

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 252**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/352** (2006.01)

**A61P 9/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2010 E 10817681 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2477494**

54 Título: **Ligandos de Na/K-ATPasa, antagonistas de ouabaína, ensayos y uso de los mismos**

30 Prioridad:

**16.09.2009 US 243036 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.12.2015**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF TOLEDO (100.0%)  
A University Instrumentality of the State of Ohio,  
2801 W. Bancroft Avenue  
Toledo, OH 43606, US**

72 Inventor/es:

**XIE, ZI-JIAN;  
SHAPIRO, JOSEPH I.;  
SI, SHUYI y  
ZHANG, ZHONGBING**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 555 252 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

Ligandos de Na/K-ATPasa, antagonistas de ouabaína, ensayos y uso de los mismos

5 **Campo técnico y****Aplicabilidad industrial de la invención**

La presente invención se refiere a ligandos de Na/K-ATPasa y a usos de los mismos.

10

**Antecedentes**

La Na/K-ATPasa, también conocida como bomba de sodio, es una enzima de membrana ubicua que transporta Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> a través de la membrana plasmática hidrolizando ATP. Pertenece a la familia de ATPasas de tipo P que transitan entre los estados conformacionales E1 y E2 durante los ciclos de bombeo. La enzima funcional está compuesta principalmente por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  es el componente catalítico de la holoenzima y contiene los sitios de unión tanto al nucleótido como al catión. De forma interesante, los estudios durante los últimos pocos años han descubierto numerosas funciones no relacionadas con el bombeo de la Na/K-ATPasa tales como transducción de señal. Específicamente, la señalización de Na/K-ATPasa reside en las caveolas e interactúa con diversas proteínas de señalización tales como Src, receptor de IP3 y caveolina-1. Aunque la interacción entre la Na/K-ATPasa y el receptor de IP3 facilita la señalización de Ca<sup>2+</sup>, la asociación dinámica entre Na/K-ATPasa y Src regula la actividad celular de Src y hace posible que los esteroides cardiotónicos estimulen las cascadas de proteína quinasas.

15

20

25

Los esteroides cardiotónicos (CTS) incluyen fármacos de digitalis derivados de plantas tales como digoxina y ouabaína, y agliconas derivadas de vertebrados tales como bufalina y marinobufagenina (MBG).

Aunque los CTS se han considerado solo como fármacos desde su descubrimiento, los estudios recientes han identificado tanto la ouabaína como la MBG como esteroides endógenos cuya producción y secreción están reguladas por múltiples estímulos incluyendo angiotensina II y hormona adrenocorticotrópica (ACTH). De los CTS circulantes que se han identificado y caracterizado, la ouabaína sigue siendo la más estudiada. Además, las concentraciones de CTS aumentaron considerablemente en condiciones clínicas de alta carga de sal, insuficiencia renal crónica (CRF), e insuficiencia cardíaca congestiva (CHF). Clínicamente, los fármacos de digitalis se pueden usar para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva debido a que poseen efectos inotrópicos bien documentados sobre el corazón.

30

35

Clínicamente, estos esteroides se pueden usar para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva debido a que poseen efectos inotrópicos bien documentados sobre el corazón. Se conoce que la Na/K-ATPasa sirve como receptor para estos esteroides. Aunque la unión de CTS a la Na/K-ATPasa inhibe la función de bombeo, estimula la función de señalización de Na/K-ATPasa. Por ejemplo, la unión de ouabaína al complejo receptor de Na/K-ATPasa/Src estimula la quinasa Src. La Src activada, a su vez, trans-activa tirosina quinasas receptoras tales como el receptor de EGF (EGFR) y convierte la señal de la tirosina quinasas en la estimulación de serina/treonina quinasas, lípido quinasas y lipasas así como en el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). De forma interesante, aunque la inhibición de Na/K-ATPasa por CTS es esencial para que estos fármacos aumenten la función contráctil cardíaca, la estimulación de las proteína quinasas y el posterior aumento de la producción de ROS debido a estos esteroides también causa hipertrofia cardíaca y fibrosis en estudios animales.

40

45

Varios de los coinventores del presente documento han descubierto "Ligando de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa", como se desvela en el documento de solicitud pendiente de Estados Unidos con n.º de serie 12/087.976 presentado el 31 de julio de 2008 (que reivindica la prioridad del documento de Patente PCT/US07/002365, presentado el 30 de enero de 2007 (Pub. n.º WO 2007/089688 del 9 de agosto de 2007), que reivindica la prioridad del documento de Estados Unidos con n.º de serie 60/763.783 presentado el 31 de enero de 2006).

50

Varios de los coinventores del presente documento han descubierto "Inhibidores peptídicos específicos de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa/activadores de Src y la familia de quinasas Src", como se desvela en el documento de solicitud pendiente de Estados Unidos con n.º de serie 12/446.856 presentado el 23 de abril de 2009 (que reivindica la prioridad del documento de Patente PCT/US07/023011, presentado el 17 de octubre de 2007 (Pub. n.º WO 2008/054792 del 8 de mayo de 2008), que reivindica la prioridad del documento de Estados Unidos con n.º de serie 60/855.482 presentado el 16 de octubre de 2006).

55

60

Además, varios de los coinventores del presente documento han descubierto "Métodos de regulación de la expresión de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa y usos de los mismos como terapia para cáncer", como se desvela en el documento de solicitud pendiente de Estados Unidos con n.º de serie 61/109.386 presentado el 28 de octubre de 2008.

65

Además, varios de los coinventores del presente documento han descubierto "Péptidos derivados de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa como antagonistas de CTS y como agentes terapéuticos para cáncer", como se desvela en el documento

de solicitud pendiente de Estados Unidos con n.º de serie 61/122.205, presentado el 12 de diciembre de 2008.

## Sumario

5 En un amplio aspecto se proporciona en el presente documento una nueva clase de compuestos que son diferentes de los esteroides cardiotónicos (CTS), donde tales compuestos inhiben Na/K-ATPasa sin activar proteína quinasas.

En otro amplio aspecto, se proporciona en el presente documento una clase de compuestos que comprenden ligandos de Na/K-ATPasa que regulan la función de bombeo de iones de Na/K-ATPasa.

10 En otro amplio aspecto, se proporciona en el presente documento una clase de compuestos que comprenden ligandos de Na/K-ATPasa que antagonizan la activación inducida por CTS de cascadas de proteína quinasas.

15 Diversos objetivos y ventajas de la presente invención se harán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada de la realización preferente, cuando se lea a la luz de las figuras acompañantes.

## Breve descripción de las figuras

20 **Figura 1A:** gráficos que muestran las curvas de concentración para ouabaína (**Figura 1A-superior**) y MB7 (3,4,5,6-Tetrahidroxixantona) (**Figura 1A-inferior**).

**Figura 1B:** estructuras químicas de xantona (izquierda) y quercetina (derecha).

25 **Figuras 2A-2B:** efectos de MB7 en Na<sup>+</sup> (**Figura 2A**) y dependencia de ATP (**Figura 2B**). La actividad de Na/K-ATPasa se midió como se describe en "Procedimientos Experimentales" en función de la concentración de Na<sup>+</sup> o ATP. MB7 se usó a 10 µM.

30 **Figura 3:** efectos de MB7 y ouabaína en el complejo receptor de Na/K-ATPasa/Src. La Na/K-ATPasa purificada (2 µg) y la Src purificada se incubaron en presencia de ouabaína 10 µM o MB7 1 y 10 µM durante 15 min y se sometieron al ensayo para la activación de Src como se describe en "Procedimientos Experimentales". Los valores son el promedio SE de al menos tres experimentos independientes. \*\* p < 0,01 comparado con el control.

35 **Figura 4A:** efectos de MB7 y ouabaína en Src y ERK. Se trataron células A549 con ouabaína o MB7 durante 10 min y los lisatos celulares (50 µg/pista) se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron para la activación de Src como en la **Figura 3**. Los valores son el promedio ± 6 S.E. a partir de cuatro experimentos distintos. \*, p < 0,05 frente al control.

40 **Figura 4B:** se trataron células LLC-PK1 con MB7 o ouabaína durante 10 minutos y se inmunotñieron con el kit de ensayo basado en células de fosforilación/translocación de ERK/MAPK (Fosfo-Thr202/Tyr204) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las imágenes se recogieron como se describe en "Procedimientos Experimentales". La barra de escala representa 50 µM. Se muestran las imágenes de un experimento representativo. Los datos cuantitativos de p-ERK se recogieron de 40 campos diferentes en tres experimentos independientes y se expresan como el promedio ± 6 S.E. \*, p < 0,05 frente al control.

45 **Figura 5A:** esquema de Albers-Post para el ciclo de bombeo de Na/K-ATPasa.

50 **Figura 5B:** modelización de la interacción de Na/K-ATPasa/Src. El dominio A (N-terminal y CD2) en la Na/K-ATPasa se marcó en color azul, el dominio P en color verde, el dominio N en color negro. El dominio SH2 de Src se marcó en color naranja, el dominio de quinasa en color azul claro.

