buprenorfina, 0,09 mg por vía subcutánea, y se dejó que se despertaran en un entorno a 30°C. Después de 6 semanas los animales se sometieron a anestesia de nuevo como en la primera cirugía, y se realizó un examen ecocardiográfico. Finalmente se abrió el tórax y se sacó el corazón para preparar los músculos papilares ventriculares izquierdo posteriores como se ha descrito (Sjaastad y col., 2003 *Acta physiol. Scand.* 177: 449-458). Se consideró que la rata tenía ICC.

Se extrajeron los músculos papilares de las ratas con ICC 6 semanas después del estrechamiento aórtico con banda, como se ha descrito antes. Se preparó el músculo papilar ventricular izquierdo posterior, se montó en el baño de órganos, se equilibró y se estimuló con campo a 1 Hz (Sjaastad y col., 2003, véase antes) y se registraron los ciclos de contracción-relajación (CRC) y se analizaron como se ha descrito previamente (Skomedal y col. 1997, *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 280: 721-729) (Sjaastad y col., 2003, véase antes) con respecto a la fuerza máxima desarrollada (F_{máx}), desarrollo máximo de la fuerza (dF/dt)_{máx}, tiempo para la fuerza máxima (TPF), tiempo para la relajación al nivel de 20% (TR20) y tiempo para la relajación (RT=TR20-TPF). El experimento se realizó en presencia de bloqueadores (añadidos 90 min antes de la serotonina) de receptores colinérgicos muscarínicos y adrenérgicos (prazosina 1 μM, timolol 1 μM, atropina 1 μM).

ES 2 339 234 T3

La figura 10 muestra los ciclos de contracción-relajación medios representativos en un músculo papilar del corazón de una rata con ICC 6 semanas después de estrechamiento aórtico con banda, antes de la adición de agonista, en una respuesta inotrópica de estado estacionario máxima a la serotonina 10 μM , seguido de inversión de la respuesta de la serotonina con GR113808 1 μM y en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima al isoproterenol 100 μM . La serotonina (10 μM) provocaba una respuesta inotrópica positiva de magnitud y características comparables a la respuesta inotrópica positiva al isoproterenol 100 μM (suficiente para superar el bloqueo por timolol 1 μM). La respuesta inotrópica positiva a la serotonina se invirtió por 1 μM del antagonista de 5-HT₄ GR113808, indicando que la respuesta es mediada por los receptores 5-HT₄.

Esto muestra que este modelo de insuficiencia cardíaca en ratas también causa la aparición de una respuesta inotrópica mediada por el receptor 5-HT₄ a la serotonina, indicando que este descubrimiento es general para la insuficiencia cardíaca como tal, al menos en ratas.

Ejemplo 6

Efecto inotrópico mediado por el receptor 5-HT₄ de la serotonina en el corazón humano

Para estudiar la respuesta inotrópica mediada por el receptor 5-HT₄ a la serotonina en el corazón humano, se usó el músculo trabecular de un corazón humano posinfarto y un corazón humano con insuficiencia cardíaca debido a una miocardiopatía prolongada.

La figura 11 muestra los ciclos de contracción-relajación medios representativos en un músculo trabecular del corazón humano posinfarto explantado, antes de la adición de agonista, en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima a la serotonina 10 μM , seguido de inversión de la respuesta de la serotonina con GR113808 1 μM y en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima al isoproterenol 100 μM .

El corazón se extrajo de un paciente que había sobrevivido a un pequeño infarto de miocardio y murió en el hospital de hemorragia subaracnoide. Los músculos trabeculares se prepararon, se montaron en baños de órganos, se equilibraron y se estimularon en un campo a 1 Hz (Skomedal y col. 1997, véase antes) y se registraron los ciclos de contracción-relajación (CRC) y se analizaron como se ha descrito previamente (Skomedal y col. 1997, véase antes) con respecto a la fuerza máxima desarrollada ($F_{\text{máx}}$), desarrollo máximo de la fuerza ($dF/dt_{\text{máx}}$), tiempo para la fuerza máxima (TPF), tiempo para la relajación al nivel de 20% (TR20) y tiempo para la relajación ($RT=TR20-TPF$). El experimento se realizó en presencia de bloqueantes (añadidos 90 min antes de la serotonina) de receptores colinérgicos adrenérgicos muscarínicos y adrenérgicos (prazosina 1 μM , timolol 1 μM , atropina 1 μM).

Como se ve en la figura 11, la serotonina (10 μM) provocaba una respuesta inotrópica positiva que equivalía a aproximadamente 10% de la respuesta inotrópica positiva al isoproterenol 100 μM (suficiente para superar el bloqueo por el timolol 1 μM). La respuesta inotrópica positiva a la serotonina 10 μM , era invertida por el antagonista del receptor 5-HT₄ GR113808 1 μM indicando que la respuesta es mediada por los receptores 5-HT₄.

También se extrajo un corazón de un paciente que había recibido un trasplante de corazón debido a insuficiencia cardíaca de cardiomiopatía prolongada. Se prepararon los músculos trabeculares y se registraron los ciclos de contracción-relajación (CRC) como se ha descrito antes. Además de la presencia de bloqueantes como antes, las respuestas inotrópicas positivas fueron potenciadas por la presencia del inhibidor de fosfodiesterasa IBMX (isobutil-metil-xantina; 35 μM).

La figura 12 muestra ciclos de contracción-relajación medios representativos en un músculo trabecular de este corazón humano explantado, antes de la adición de agonista, en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima a la serotonina 10 μM , seguido de inversión de la respuesta de la serotonina con GR113808 1 μM y en la respuesta inotrópica de estado estacionario máxima al isoproterenol 100 μM .

Como puede verse en la figura, la serotonina (10 μM) provocaba una respuesta inotrópica positiva que equivalía a aproximadamente 32% de la respuesta inotrópica positiva al isoproterenol 100 μM (suficiente para superar el bloqueo por el timolol 1 μM). La respuesta inotrópica positiva a la serotonina era invertida por el antagonista del receptor 5-HT₄ GR113808 1 μM , indicando que la respuesta es mediada por los receptores 5-HT₄.