55 **Figura 6A:** efectos de los cambios en las concentraciones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en la actividad del receptor de Na/K-ATPasa/Src. Se suspendió Na/K-ATPasa purificada (2 µg) en tampón Tris/HCl (pH 7,4) con concentraciones de iones indicadas y se incubó con c-Src purificada durante 15 minutos. A continuación se añadió Mg<sup>2+</sup>/ATP 3 mM a la mezcla de reacción y se incubó durante otros 10 minutos. Las muestras se analizaron mediante transferencia de Western. Los valores son el promedio ± SE de cuatro experimentos separados.

60 **Figura 6B:** efectos de K<sup>+</sup> en la actividad del receptor Na/K-ATPasa/Src. El ensayo se llevó a cabo como en la **Figura 6A** en presencia de NaCl 15 mM y diferentes concentraciones de KCl según se indica. Se muestra una transferencia de Western representativa de tres experimentos distintos.

**Figuras 7A-7C:** inhibición dependiente de dosis de Na/K-ATPasa mediante MB5: **Figura 7A:** la inhibición de dos fases de afinidad tanto baja como alta. **Figuras 7B-7C:** la respuesta a dosis de inhibición de alta afinidad mediante MB5 (**Figura 7B**) y MB7 (**Figura 7C**), observándose que MB5 es más potente que MB7.

65 **Figura 8:** efectos de MB5 en la unión de ouabaína a la Na/K-ATPasa purificada. La Na/K-ATPasa purificada (2 µg) se incubó con <sup>3</sup>H ouabaína 20 nM en presencia de diferentes concentraciones de MB5.

**Figura 9A:** efectos de MB5 en ERK. Se expusieron células LLC-PK1 a diferentes concentraciones de MB5 (1 nM, 10  $\mu$ M) durante 10 min, y a continuación se sometieron a ensayo para ERK activas como se describe en "Procedimientos Experimentales". Se muestra un conjunto de imágenes representativo. Los mismos experimentos se repitieron tres veces.

**Figura 9B:** efectos de MB5 en la activación inducida por ouabaína de ERK. Se trataron previamente células LLC-PK1 con diferentes concentraciones de MB5 (1 nM, 10  $\mu$ M) durante 15 min, se expusieron a ouabaína 1 nM durante 10 min, y se sometieron a ensayo para ERK activas como en la **Figura 9A**. Se muestra un conjunto de imágenes representativo.

**Figura 9C:** efectos de MB5 en la activación inducida por ouabaína de ERK. Se trataron previamente células LLC-PK1 con diferentes concentraciones de MB5 (1 nM, 10  $\mu$ M) durante 15 min, se expusieron a ouabaína 100 nM durante 10 min, y se sometieron a ensayo para ERK activas como en la **Figura 9A**. Se muestra un conjunto de imágenes representativo.

**Figura 9D:** efectos de MB5 en la activación inducida por ouabaína de ERK. Se trataron previamente células LLC-PK1 con diferentes concentraciones de MB5 (1 nM, 10  $\mu$ M) durante 15 min, se expusieron a ouabaína 1 nM durante 1 hora, y se sometieron a ensayo para ERK activas como en la **Figura 9A**. Se muestra un conjunto de imágenes representativo.

**Figura 9E:** efectos de MB5 en la activación inducida por estímulos de ERK. Se trataron previamente células LLC-PK1 con diferentes concentraciones de MB5 (1 nM, 10  $\mu$ M) durante 15 min, se expusieron a estímulos de factor de crecimiento epidérmico (EGF) o Dopamina durante 10 o 3 min, y se sometieron a ensayo para ERK activas como en la **Figura 9A**. Se muestra un conjunto de imágenes representativo.

## Descripción detallada

La invención se refiere a la materia objeto definida en las reivindicaciones.

La presente invención se basa al menos en parte, en el descubrimiento de los inventores de un nuevo mecanismo molecular de regulación de Src mediado por Na/K-ATPasa y la identificación de derivados de hidroxil xantona que: i) reducen las afinidades tanto de Na<sup>+</sup> como de ATP en Na/K-ATPasa, y ii) actúan como antagonistas que pueden suprimir la activación inducida por ouabaína de las cascadas de quinasas.

La presente invención se ilustra adicionalmente en los siguientes Ejemplos, entre los que todas las partes y porcentajes son en peso y los grados son Celsius, a menos que se indica otra cosa.

## EJEMPLO I

**Materiales:** se obtuvieron ATP y ouabaína en Sigma (St. Louis, MO). Biomol Green se adquirió en BIOMOL (Plymouth Meeting, PA). El kit de ensayo basado en células de fosforilación/translocación de ERK/MAPK (Fosfo-Thr202/Tyr204) se adquirió en Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). La Src recombinante purificada se obtuvo en Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). El anticuerpo policlonal anti-Tyr(P)418-Src se obtuvo en Invitrogen (Camarillo, CA). El anticuerpo monoclonal anti-c-Src (B-12) fue de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Los compuestos químicos comunes fueron de la más alta pureza disponible. Se adquirieron riñones de cerdo frescos en un matadero cercano, y se almacenaron a -80 °C hasta su uso para la preparación de enzimas.

**Ensayo de análisis sistemático de alto rendimiento:** la librería química usada para el análisis sistemático en el presente estudio contenía 2600 compuestos orgánicos de origen natural, de tipo fármaco, estructuralmente diversos o sus derivados semisintéticos. Los compuestos de reserva se prepararon en placas de 96 pocillos a 10 mg/ml en DMSO.

La Na/K-ATPasa purificada se preparó a partir de riñón de cerdo. Las actividades específicas de Na/K-ATPasa de las diversas preparaciones de riñón estuvieron en el intervalo de 900-1.200  $\mu$ mol/mg/h, que fue mayor de un 95 % de la actividad de ATPasa total. El análisis sistemático de alto rendimiento se llevó a cabo en un formato de 96 pocillos con un volumen de reacción final de 100  $\mu$ l que contenía los siguientes componentes: NaCl 100 mM, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) y 0,2  $\mu$ g de Na/K-ATPasa purificada. Después de que los compuestos se hubieran añadido, las mezclas se incubaron durante 15 min a 37 °C durante 15 min y la reacción se inició por adición de mezcla de ATP.Mg 2 mM.

Las reacciones se llevaron a cabo durante 15 min y a continuación se pararon por adición de 100  $\mu$ l de ácido trifluoroacético enfriado en hielo. Las mezclas de reacción se aclararon por centrifugación, y se sometieron a ensayo para fosfato liberado usando el reactivo BIOMOL GREEN™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Además, la actividad de control de Na/K-ATPasa se midió en presencia y ausencia de ouabaína 1 mM, y se tomó como un 100 %. Además, se incluyeron ouabaína 5  $\mu$ M y 0,1 % de DMSO en cada placa como control positivo y control de vehículo, respectivamente. Los experimentos de control mostraron que la hidrólisis de ATP catalizada por

la Na/K-ATPasa estuvo en un intervalo lineal en 30 min de incubación en las condiciones experimentales anteriores.

Células cultivadas: se obtuvieron las células de epitelio de riñón de cerdo (células LLC-PK1) y las células de cáncer de pulmón humano (células A549) del ATCC y se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) en presencia de 10 % de FBS, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomycin en una incubadora humidificada con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Para eliminar el efecto de confusión de factores de crecimiento en el suero, las células se privaron de suero durante 24 h antes de los experimentos a menos que se indique otra cosa.

Análisis por transferencia de Western: las células se lavaron con PBS y se solubilizaron en tampón RIPA enfriado en hielo que contenía un 1 % de Nonidet P-40, 1 % de desoxicolato sódico, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, NaF 1 mM, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina, y Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) como se ha descrito previamente (13). Los lisatos celulares se aclararon a continuación por centrifugación a 14.000 rpm, y los sobrenadantes se usaron para el análisis de proteínas y se sometieron a análisis de transferencia de Western. Las muestras se separaron sobre SDS-PAGE (50 µg/pista) y se transfirieron a una membrana de celulosa. Las membranas se bloquearon con un 3 % de leche seca no grasa para Src total y ERK o 1 % de BSA más 1 % de leche seca no grasa para Src fosforilada y ERK en TBST (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20, 0,1 %; pH 8,0) durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación se investigaron con anticuerpos específicos. Las señales de proteínas se detectaron usando un kit ECL y se cuantificaron usando un densitómetro de formación de imágenes Bio-Rad GS-670.

Ensayo para la activación del complejo de receptor de Na/K-ATPasa/Src: se sometió a ensayo la actividad del complejo de receptor de Na/K-ATPasa/Src. En resumen, se incubó Src purificada (4,5 U) con 2 µg de la Na/K-ATPasa purificada en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 min a 37 °C. Después de esto, se expuso el complejo Na/K-ATPasa/Src a ouabaína o MB7 durante 10 min. La reacción se inició por adición de ATP/Mg<sup>2+</sup> 2 mM, continuó durante 5 min a 37 °C y se detuvo por adición de tampón de muestra SDS. La activación de Src se midió por transferencia de Western usando anticuerpo anti-pY418. También se investigó la Src total para control de carga.

Formación de imagen confocal e inmunocitoquímica: las células LLC-PK1 cultivadas en portaobjetos se privaron de suero durante 24 h y se trataron con MB7 u ouabaína durante diferentes tiempos. Se llevó a cabo inmunotinción de pERK usando el kit de ensayo basado en células de fosforilación/translocación de ERK/MAPK (Fosfo-Thr202/Tyr204) disponible en el mercado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las señales se detectaron en un microscopio confocal de Leica. Se usó software confocal de Leica para el análisis de datos.