Esto muestra que la presencia de una respuesta inotrópica por los receptores 5-HT₄ en el corazón con insuficiencia, también se observa en seres humanos.

Ejemplo 7

Efecto del tratamiento de ratas con insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) postinfarto con un antagonista de 5-HT₄

Se indujo un infarto de miocardio (IM) extensivo en ratas Wistar macho de 320 g con anestesia (N_2O al 68%, O_2 al 29% e isoflurano al 2-3%) por la ligación proximal de la arteria coronaria izquierda (Sjaastad y col. 2003, véase antes). Tres días después, las ratas se incluyeron en el estudio si las ratas tenían tanto señales clínicas de insuficiencia cardíaca congestiva (taquipnea y ventilación forzada) como un infarto de miocardio grande, verificado por ecocardiografía. Las ratas incluidas en el estudio se asignaron de forma aleatoria, ciega, en el grupo de placebo o tratamiento.

ES 2 339 234 T3

Bajo anestesia con 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de fentanilo (Janssen Pharmaceutical) y midazolam 3,75 mg/kg (Roche) s.c, así como con anestesia local con xilocaína al 1% alrededor de la incisión, las ratas recibieron por vía subcutánea la implantación de bombas miniosmóticas de 2 ml Alzet (Alza, Palo Alto, CA) que contenían disolvente (ácido ascórbico 100 μM , EDTA 50 μM en agua; grupo de placebo) o disolvente que contenía el antagonista de 5-HT₄ SB207266 50 mM (grupo de tratamiento). Las bombas se sustituyeron por bombas nuevas después de 3 semanas, para obtener un tiempo de tratamiento total de 6 semanas.

Después de 6 semanas de tratamiento, los animales se sometieron de nuevo a anestesia con isoflurano (N₂O al 68%, O₂ al 29% e isoflurano al 2-3%) con control de la temperatura para las mediciones ecocardiográficas y hemodinámicas, seguido de eutanasia. Después, se prepararon los músculos papilares ventriculares izquierdo posteriores, se montaron en el baño de órganos, se equilibraron y se estimularon con campo a 1 Hz (Sjaastad y col., 2003, véase antes) y se registraron los ciclos de contracción-relajación (CRC) y se analizaron como se ha descrito previamente con respecto a la fuerza máxima desarrollada ($F_{\text{máx}}$), desarrollo máximo de la fuerza ($dF/dt_{\text{máx}}$), tiempo para la fuerza máxima (TPF), tiempo para la relajación al nivel de 20% (TR20) y tiempo para la relajación (RT=TR20-TPF).

El experimento se realizó en presencia de bloqueantes (añadidos 90 min antes del agonista) de receptores colinérgicos muscarínicos y α -adrenérgicos (prazosina 1 μM , timolol 1 μM , atropina 1 μM). El isoproterenol se añadió al baño de órganos de forma acumulativa y se calculó para cada animal la respuesta inotrópica positiva máxima al isoproterenol.

Los resultados se muestran en la figura 13 e indican una tendencia hacia la normalización de la función miocárdica, a juzgar por la tendencia hacia la normalización de la reducción inducida por la ICC de la respuesta inotrópica máxima a la estimulación del receptor β -adrenérgico, por tratamiento con el antagonista de 5-HT₄ SB207266.

Además, en la ICC, la duración del ciclo de contracción-relajación es prolongado, debido a cambios en la composición de los miofilamentos. Por lo tanto, la duración del ciclo de contracción-relajación se puede usar como parámetro adicional del grado de disfunción miocárdica. Los datos preliminares del tratamiento con el antagonista de 5-HT₄ SB207266 también muestran una tendencia hacia la normalización de este parámetro en la disfunción miocárdica (no se muestran los datos).

Ejemplo 8

Comprimidos (orales) para el tratamiento y profilaxis de la insuficiencia cardiaca

GR113808 (como sal de hidrocloreuro)	10,95 g
lactosa	157 g
celulosa microcristalina	30 g
estearato magnésico BP	2,05 g

Los principios activos se pasan por un tamiz de malla n° 24 y se mezclan con lactosa, celulosa microcristalina y estearato magnésico. La mezcla resultante se comprime en comprimidos. El peso del comprimido es 200 mg y cada comprimido contiene 10 mg de GR113808.

Ejemplo 9

Cápsulas (orales) para el tratamiento y profilaxis de la insuficiencia cardiaca

SB207266 (como sal de hidrocloreuro)	5,5 g
Atenolol	25 g
lactosa	169,5 g

Los principios activos se pasan por un tamiz de malla n° 24 y se mezclan con lactosa. La mezcla se carga en cápsulas de gelatina (200 mg) utilizando una maquinaria adecuada. Cada cápsula contiene 5 mg de SB207266 y 50 mg de atenolol.

ES 2 339 234 T3

Ejemplo 10

Disolución para inyección para el tratamiento y profilaxis de la insuficiencia cardiaca

5	SB207266 (como sal de hidrocioruro)	10,9 g
	Cloruro sódico	c.s.
10	Agua para inyección	hasta 10 litros

15 El SB207266 (como sal de hidrocioruro) y el cloruro sódico se disuelven en agua para inyección para formar una disolución isotónica. La mezcla se carga en viales (10 ml) con tapones de caucho y se esterilizan por calor en un autoclave durante 20 minutos a 121°C. Cada vial contiene 10 ml y 1 mg de SB207266 por ml.

Ejemplo 11

20 *Cápsulas (orales) para el tratamiento y profilaxis de la insuficiencia cardiaca*

	SB207266 (como sal de hidrocioruro)	5,5 g
	Tartrato de metoprolol	50 g
25	lactosa	144,5 g

30 Los principios activos se pasan por un tamiz de malla nº 24 y se mezclan con lactosa. La mezcla se carga en cápsulas de gelatina (200 mg) utilizando una maquinaria adecuada. Cada cápsula contiene 5 mg de SB207266 y 50 mg de tartrato de metoprolol.

Ejemplo 12

35 *Cápsulas (orales) para el tratamiento y profilaxis de la insuficiencia cardiaca*

	SB207266 (como sal de hidrocioruro)	5,5 g
40	Maleato de enalapril	10 g
	lactosa	184,5 g

45 Los principios activos se pasan por un tamiz de malla nº 24 y se mezclan con lactosa. La mezcla se carga en cápsulas de gelatina (200 mg) utilizando una maquinaria adecuada. Cada cápsula contiene 5 mg de SB207266 y 10 mg de maleato de enalapril.

Ejemplo 13

50 *Cápsulas (orales) para el tratamiento y profilaxis de la insuficiencia cardiaca*

55	SB207266 (como sal de hidrocioruro)	5,5 g
	Losartán de potasio	50 g
	lactosa	169,5 g

60 Los principios activos se pasan por un tamiz de malla nº 24 y se mezclan con lactosa. La mezcla se carga en cápsulas de gelatina (200 mg) utilizando una maquinaria adecuada. Cada cápsula contiene 5 mg de SB207266 y 50 mg de losartán de potasio.

65

ES 2 339 234 T3

Ejemplo 14

Cápsulas (orales) para el tratamiento y profilaxis de la insuficiencia cardiaca

5	SB207266 (como sal de hidrocloreuro)	5,5 g
	Carvedilol	12,5 g
10	lactosa	182 g

15 Los principios activos se pasan por un tamiz de malla nº 24 y se mezclan con lactosa. La mezcla se carga en cápsulas de gelatina (200 mg) utilizando una maquinaria adecuada. Cada cápsula contiene 5 mg de SB207266 y 12,5 mg de carvedilol.

Ejemplo 15

20 *Supositorios para el tratamiento y profilaxis de la insuficiencia cardiaca*

	GR113808 (como sal de hidrocloreuro)	16,5 g
25	Mezcla de glicéridos de ácidos grasos	193,5 g

30 La sal de GR113808 se muele a un tamaño de partículas de aproximadamente 20 μm . Se prepara una suspensión de la sal en glicéridos de ácidos grasos fundidos y se llenan moldes de supositorio con la misma. El peso de cada supositorio es 200 mg con una dosis unitaria de 15 mg de GR113808.

Referencias citadas en la descripción

35 Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tomado especial cuidado en la compilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 40 • WO 9302677 A [0020] [0055]
- WO 9116045 A [0020] [0053] [0055]
- WO 0211766 A [0020]
- 45 • EP 1325921 A [0020]
- WO 0335649 A [0020]
- 50 • FR 76530 [0053]
- WO 9408994 A [0053]
- WO 9318036 A [0055]
- 55 • WO 9305040 A [0055]
- WO 9303725 A [0055]
- 60 • WO 9305038 A [0055]
- EP 9303054 W [0055]
- GB 9301895 W [0055]
- 65 • EP 9302808 W [0055]
- GB 9302028 W [0055]

ES 2 339 234 T3

- EP 9302775 W [0055]
- EP 9302809 W [0055]
- 5 • GB 9302130 W [0055]
- GB 9400172 W [0055]
- EP 501322 A [0055]
- 10 • US 6331401 B [0055]
- US 20020128172 A [0055]
- 15 • US 20030045452 A [0055]
- US 20020019386 A [0055]
- EP 322973 A [0055]
- 20 • EP 18002 A [0055]
- US 5872134 A [0055]
- 25 • EP 387431 A [0055]
- EP 201165 A [0055]
- EP 234872 A [0055]
- 30 • US 4859683 A, Rorer [0055]
- EP 307172 A, Lilly [0055]
- 35 • US 6127379 A [0055]
- US 6002009 A [0055]
- US 5929089 A [0055]
- 40 • US 5726187 A [0055]

Documentos de patentes no citados en la descripción

- 45 • **Bristow**. *Circulation*, 2000, vol. 101, 558-569 [0011] [0012] [0014]
- **Jahnel et al.** *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1992, vol. 346, 482-485 [0018]
- **Schoemaker et al.** *European Journal of Pharmacology*, 1993, vol. 230, 103-105 [0018]
- 50 • **Schoemaker et al.** *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 1992, vol. 346, 486-489 [0018]
- **Lorrain et al.** *Eur J Pharmacol*, 1992, vol. 229, 105-108 [0018]
- 55 • **Saxena**. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 1992, vol. 346, 629-636 [0018]
- **Blondel et al.** *Journal of Neurochemistry*, 1998, vol. 70 (6), 2252-2261 [0018]
- **Blondel et al.** *FEBS Letters*, 1997, vol. 412, 465-474 [0018]
- 60 • **Bach et al.** *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 2001, vol. 363, 146-160 [0019]
- **Kaumann**. *TiPS*, 1994, vol. 15, 451-455 [0020]
- 65 • **Rahme et al.** *Circulation*, 1999, vol. 100, 2010-2017 [0020]
- The Merck Manual. 1999, 1682-1693 [0020]