Análisis de datos: los datos se dan como el promedio ± S.E. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el ensayo t de Student y la significación se aceptó para p < 0,05.

#### RESULTADO para el EJEMPLO I

Análisis sistemático de alto rendimiento de inhibidores de Na/K-ATPasa: para analizar sistemáticamente una librería química para inhibidores de Na/K-ATPasa, los inventores del presente documento desarrollaron un ensayo en formato de 96 pocillos.

Como se representa en la **Figura 1A**, la ouabaína, como control positivo, produjo una inhibición dependiente de dosis de Na/K-ATPasa. Por otra parte, el DMSO, el vehículo, no mostró ningún efecto en la actividad de Na/K-ATPasa cuando se usó a una concentración inferior a un 1 % del volumen de reacción (no se muestran los datos). El valor de Cl<sub>50</sub> aparente para la ouabaína fue aproximadamente 5 µM, comparable con lo que se informó. Se usó el mismo ensayo para someter a ensayo un total de 2600 compuestos a la concentración final de 10 µg/ml. Esta concentración se adaptó debido a que la mayoría de los compuestos tiene una masa molecular de aproximadamente 200, sometiéndose a ensayo de ese modo a aproximadamente 50 µM, 10 veces el valor de Cl<sub>50</sub> de la ouabaína. La ouabaína (5 µM) se usó como control positivo mientras que DMSO al 0,1 % se usó como control negativo en una placa de 96 pocillos. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado y el compuesto que produjo al menos un 25 % de inhibición de Na/K-ATPasa se identificó como impacto positivo. En estas condiciones experimentales, se descubrió un total de 15 compuestos positivos (**Tabla I** posterior) que incluyen varios inhibidores de Na/K-ATPasa bien conocidos (miricetina, oligomicina, resibufogenina y cinobufagina).

Tabla I - Inhibidores de Na/K-ATPasa identificados mediante análisis sistemático de alto rendimiento		
n.º de muestra	Nombre	Fórmula
2006BD3	Clorhidrato de metaciclina	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ·HCl
2006BC4	Mitomicina	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
2008BB8	Tirotricina	Mezcla

2006BC9	4-Epitetraciclina	$C_{22}H_{24}N_2O_8$
2018BF7	Miricetina	$C_{15}H_{10}O_8$
2021BG2	Bromuro de domifeno	$C_{22}H_{40}NO.Br$
2035BD1	Resibufogenina	$C_{24}H_{32}O_4$
2035BA5	Cinobufagina	$C_{26}H_{34}O_6$
2036BF1	Oligomicina	$C_{45}H_{74}O_{11}$
MB1	1,3-Dihidroxixantona	$C_{13}H_8O_4$
MB2	3,4-Dihidroxixantona	$C_{13}H_8O_4$
MB3	1,3,5-Trihidroxixantona	$C_{13}H_8O_5$
MB5	3,4,5-Trihidroxixantona	$C_{13}H_8O_5$
MB6	1,3,5,6-Tetrahidroxixantona	$C_{13}H_8O_6$
MB7	3,4,5,6-Tetrahidroxixantona	$C_{13}H_8O_6$

- 5 *Identificación de hidroxixantonas como una nueva clase de ligandos de Na/K-ATPasa:* entre los quince impactos positivos, numerosos son compuestos polifenólicos incluyendo seis derivados de hidroxil xantona (MB1 a MB7) (**Tabla 1**). Estructuralmente, son similares a compuestos polifenólicos bien caracterizados tales como quercetina (**Figura 1B**). Los inventores del presente documento determinaron a continuación las propiedades inhibitoras de estas hidroxixantonas. Debido a que MB7 fue el inhibidor más potente de este grupo (**Tabla II** posterior), se usó en los siguientes estudios.

Tabla II Relación de estructura y actividad de derivados de xantona									
n.º de muestra	Posición del sustituyente								Cl <sub>50</sub> (µM)
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	
MB1	OH	H	OH	H	H	H	H	H	> 100
MB2	H	H	OH	OH	H	H	H	H	> 100
MB3	OH	H	OH	H	OH	H	H	H	65
<b>MB5</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>OH</b>	<b>OH</b>	<b>OH</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>10</b>
MB 6	OH	H	OH	H	OH	OH	H	H	60
<b>MB7</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>OH</b>	<b>OH</b>	<b>OH</b>	<b>OH</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>5</b>
MB8	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	> 100
2027BA1	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	> 100
2027BA2	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	> 100
C-017	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	> 100

- 10 En los experimentos representados en la **Figura 1A**, las curvas de respuesta a dosis de MB7 se compararon con la ouabaína. Al igual que la ouabaína, MB7 exhibió una inhibición dependiente de dosis de Na/K-ATPasa. El valor de

Cl<sub>50</sub> aparente (5 μM) es comparable al de la ouabaína. Sin embargo, cuando se determinaron los efectos de MB7 en la dependencia de sustrato, MB7, a diferencia de la ouabaína, redujo las afinidades tanto de Na<sup>+</sup> como de ATP de Na/K-ATPasa (**Figura 2A** y **Figura 2B**). Por otra parte, los cambios en la concentración de K<sup>+</sup> no mostraron ningún efecto en la inhibición inducida por MB7 de Na/K-ATPasa (no se muestran los datos), pero antagonizó la inhibición inducida por ouabaína. Además, MB7 10 μM produjo una inhibición de un 58 ± 6 % de Na-ATPasa como hizo en Na/K-ATPasa. Tomados conjuntamente, los datos muestran que las hidroxixantonas inhiben la Na/K-ATPasa a través de un mecanismo diferente del de la ouabaína.

Para determinar la relación estructura-actividad, se compararon las curvas de respuesta a dosis de xantona, seis hidroxixantonas y varios derivados de hidroxixantona metilados. Como se representa en la **Tabla II**, mientras la xantona falló en inhibir la actividad de Na/K-ATPasa, un aumento en el número de grupos fenólicos aumentó la eficacia y la potencia de las hidroxixantonas (por ejemplo, comparando MB2 con MB5, **Tabla II**). Consistentemente, la metilación total o parcial fue capaz de reducir el efecto inhibitorio de las hidroxixantonas sobre la Na/K-ATPasa (por ejemplo, comparando MB5 con MB8). Además, cuando los grupos fenólicos se posicionaron cerca del oxígeno en el anillo de pirona (es decir, en las posiciones 4 y 5), tuvieron más efecto en la potencia de estos compuestos (por ejemplo, comparando MB3 con MB5).

MB7, falla al activar el complejo de receptor Na/K-ATPasa/Src: la Na/K-ATPasa interactúa con la quinasa Src para formar un complejo receptor funcional para la ouabaína que activa las cascadas de proteína quinasas.

Para determinar si MB7 funciona como la ouabaína, capaz de activar la proteína quinasas, los inventores del presente documento midieron en primer lugar el efecto de MB7 en la actividad de Src usando un complejo de Na/K-ATPasa/Src reconstituido. Se usó ouabaína (10 μM) como control positivo. Como se representa en la **Figura 3**, la Na/K-ATPasa inhibió Src. Sorprendentemente, sin embargo, la adición de ouabaína, pero no de MB7, estimuló la Src asociada a Na/K-ATPasa en el tubo de ensayo. Este descubrimiento muestra ahora que MB7 puede inhibir la actividad de ATPasa sin estimular la función del receptor de Na/K-ATPasa.

Para verificar los resultados anteriores, se midió el efecto de MB7 en Src y ERK en células cultivadas. Se usó de nuevo ouabaína como control positivo. Como se muestra en la **Figura 4A**, mientras que la ouabaína 100 nM estimuló Src en células A549, MB7 hasta 10 μM falló en hacer lo mismo.

Para una confirmación adicional, se trataron células LLC-PK1 con ouabaína 100 nM o diferentes concentraciones de MB7. La ouabaína estimuló Src y posteriormente la cascada de ERK en células LLC-PK1. Ahora, se observa en el presente documento que la ouabaína aumentó la cantidad celular de ERK activa según se detectó mediante inmunotinción (**Figura 4B**). Sin embargo, en las mismas condiciones experimentales, MB7 (de 100 nM a 10 μM) falló en afectar la actividad de ERK celular.

#### DISCUSIÓN del EJEMPLO I

Se usó un ensayo de análisis sistemático de alto rendimiento eficaz para identificar 15 inhibidores de Na/K-ATPasa que representan varias clases estructuralmente divergentes de compuestos. Además, los inhibidores recién identificados se diferenciaron de otros inhibidores conocidos, tales como ouabaína y oligomicina, mediante la evaluación de sus efectos en la dependencia de sustrato de la Na/K-ATPasa. Los derivados de xantona recién identificados, a diferencia de la ouabaína, solo inhiben la actividad de ATPasa, pero no activan el complejo de receptor de Na/K-ATPasa/Src.

Derivado de xantona como una nueva clase de inhibidores de Na/K-ATPasa: de acuerdo con el esquema de reacción de Albers-Post, la Na/K-ATPasa transita desde los estados E1 a E2 a través de múltiples cambios conformacionales. Mientras que Na<sup>+</sup> favorece el estado E1, K<sup>+</sup> estimula el estado E2. A lo largo de los años, se han identificado varias clases de inhibidores de Na/K-ATPasa orgánicos. Inhiben la Na/K-ATPasa estabilizando la enzima en los diferentes estados conformacionales. Por ejemplo, CTS se une y estabiliza la Na/K-ATPasa en E2P mientras que la oligomicina evita la transición de E1P a E2P.