ES 2 339 234 T3

- **Clark**, R.D. 5-HT4 Receptors in the Brain and Periphery. 1998 [0050]
- **Parker** SG. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, December 1995, vol. 353 (1), 28-35 [0053]
- 5 • **Kaumann** AJ. *Br J Pharmacol.*, November 1993, vol. 110 (3), 1172-4 [0053]
- **Kaumann** AJ. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, May 1994, vol. 349 (5), 546-8 [0053]
- **Lorrain** J. *Eur J Pharmacol.*, 08 December 1992, vol. 229 (1), 105-8 [0053]
- 10 • **Torres** GE. *J Pharmacol Exp Ther.*, October 1994, vol. 271 (1), 255-61 [0053]
- **Leung** E. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, July 1996, vol. 354 (2), 145-56 [0053]
- 15 • **Gaster** LM. *J. Med Chem.*, 24 November 1995, vol. 38 (24), 4760-3 [0053]
- **McLean** PG; **Coupar** IM. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, August 1995, vol. 352 (2), 132-40 [0053]
- **Gaster** LM *et al. J Med Chem.*, 10 December 1993, vol. 36 (25), 4121-3 [0053]
- 20 • **Hagihara** K. *Eur J Pharmacol.*, 12 December 1994, vol. 271 (1), 159-66 [0053]
- **Kadowaki** M. *J Pharmacol Exp Ther*, July 1993, vol. 266 (1), 74-80 [0053]
- 25 • **Blondel** O. *Br J Pharmacol.*, October 1998, vol. 125 (4), 595-7 [0053]
- **Bonhaus** DW. *J Pharmacol Exp Ther.*, October 1994, vol. 271 (1), 484-93 [0053]
- **Gale** *et al. Br. J. Pharmacol.*, 1994, vol. 113, 120 [0053]
- 30 • **Dumuis** A. *et al. Eur J. Pharmacology*, 1998, vol. 146, 187-188 [0053]
- **Meulemans** AL; **Schuurkes** JA. *Eur J Pharmacol.*, 1992, vol. 212 (1), 51-9 [0053]
- 35 • **Clark** R.D. *et al. Bioorg Med Chem Lett*, 1995, vol. 5, 2119-2122 [0053]
- **Rahme** *et al. Circulation*, 1999, vol. 100 (9), 1942-4 [0053]
- **Cohen** M.L. *et al. J Pharmacol Exp Ther*, 1996, vol. 277 (1), 97-104 [0053]
- 40 • **Joubert** L. *et al. J Biol Chem.*, 2002, vol. 277, 2250 [0053]
- *Drug Data Report*, 1993, vol. 15 (10), 949 [0053]
- 45 • *Exp Opin Invest Drugs*, 1994, vol. 3 (7), 767 [0053]
- Marketletter 22-1 en 22-18, 1995 [0053]
- **Yang** DC *et al. J Pharmacol Exp Ther*, 1993, vol. 266 (3), 1339-47 [0053]
- 50 • *R&D Focus*, 1993, vol. 2 (37), 10 [0053]
- **Cintron** *et al. Circulation*, 1993, vol. 87 (VI), 17-23 [0060]
- 55 • **Gottlieb** *et al. J. Am. Coll. Cardiol.*, 1989, vol. 13, 1534-1539 [0064]
- **Ariens**; **Simonis**. *Molecular Pharmacology. Academic Press*, 1964, vol. 1, 119 [0085]
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published. NIH publication No 85-23, 1996 [0086]
- 60 • **Sjaastad** *et al. J. Appl. Physiol*, 2000, vol. 89, 1445-1454 [0087]
- **Skomedal** *et al. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997, vol. 280, 721-729 [0089]
- 65 • **Hoyer** *et al. Pharmacol. Rev.*, 1994, vol. 46, 157-203 [0096]
- **Kaumann**. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1994, vol. 15, 451-455 [0096]

ES 2 339 234 T3

- **Läer** *et al. Br. J. Pharmacol.*, 1998, vol. 123, 1182-1188 [0096]
- **Gale** *et al. Br. J. Pharmacol.*, 1994, vol. 111, 332-338 [0096]
- 5 • **Medhurst** *et al. Brain Res Mol Brain Res*, 2001, vol. 90, 125-134 [0099]
- **Gerald** *et al. EMBO J.*, 1995, vol. 14, 2806-2815 [0100]
- 10 • **Julius** *et al. PNAS USA*, 1990, vol. 87, 928-932 [0100]
- **Bustin** *et al. J. Mol Endocrinol*, 2000, vol. 25, 169-193 [0100]
- **Sjaastad** *et al. Acta physiol Scand*, 2003, vol. 177, 449-458 [0109]
- 15 • **Skomedal** *et al. J. Pharmacol Exp Ther*, 1997, vol. 280, 721-729 [0110]

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista del receptor 5-HT₄ para usar en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva.

2. Uso de un antagonista del receptor 5-HT₄ en la fabricación de un medicamento para tratar la insuficiencia cardiaca congestiva.

3. El antagonista o uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha insuficiencia cardiaca congestiva está **caracterizada** por la función cardiaca deteriorada debido a la disfunción sistólica o diastólica.

4. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha insuficiencia cardiaca congestiva es insuficiencia cardiaca congestiva crónica.

5. El antagonista o uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicha insuficiencia cardiaca congestiva resulta de enfermedad cardiaca isquémica, preferiblemente enfermedad cardiaca isquémica crónica o miocardiopatía no isquémica crónica (MCDI), preferiblemente miocardiopatía dilatada idiopática, y miocardiopatía debida a hipertensión.

6. El antagonista o uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicha insuficiencia cardiaca congestiva es insuficiencia cardiaca congestiva postinfarto.

7. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha insuficiencia cardiaca congestiva se clasifica en las clases II a IV de NYHA.

8. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha insuficiencia cardiaca congestiva está **caracterizada** por una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) menor de 40%.

9. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho antagonista del receptor 5-HT₄ inhibe la respuesta inotrópica del corazón a la 5-HT.

10. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho antagonista del receptor 5-HT₄ se selecciona de compuestos que comprenden una estructura de anillo aromático con un aceptor de enlace de hidrógeno como un sustituyente y un aceptor de enlace de hidrógeno como un segundo sustituyente y una amina terciaria separada por al menos 3 enlaces del anillo aromático.

11. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho antagonista del receptor 5-HT₄ comprende un anillo aromático al que está unido un grupo carbonilo, y un nitrógeno básico agregado a la cadena lateral y un átomo de oxígeno adyacente al grupo carbonilo.

12. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho antagonista del receptor 5-HT₄ se selecciona del grupo que comprende ésteres de benzoato, amidas de benzoato, imidazolopiridinas, arilcetonas, indoles, carbazimidamidas, fenilcarbamatos y fenilureas.

13. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho antagonista del receptor 5-HT₄ se selecciona del grupo que comprende 1H-indol-3-carboxilato de 1-piperidinil-etilo, SB203186; 8-amino-7-yodo-1,4-benzodioxan-5-carboxilato de (1-butil-4-piperidinil)metilo, SB207710; 1-metil-1H-indol-3-carboxilato de [1-[2-metilsulfonilaminoetil]-4-piperidinil]-metilo, GR113808; (2-metoxi-4-amino-5-cloro)benzoato de 2-dietilaminoetilo, SDZ205557; endo-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il-2,3-dihidro-6-metoxi-2-oxo-1H-bencimidazol-1-carboxilato, DAU 6285; hidrocloreuro de 1-[4-amino-5-cloro-2-(3,5-dimetoxibenciloxi)fenil]-3[1-[2-[(metilsulfonil)amino]etil]-4-piperidinil]-1-propanona, RS 39604; 8-amino-7-cloro-1,4-benzodioxano-5-carboxilato de (1-n-butil-4-piperidinil)metilo, SB 204070; hidrocloreuro de N-[(1-butil-4-piperidinil)-metil]-3,4-dihidro-2H-[1,3]oxacino[3,2-a]indol-10-carboxamida, SB 207266; (dihidrocloreuro de endo-3,9-dimetil-3,9-diazabicyclo[3.3.1]non-7-il-1H-indazol-3-carboxamida), N-3389; [hidrocloreuro de (+)-8,9-dihidro-10-metil-7-[(5-metil-4-imidazolil)metil]pirido-[1,2-a]-indol-6(7H)-ona], FK1052; 4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoato de 2-(cis-3,5-dimetil-piperidino)etilo, ML10375; [hidrocloreuro de 4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoato de 3-(piperidina-1-il)propilo], RS-23597-190; (4-piperidinil-metil-5-fluoro-2-metoxi-1H-indol-3-carboxilato de 1-[2-[(metilsulfonil)amino]etil], GR125487; R50595 (FR76530); RS100302; 1-(1-metiletil)-N-[2-[4-[tricyclo[3.3.1.1 (3,7)]dec-1-ilcarbonil]amino]-1-piperidinil]etil-1H-indazol-3-carboxamida, LY353433; A-85380; SB205800; SB 207058; SB 207226; SC-53606 y SC-56184.

14. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho antagonista es la N-[(1-butil-4-piperidinil)-metil]-3,4-dihidro-2H-[1,3]oxacino[3,2-a]indol-10-carboxamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

15. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho antagonista del receptor 5-HT₄ es un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo.

ES 2 339 234 T3

16. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicho antagonista del receptor 5-HT₄ se formula como una sal fisiológicamente aceptable.

5 17. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dicho antagonista del receptor 5-HT₄ se formula para la administración oral o la administración parenteral.

18. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que dicho antagonista del receptor 5-HT₄ bloquea la respuesta a la 5-HT.

10 19. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que se mejora la capacidad cardíaca.

20. El antagonista o uso según la reivindicación 19, en el que se aumenta la fracción de eyección ventricular.

15 21. El antagonista o uso según la reivindicación 20, en el que se aumenta la fracción ventricular izquierda.

22. El antagonista o uso según la reivindicación 19, en el que la mejora de la capacidad cardíaca es una o más de las siguientes: reducción de la clase funcional de la New York Heart Association (NYHA), mejora de la capacidad de ejercicio, disminución de la presión capilar pulmonar en cuña, aumento de la frecuencia cardíaca máxima, aumento de la presión sanguínea sistólica máxima y aumento del tiempo de deceleración de la velocidad neutra.

23. El antagonista o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que se reduce el nivel en el plasma de Nt-proANP.

25 24. Un producto que comprende (a) un antagonista del receptor 5-HT₄ y (b) un segundo agente eficaz para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva.

30 25. El producto según la reivindicación 24, en el que dicho segundo agente se selecciona del grupo que consiste en diuréticos, vasodilatadores, fármacos inotrópicos, anticoagulantes, β -bloqueantes, bloqueantes de la angiotensina II o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