En comparación, los inventores del presente documento muestran que el nuevo ligando, MB7, parece reducir la formación de E1NaATP debido a que disminuye la afinidad aparente tanto de Na<sup>+</sup> como de ATP sin afectar la sensibilidad de K<sup>+</sup> de la Na/K-ATPasa. De forma interesante, las xantonas comparten estructuras químicas similares a los flavonoides dado que ambos comparten la misma benzopirona en su estructura (**Figura 1B**). Además, quercetina y miricetina son potentes inhibidores de Na/K-ATPasa bien conocidos. Sin embargo, a diferencia de MB7, no reducen la afinidad de la Na/K-ATPasa hacia Na<sup>+</sup> o ATP.

La fusión de un anillo de benceno con la benzopirona altera completamente las características de interacción de las xantonas con la Na/K-ATPasa, lo que recalca la especificidad de la inhibición inducida por derivados de xantona de la Na/K-ATPasa.

Además, los datos presentados en la **Tabla II** muestran la importancia de los grupos fenólicos en la inhibición inducida por derivados de xantona de la Na/K-ATPasa. El compuesto precursor de xantona no tiene ningún grupo

fenólico unido a los anillos de benceno y no mostró ninguna inhibición detectable de Na/K-ATPasa. Mientras la tetrahidroxixantona es el inhibidor más potente, las dihidroxixantonas apenas afectan la actividad de ATPasa.

5 Aunque sin el deseo de quedar unidos a la teoría alguna, los inventores del presente documento creen ahora que, dado que la Na/K-ATPasa comparte muchas características comunes con otras ATPasas de tipo P, los derivados de xantona recién identificados que se describen en el presente documento también pueden afectar a otras bombas de iones. Los inventores del presente documento también creen ahora que es probable que otros impactos positivos tales como mitomiacina y 4-epitetraciclina, representen otra clase de nuevos ligandos.

10 Los compuestos derivados de xantona tienen diferentes estructuras químicas a partir de los inhibidores de Na/K-ATPasa conocidos, y los inventores del presente documento creen ahora que son una nueva clase de inhibidores de Na/K-ATPasa que funcionan a través de un mecanismo diferente.

15 MB7 no activa el complejo de receptor de Na/K-ATPasa/Src: la Na/K-ATPasa se une a Src tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta asociación regula la actividad celular de Src manteniendo Src en un estado inactivo (11). Además, la formación del complejo de Na/K-ATPasa/Src produce un receptor funcional para la ouabaína que estimula la Src asociada a la bomba, que posteriormente se ensambla y activa múltiples cascadas de proteína quinasas corriente abajo incluyendo las ERK, como se muestra en la **Figura 4**.

20 A diferencia de la ouabaína, la unión de MB7 al complejo de Na/K-ATPasa/Src *in vitro* falló en activar Src (**Figura 3**). Consistentemente, no hubo ningún efecto en la actividad celular de Src y ERK cuando se aplicó MB7 a las células cultivadas. Este descubrimiento muestra que MB7, a diferencia de la ouabaína, falla en alterar la conformación de la Na/K-ATPasa en una forma tal que el dominio de quinasa de Src se puede liberar de la Na/K-ATPasa. MB7 inhibe la Na/K-ATPasa de una forma diferente que la ouabaína.

25 Perspectivas: el nombre xantona designa un grupo de metabolitos secundarios encontrados normalmente en un conjunto restringido de plantas, hongos y líquenes. Las xantonas de las plantas parecen estar asociadas principalmente a las familias *Polygalaceae*, *Guttiferae*, *Moraceae* y *Gentianaceae*. Estas plantas se han usado ampliamente en la medicina tradicional china. Por ejemplo, Yuanzhi, raíz de *Polygala tenuifolia* Willd. o *Polygala sibirica* L., se usa ampliamente para una diversidad de afecciones médicas. Al igual que los compuestos fenólicos, las xantonas se han descrito por sus propiedades antioxidantes. Estas propiedades se han implicado en sus acciones antiinflamatorias y quimiopreventivas. Una de las xantonas, ácido dimetilxantenona-4-acético, experimenta en la actualidad análisis clínicos como agente antitumoral.

35 Como nueva clase de inhibidores de Na/K-ATPasa, las xantonas también pueden aumentar la función contráctil cardíaca. Tales xantonas son de gran valor debido a que no estimulan el complejo de receptor de Na/K-ATPasa/Src. Esto es importante dado que la estimulación de la transducción de señal mediada por Na/K-ATPasa mediante CTS endógenos o exógenos altera el crecimiento cardíaco e induce fibrosis cardíaca.

40 Por lo tanto, ahora se cree que MB7 y sus análogos son especialmente útiles para mejorar la función contráctil sin precipitar la hipertrofia y/o fibrosis cardíaca que se observan a menudo en las afecciones clínicas de insuficiencia cardíaca congestiva.

## EJEMPLO II

45 Materiales: el ATP y la ouabaína se obtuvieron en Sigma (St. Louis, MO). Biomol Green se adquirió en BIOMOL (Plymouth Meeting, PA). El kit de ensayo basado en células de fosforilación/translocación de ERK/MAPK (Fosfo-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) se adquirió en Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). El anticuerpo policlonal anti-Tyr(P)<sup>418</sup>-Src se obtuvo en Invitrogen (Camarillo, CA). El anticuerpo monoclonal anti-c-Src (B-12) fue de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Los compuestos químicos comunes fueron de la mayor pureza posible. Se adquirieron riñones de cerdo frescos en un matadero cercano, y se almacenaron a -80 °C hasta su uso para la preparación de enzimas.

50 Purificación de Na/K-ATPasa y ensayo de actividad: la Na/K-ATPasa purificada se preparó a partir de riñón de cerdo. Las actividades específicas de Na/K-ATPasa de las diversas preparaciones de riñón estuvieron en el intervalo de 900-1.200 µmol/mg/h, que fue mayor de un 95 % de la actividad de ATPasa total. El ensayo de Na/K-ATPasa se llevó a cabo en el siguiente tampón de reacción con un volumen final de 500 µl: NaCl 100 mM, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) y 1 µg de Na/K-ATPasa purificada. Después de que los compuestos se hubieran añadido, las mezclas se incubaron durante 15 min a 37 °C durante 15 min y la reacción se inició por adición de mezcla de ATP.Mg 2 mM. Las reacciones se llevaron a cabo durante 15 min y a continuación se pararon por adición de 300 µl de ácido trifluoroacético enfriado en hielo. Las mezclas de reacción se aclararon por centrifugación, y se sometieron a ensayo para fosfato liberado usando el reactivo BIOMOL GREEN™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los experimentos de control mostraron que la hidrólisis de ATP catalizada por la Na/K-ATPasa estuvo en un intervalo lineal en los 30 min de incubación en las condiciones experimentales anteriores.

65 Células cultivadas: se obtuvieron las células de epitelio de riñón de cerdo (células LLC-PK1) y las células de cáncer de pulmón humano (células A549) del ATCC y se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) en



presencia de 10 % de FBS, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina en una incubadora humidificada con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Para eliminar el efecto de confusión de factores de crecimiento en el suero, las células se privaron de suero durante 24 h antes de los experimentos a menos que se indique otra cosa.

- 5 Ensayo de actividad de Src y análisis de transferencia de Western: se siguió el protocolo para medir los efectos de la Na/K-ATPasa y sus ligandos en la actividad de Src mediante transferencia de Western de fosforilación de pY 418 mediante Src. Para preparar los lisatos celulares para el análisis de Western, las células se lavaron con PBS y se solubilizaron en tampón RIPA enfriado en hielo que contenía un 1 % de Nonidet P-40, 1 % de desoxicolato sódico, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, NaF 1 mM, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina, y Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). Los lisatos celulares se aclararon a continuación por centrifugación a 14.000 rpm, y los sobrenadantes se usaron para el análisis de proteínas y se sometieron a análisis de transferencia de Western. Las muestras se separaron sobre SDS-PAGE (50 µg/pista) y se transfirieron a una membrana de celulosa. Las membranas se bloquearon con un 3 % de leche seca no grasa para Src total y ERK o 1 % de BSA más 1 % de leche seca no grasa para Src fosforilada y ERK en TBST (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20, 0,1 %; pH 8,0) durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación se investigaron con anticuerpos específicos. Las señales de proteínas se detectaron usando un kit ECL y se cuantificaron usando un densitómetro de formación de imágenes Bio-Rad GS-670.

20 Formación de imagen confocal e inmunocitoquímica: las células LLC-PK1 cultivadas en portaobjetos se privaron de suero durante 24 h y se trataron con MB5 u ouabaína durante diferentes tiempos. Se llevó a cabo inmunotinción de pERK usando el kit de ensayo basado en células de fosforilación/translocación de ERK/MAPK (Fosfo-Thr202/Tyr204) disponible en el mercado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las señales se detectaron en un microscopio confocal de Leica. Se usó software confocal de Leica para el análisis de datos.

25 Análisis de datos: los datos se dan como el promedio ± S.E. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el ensayo t de Student y la significación se aceptó para  $p < 0,05$ .

### RESULTADOS para el EJEMPLO II

- 30 La Na/K-ATPasa regula Src de una forma dependiente de la conformación: un gran número de Na/K-ATPasas interactúa directamente con la quinasa Src en las células vivas. La interacción implica al menos dos pares de dominios de proteínas. Específicamente, el segundo dominio citosólico de subunidad  $\mu$ l interactúa con el SH2 de Src y el dominio de unión a nucleótido (N) se asocia al dominio del quinasa de Src. Durante el ciclo de bombeo, la Na/K-ATPasa experimenta una transición conformacional de E1 a E2 (**Figura 5A**) donde el dominio N se cierra y el dominio A rota para acoplarse en el dominio N (**Figura 5B**).

La modelización estructural muestra que la ubicación de y el espacio entre los dominios A y N solo en el estado E1 son adecuados para que la subunidad  $\mu$ l se una tanto al dominio SH2 como al dominio de quinasa simultáneamente (**Figura 5B**). De ese modo, los inventores del presente documento creen ahora que, mientras que la Na/K-ATPasa E1 inhibe Src, la Src asociada a Na/K-ATPasa se debe activar cuando la enzima está en la conformación E2.

De hecho, cuando la mayoría de la Na/K-ATPasa se estabiliza en la conformación E2 por incubación de la enzima en tampón exento de Na<sup>+</sup> y con K<sup>+</sup> 5 mM (47), la Src asociada a Na/K-ATPasa se vuelve completamente activa (**Figura 6A**). Consistentemente, la adición de Na<sup>+</sup> 150 mM a este tampón de reacción desestabiliza la Na/K-ATPasa E2, lo que da como resultado la inactivación de la Src (**Figura 6A**). Además, la reducción de K<sup>+</sup> de 5 mM a 0 causó la activación gradual de Src (**Figura 6B**). Estos resultados muestran que la interacción entre Na/K-ATPasa y Src se puede regular mediante cambios en el estado conformacional de la Na/K-ATPasa. Además, la inhibición de la transición conformacional de E1 a E2 de la Na/K-ATPasa se puede usar para antagonizar la activación de Src inducida por ouabaína.

50 Los derivados de xantona son potentes inhibidores de Na/K-ATPasa y evitan que la ouabaína se una a la Na/K-ATPasa: en el EJEMPLO I se describen nuevos derivados de xantona como una clase de nuevos ligandos de Na/K-ATPasa que estabilizan la Na/K-ATPasa en la conformación E1.

55 Como se representa en las **Figuras 1 y 7A-C**, las hidroxixantonas exhibieron dos fases de inhibición de la actividad de Na/K-ATPasa. La inhibición de alta afinidad mediante MB5 se produce a concentraciones sub-nM (valor de CI<sub>50</sub> de 40 pM), produciendo aproximadamente un 25 % de inhibición de la actividad de ATPasa, mientras que la unión de baja afinidad produce un 100 % de inhibición a aproximadamente 50 µM. Es interesante observar que mientras MB5 es más potente que MB7 en el sitio de alta afinidad, tiene una potencia menor en el sitio de baja afinidad. Debido a que la ouabaína prefiere unirse a la Na/K-ATPasa E2, la estabilización de la Na/K-ATPasa en el estado E1 por MB5 se puede usar para antagonizar la unión de ouabaína. De hecho, como se representa en la **Figura 8**, MB5 produjo una inhibición dependiente de dosis de la unión de ouabaína a la Na/K-ATPasa purificada. Se detectó una inhibición considerable a 0,1 nM y se alcanzó la inhibición máxima de un 30 % cuando la Na/K-ATPasa se expuso a MB5 10 µM.

65 MB5 antagonizó la activación de proteína inducida por ouabaína, pero no por EGF ni dopamina

Quinasas: la ouabaína estimula las cascadas de proteína quinasas a través de una ruta dependiente de Src en células LLC-PK1. Para determinar si MB5 puede antagonizar la transducción de señal inducida por ouabaína, las células LLC-PK1 tratadas se trataron previamente con diferentes concentraciones de MB5 durante 15 min y a continuación se expusieron a ouabaína u otros estímulos.

5 Como se muestra en las **Figuras 9A-9D**, mientras que la ouabaína (1 nM y 100 nM) estimuló las ERK de una forma dependiente del tiempo y la concentración, MB5 a 1 nM fue capaz de reducir considerablemente la activación inducida por ouabaína de las ERK. Además, cuando se usó MB5 a 10  $\mu$ M, bloqueó completamente el efecto de la ouabaína en las ERK en células LLC-PK1.

10 Por el contrario, cuando se llevaron a cabo los mismos experimentos en presencia de EGF o dopamina, MB5 falló en afectar la activación de ERK inducida por estos dos estímulos (**Figura 9E**).

15 Tomados conjuntamente, estos datos muestran que MB5 puede funcionar como un antagonista específico de ouabaína frente a la activación de las cascadas de proteína quinasas.

### DISCUSIÓN del EJEMPLO II

20 El complejo de receptor de Na/K-ATPasa/Src se puede activar cuando la Na/K-ATPasa se estabiliza en la conformación E2, mientras que la Na/K-ATPasa E1 mantiene la Src en un estado inactivo.

En el presente documento se describe un ensayo de análisis sistemático de alto rendimiento eficaz para compuestos químicos que pueden regular las funciones tanto de bombeo como de señalización de Na/K-ATPasa.

25 El ensayo de alto rendimiento (como se describe en el EJEMPLO I) es útil para identificar compuestos químicos/composiciones que afectan la transición conformacional E1/E2, como se refleja mediante la inhibición de la Na/K-ATPasa. Los compuestos químicos/composiciones identificados se pueden someter a ensayo a continuación como agonistas o antagonistas del complejo de receptor de Na/K-ATPasa/Src como sigue a continuación: como agonistas, tales compuestos químicos/composiciones funcionarían como la ouabaína y sus efectos inhibidores en la Na/K-ATPasa se podrían antagonizar por aumento de la concentración de  $K^+$ . Por otra parte, como antagonistas actuarían como MB5, evitando que la ouabaína se una a la Na/K-ATPasa. Además, su efecto inhibitor sobre Na/K-ATPasa se podría reducir por aumento de la concentración de  $Na^+$ .

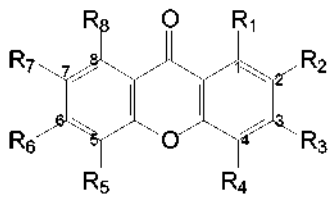
35 Además, en el presente documento se describe la identificación de una clase de nuevos y potentes antagonistas de ouabaína que evitan que la ouabaína active el complejo de receptor de Na/K-ATPasa/Src. Posteriormente, los antagonistas de ouabaína también suprimen la activación inducida por ouabaína de las ERK.

40 Estos resultados son significativos para al menos las siguientes consideraciones: 1) los complejos de Na/K-ATPasa y/o los complejos de Na/K-ATPasa/Src son útiles para analizar sistemáticamente nuevos agonistas y antagonistas; 2) los derivados de xantona, como se describe en el presente documento, son útiles como medicaciones para antagonizar cambios patológicos inducidos por la elevación de CTS endógeno que incluyen, por ejemplo, remodelación cardiovascular y renal así como fibrosis cardiaca y renal; 3) los derivados de xantona, como se describen en el presente documento, son útiles como medicaciones para tratar la insuficiencia cardiaca congestiva debido a que no solo mejoran la función contráctil sino que también evitan la remodelación estructural en el miocardio; 4) los derivados de xantona, como se describen en el presente documento, son útiles como medicaciones para tratar cáncer de próstata y otros cánceres debido a que la señalización de Na/K-ATPasa es importante para el crecimiento de estas células cancerosas; y, 5) los derivados de xantona son útiles para la nueva generación de antagonistas del receptor de Na/K-ATPasa que serán más potentes, menos tóxicos y tendrán mejores propiedades farmacocinéticas que las composiciones disponibles en la actualidad.

50 Aunque la invención se ha descrito por referencia a realizaciones diversas y preferentes, los expertos en la materia deberían entender que se pueden realizar diversos cambios y se pueden sustituir equivalentes por elementos de las mismas sin apartarse del alcance esencial de la invención. Además, se pueden realizar numerosas modificaciones para adaptar una situación o material particular a las enseñanzas de la invención sin apartarse del alcance esencial de la misma. Por lo tanto, se pretende que la invención no quede limitada a la realización particular desvelada en el presente documento contemplada para llevar a cabo la presente invención, sino que la invención incluirá todas las realizaciones que entren dentro del alcance de las reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un ligando de Na/K-ATPasa, que comprende al menos un derivado de hidroxil xantona que tiene la estructura:



5

en la que  $R_1 = R_2 = R_6 = R_7 = R_8 = H$ , y  $R_3 = R_4 = R_5 = OH$ , concretamente 3,4,5-trihidroxixantona (MB5); o  $R_1 = R_2 = R_7 = R_8 = H$ , y  $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = OH$ , concretamente 3,4,5,6-tetrahidroxixantona (MB7), para su uso en el tratamiento de hipertrofia cardiaca, fibrosis tisular y/o insuficiencia cardiaca congestiva.

10

2. Un ligando de Na/K-ATPasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que  $R_1 = R_2 = R_6 = R_7 = R_8 = H$ , y  $R_3 = R_4 = R_5 = OH$ , concretamente 3,4,5-trihidroxixantona (MB5).