26. El producto según la reivindicación 25, en el que dicho segundo agente es un β -bloqueante.

35

40

45

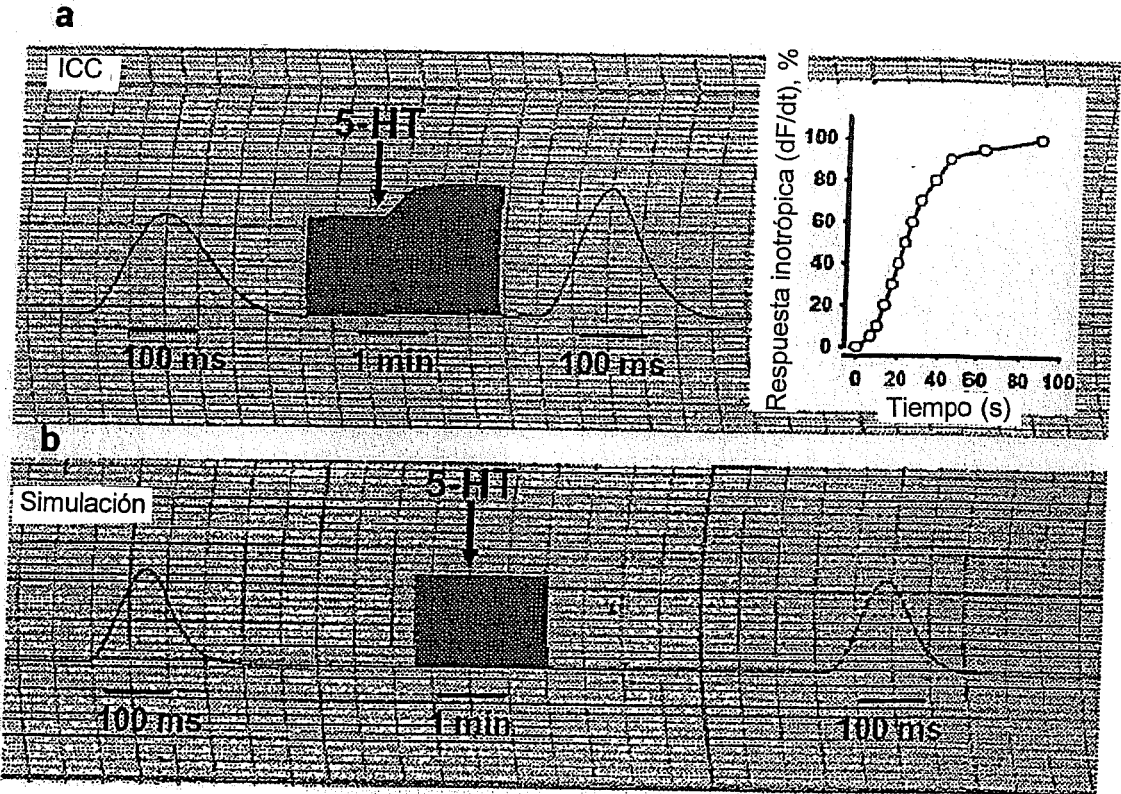
50

55

60

65

Fig. 1



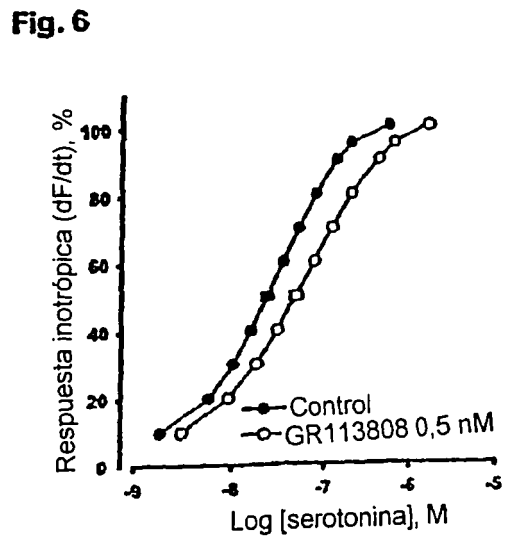
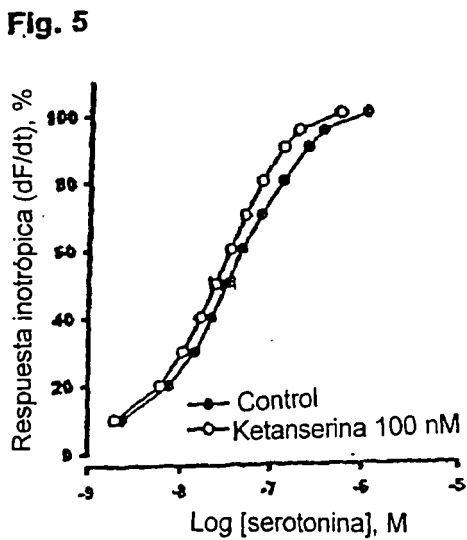
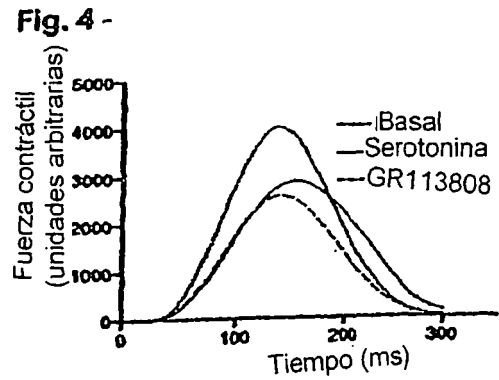
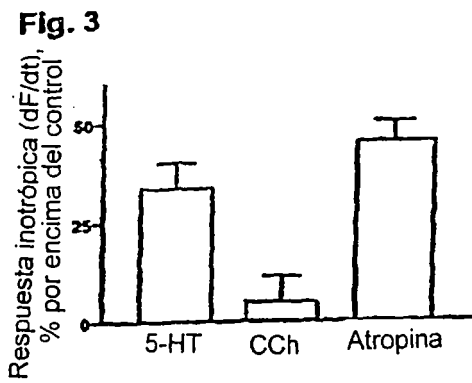
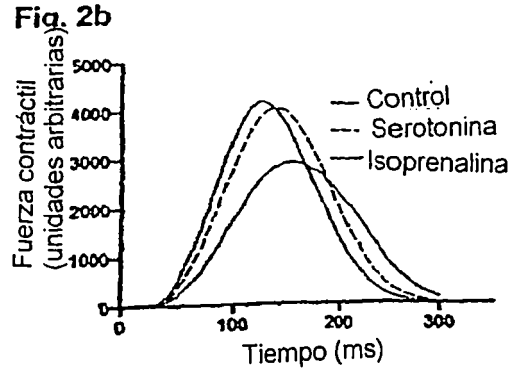
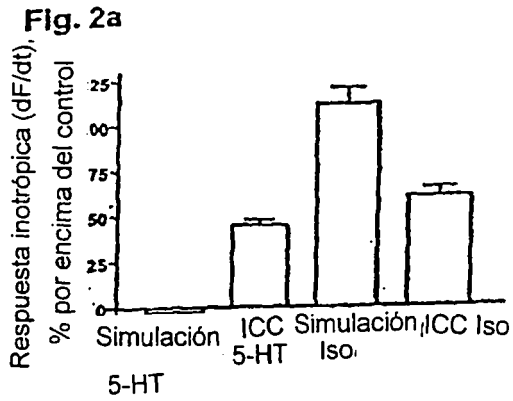


Fig. 7

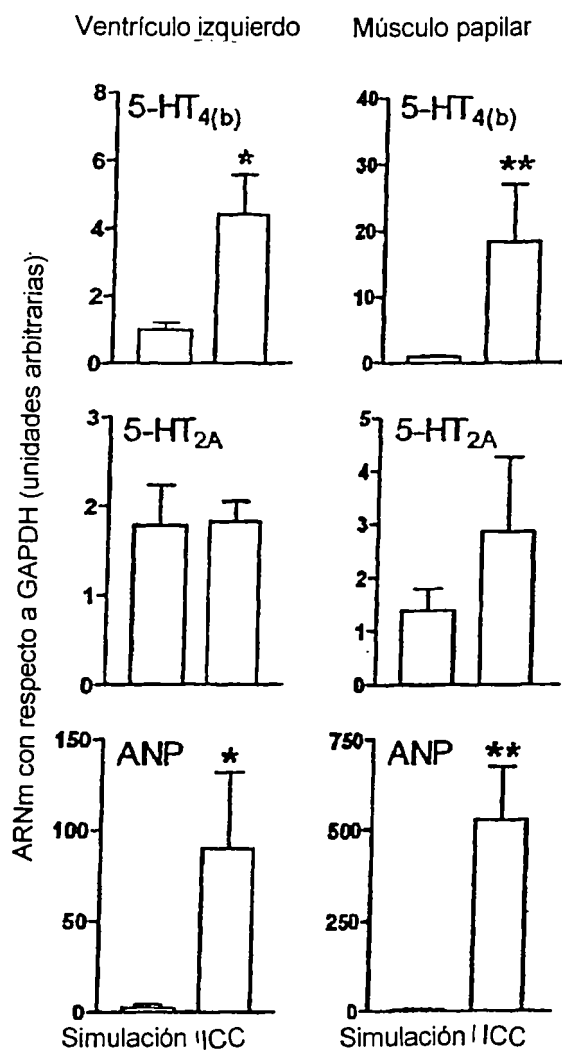


Fig. 8

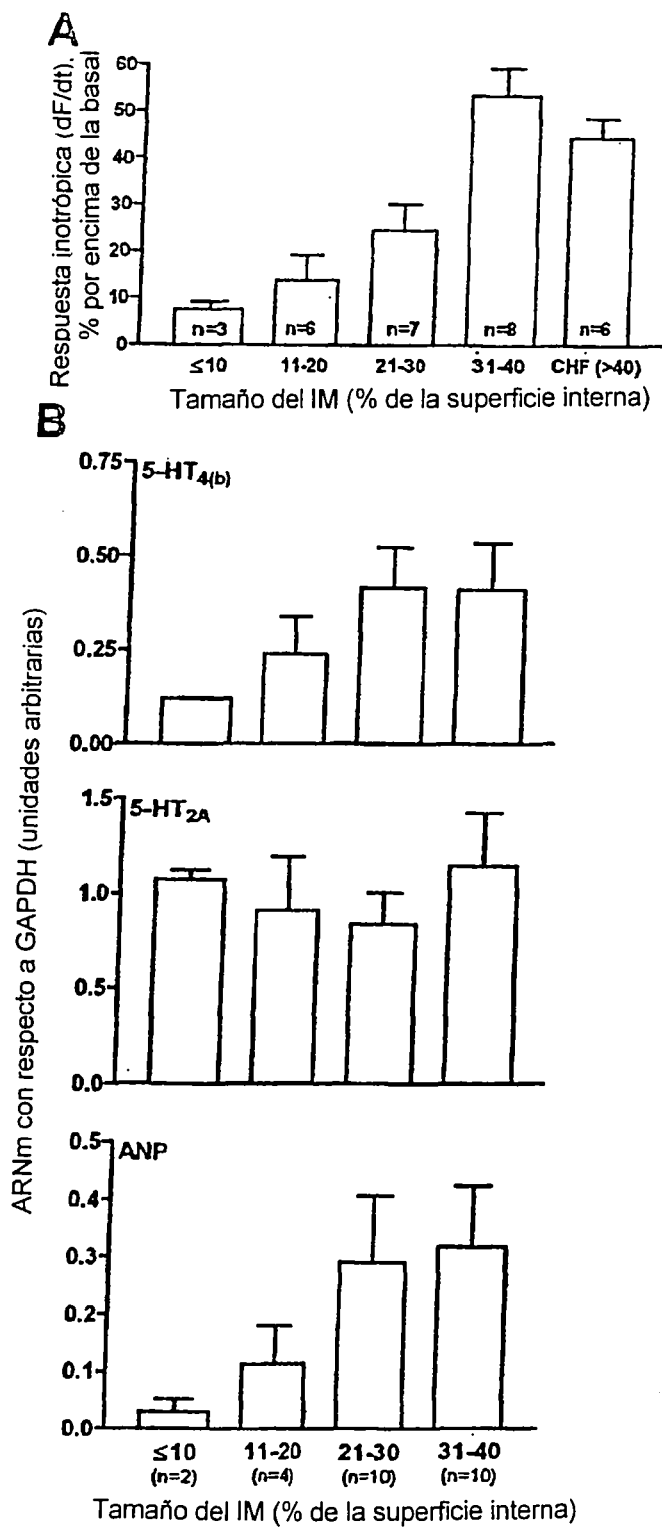


Fig. 9

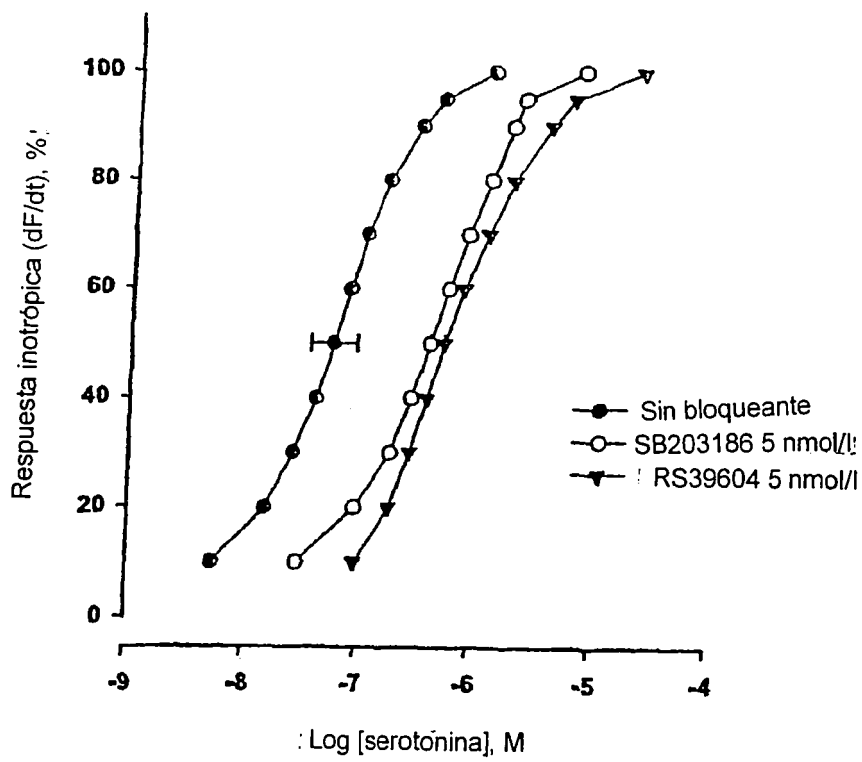


Fig. 10