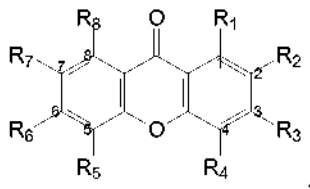
15

3. Un ligando de Na/K-ATPasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que  $R_1 = R_2 = R_7 = R_8 = H$ , y  $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = OH$ , concretamente 3,4,5,6-tetrahidroxixantona (MB7).

20

4. Una composición para su uso en el tratamiento de hipertrofia cardiaca, fibrosis tisular o insuficiencia cardiaca congestiva mediante la fijación como diana del complejo receptor de Na/K-ATPasa/Src y la antagonización de las cascadas de proteína quinasas inducidas por esteroides cardiotónicos en una o mas células con necesidad del mismo, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz de:

al menos un ligando de Na/K-ATPasa que tiene la estructura:



25

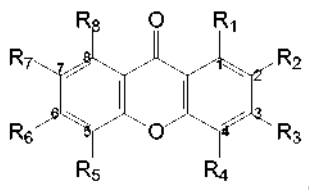
en la que  $R_1 = R_2 = R_6 = R_7 = R_8 = H$ , y  $R_3 = R_4 = R_5 = OH$ , concretamente 3,4,5-trihidroxixantona (MB5); o  $R_1 = R_2 = R_7 = R_8 = H$ , y  $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = OH$ , concretamente 3,4,5,6-tetrahidroxixantona (MB7).

30

5. Una composición para su uso en el tratamiento de hipertrofia cardiaca, fibrosis tisular o insuficiencia cardiaca congestiva mediante la fijación como diana selectivamente de la agrupación de interacción de Na/K-ATPasa de Src y de funcionamiento como un antagonista eficaz de ouabaina en una o mas células con necesidad del mismo, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz de:

35

al menos un ligando de Na/K-ATPasa que tiene la estructura:



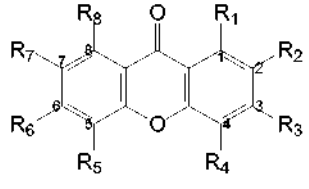
40

en la que  $R_1 = R_2 = R_6 = R_7 = R_8 = H$ , y  $R_3 = R_4 = R_5 = OH$ , concretamente 3,4,5-trihidroxixantona (MB5); o  $R_1 = R_2 = R_7 = R_8 = H$ , y  $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = OH$ , concretamente 3,4,5,6-tetrahidroxixantona (MB7).

6. Una composición terapéutica para su uso en el tratamiento de hipertrofia cardiaca, fibrosis tisular o insuficiencia cardiaca congestiva donde el receptor de Na/K-ATPasa/Src está sobreestimulado, comprendiendo dicha

composición una cantidad eficaz de:

al menos un ligando de Na/K-ATPasa que tiene la estructura:

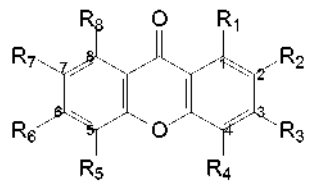


5

en la que  $R_1 = R_2 = R_6 = R_7 = R_8 = H$ , y  $R_3 = R_4 = R_5 = OH$ , concretamente 3,4,5-trihidroxixantona (MB5); o  $R_1 = R_2 = R_7 = R_8 = H$ , y  $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = OH$ , concretamente 3,4,5,6-tetrahidroxixantona (MB7).

- 10 7. Una composición para su uso en la prevención de la ruta de señalización provocada por CTS en un sujeto con necesidad de la misma, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz de:

al menos un ligando de Na/K-ATPasa que tiene la estructura:



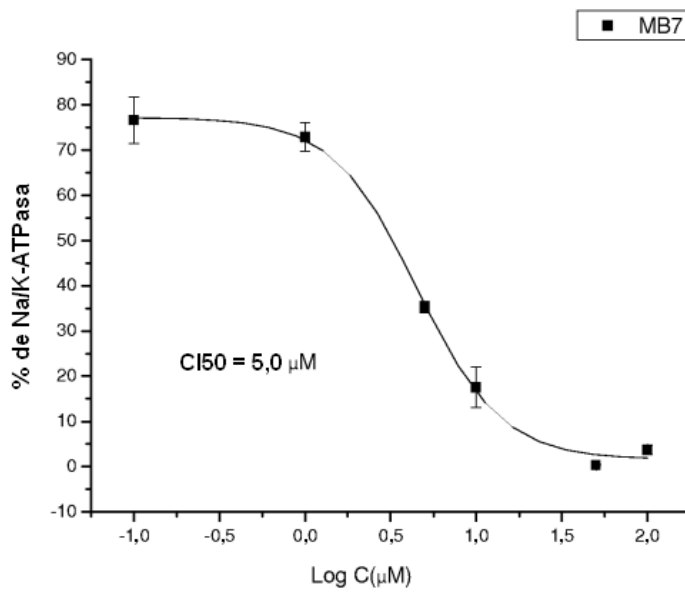
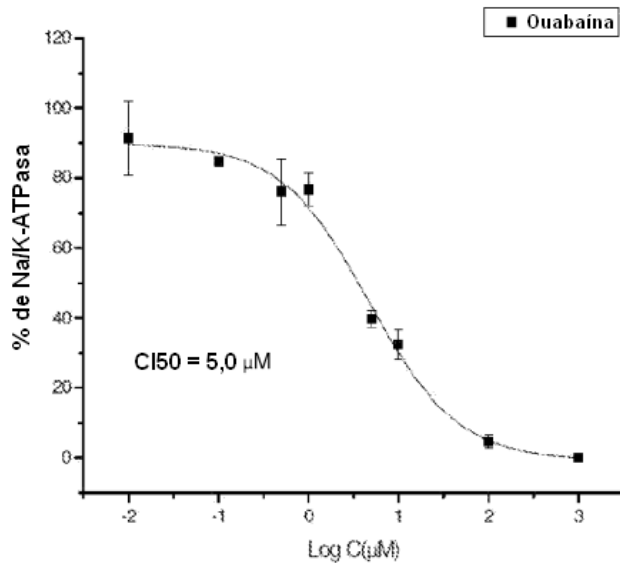
15

en la que  $R_1 = R_2 = R_6 = R_7 = R_8 = H$ , y  $R_3 = R_4 = R_5 = OH$ , concretamente 3,4,5-trihidroxixantona (MB5); o  $R_1 = R_2 = R_7 = R_8 = H$ , y  $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = OH$ , concretamente 3,4,5,6-tetrahidroxixantona (MB7).

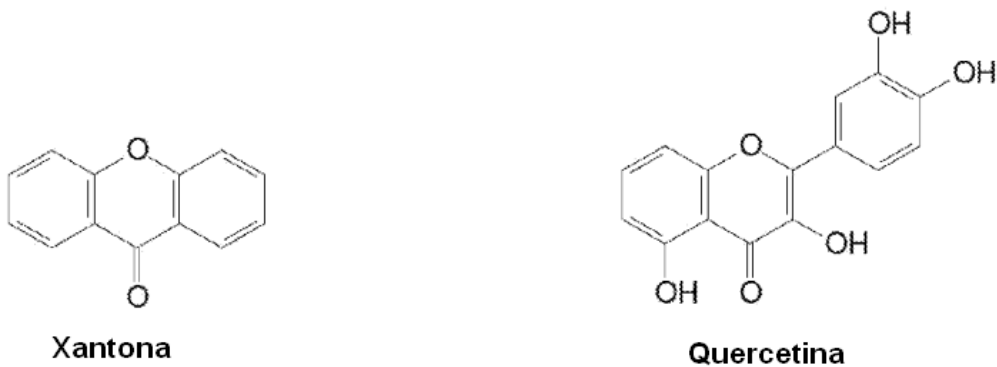
- 20 8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende además un vehículo fisiológicamente aceptable.

9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende además: un vehículo, diluyente, o excipiente apropiado.