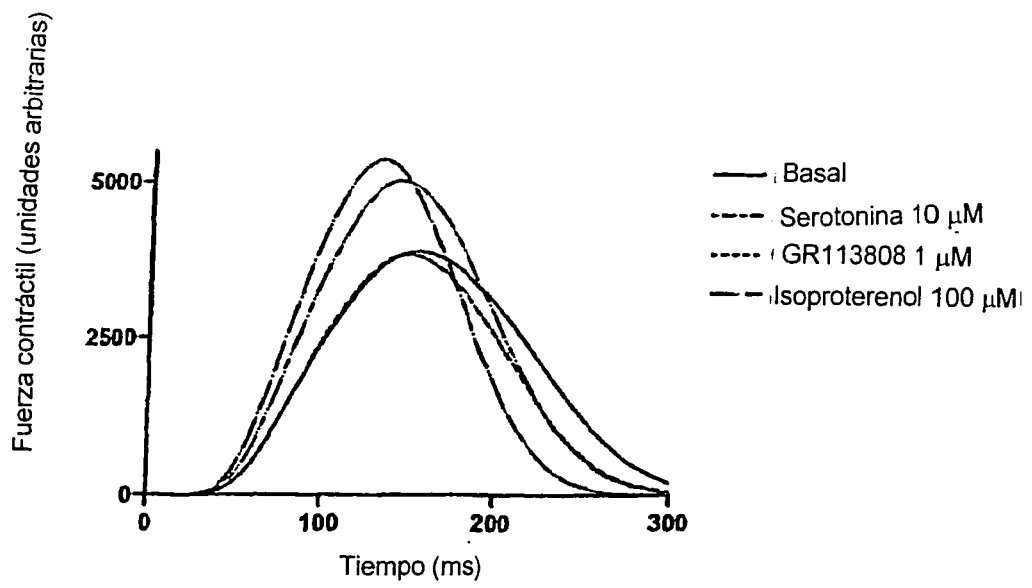


Fig. 11

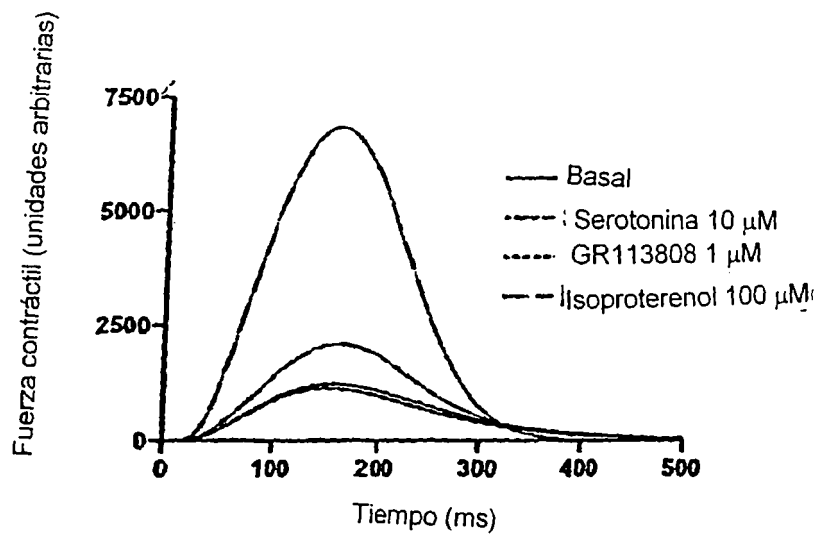


Fig. 12

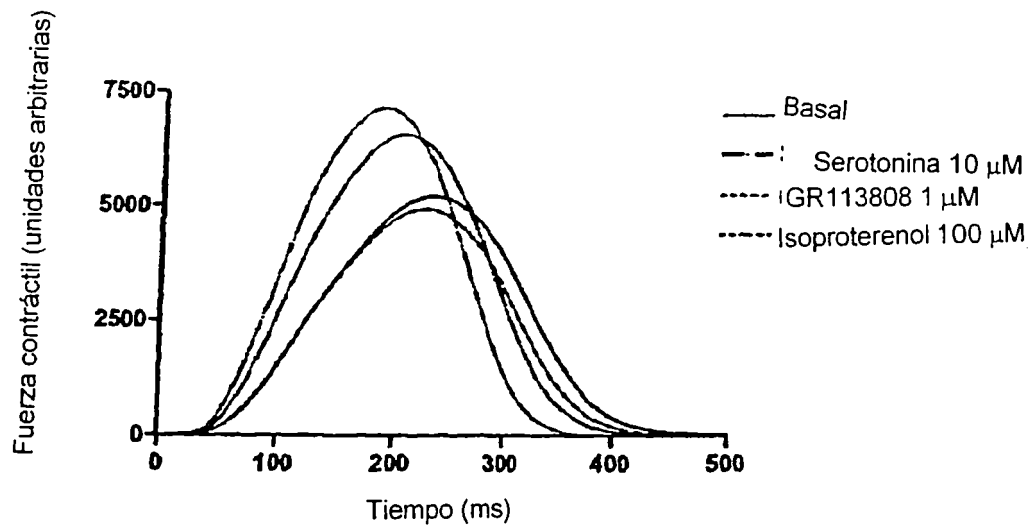


Fig. 13