25



**Figura 1A**



**Figura 1B**

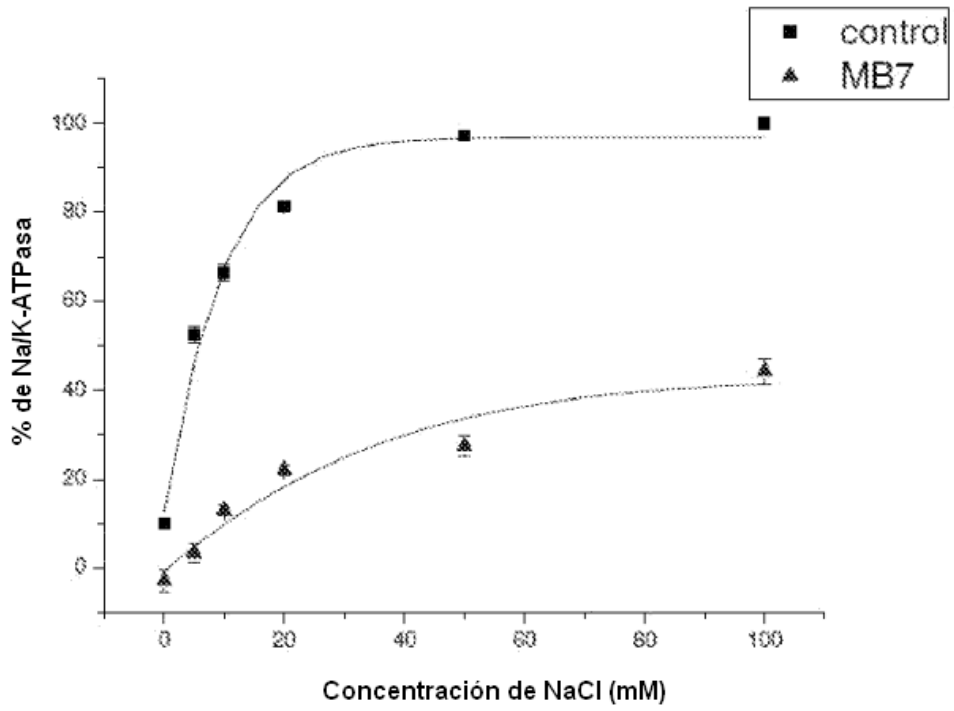


Figura 2A

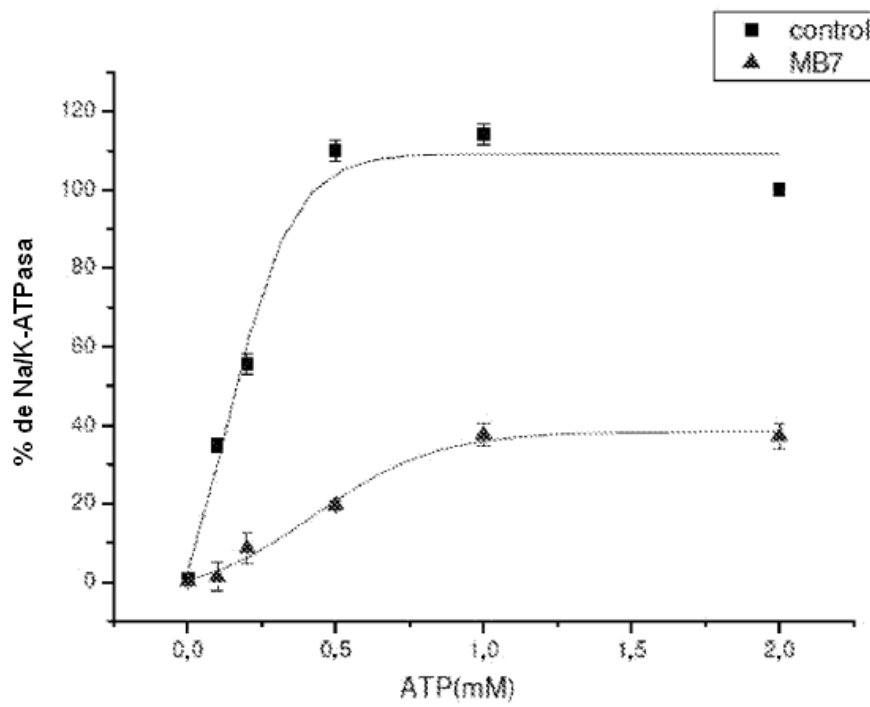
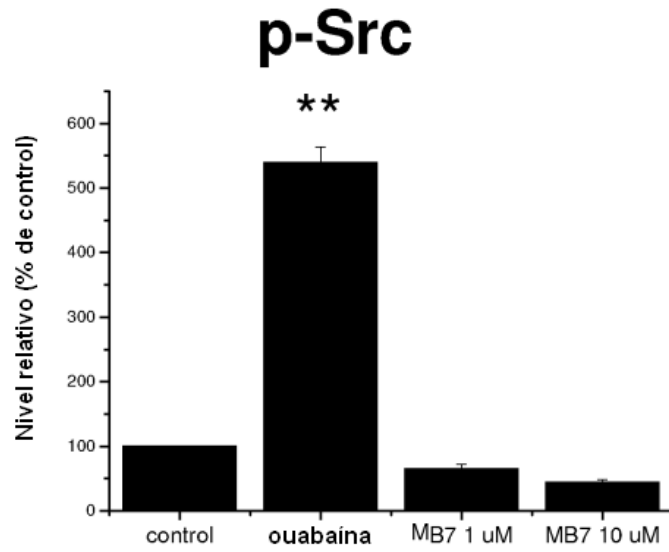
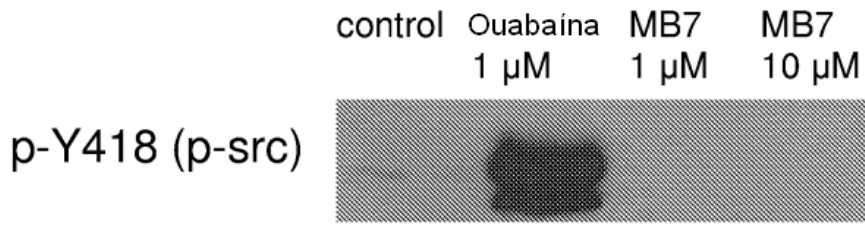
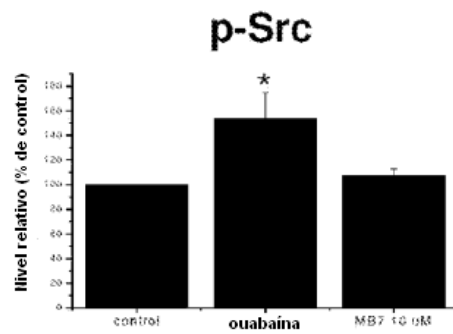
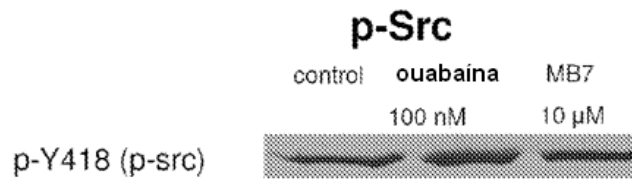


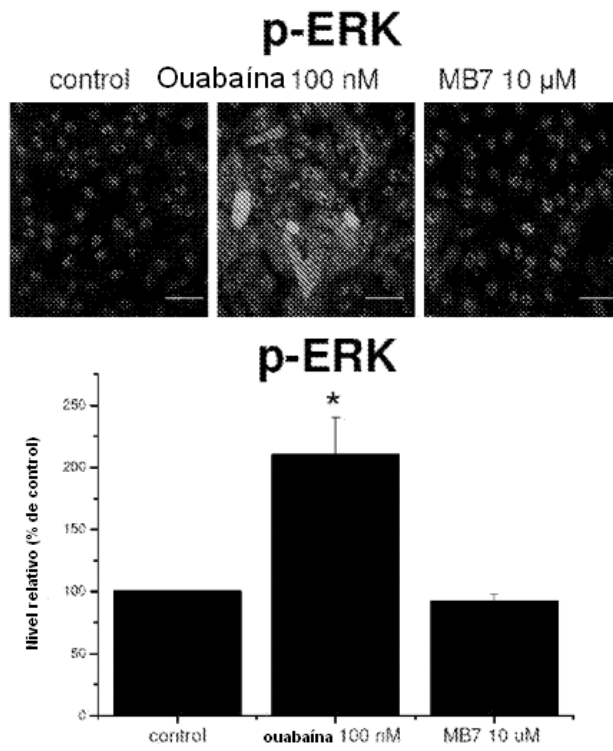
Figura 2B



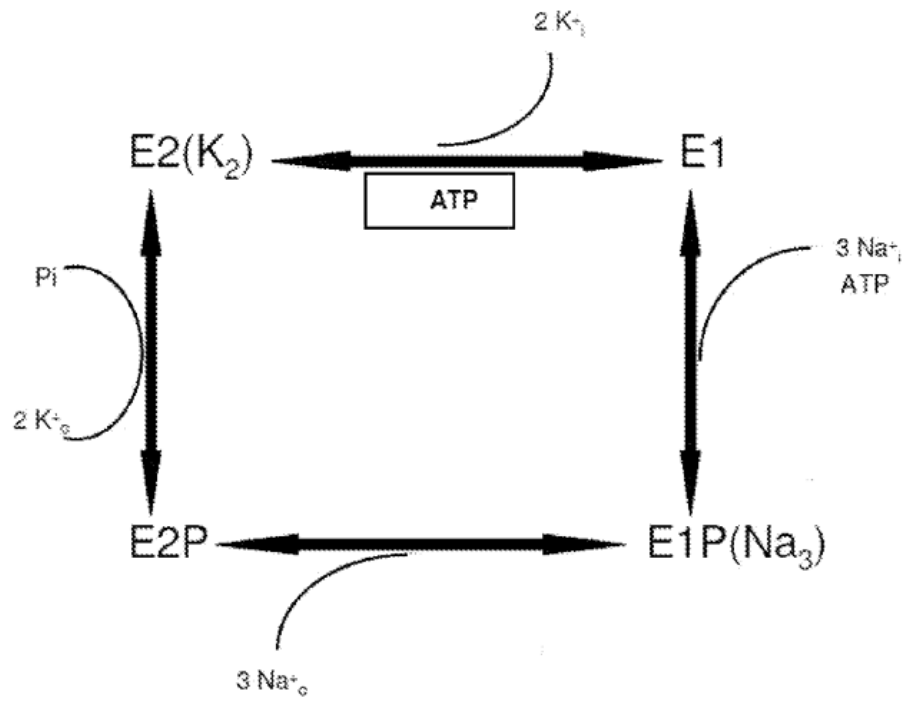
**Figura 3**



**Figura 4A**



**Figura 4B**



**Figura 5A**



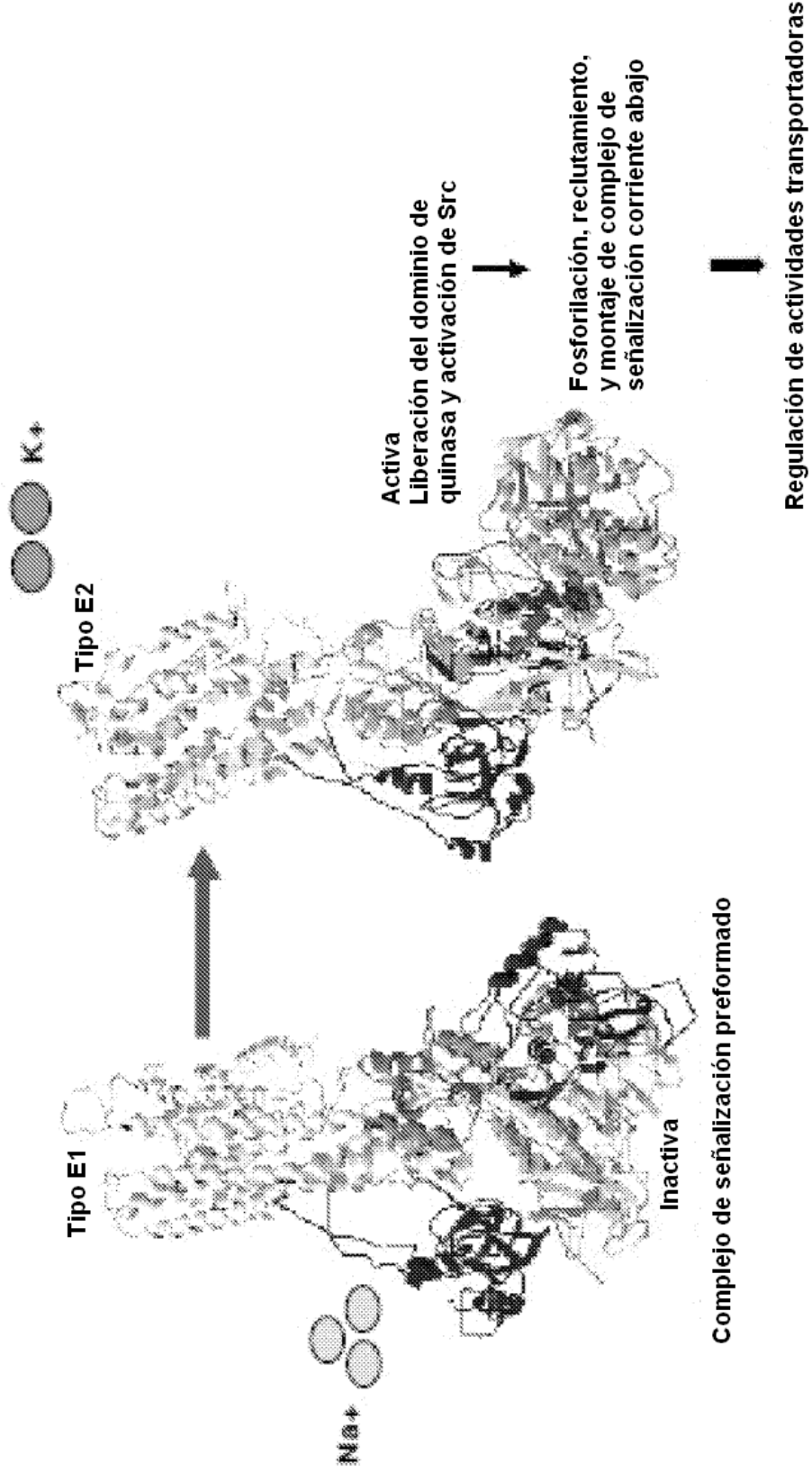


Figura 5B

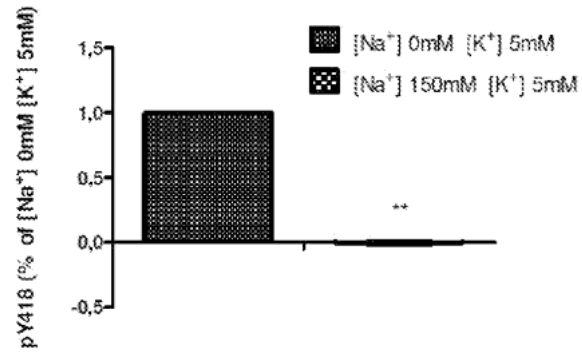


Figura 6A

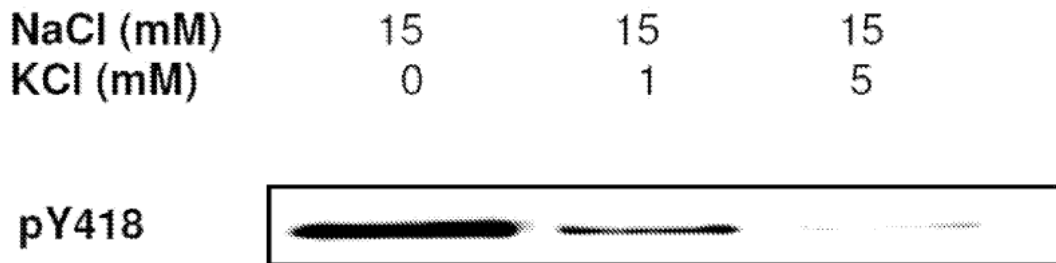


Figura 6B

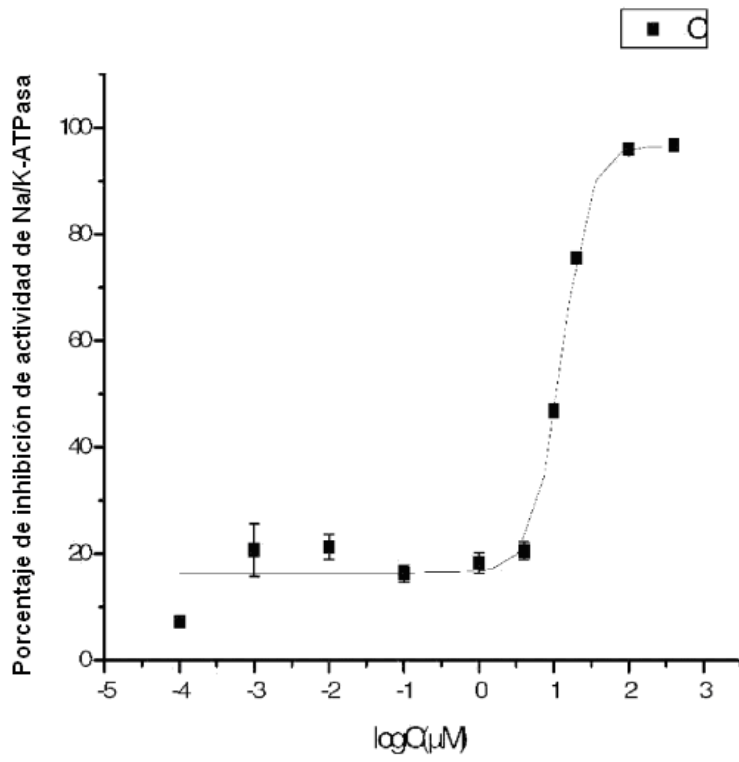


Figura 7A

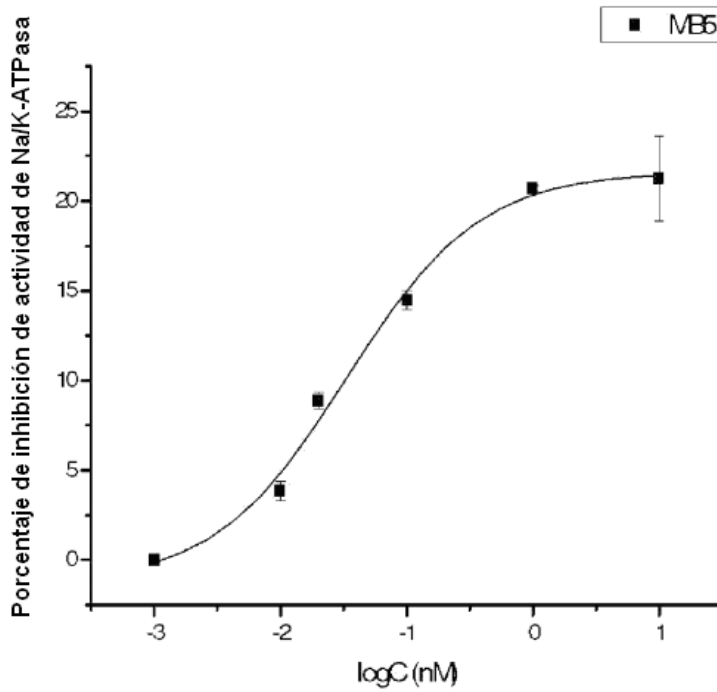


Figura 7B

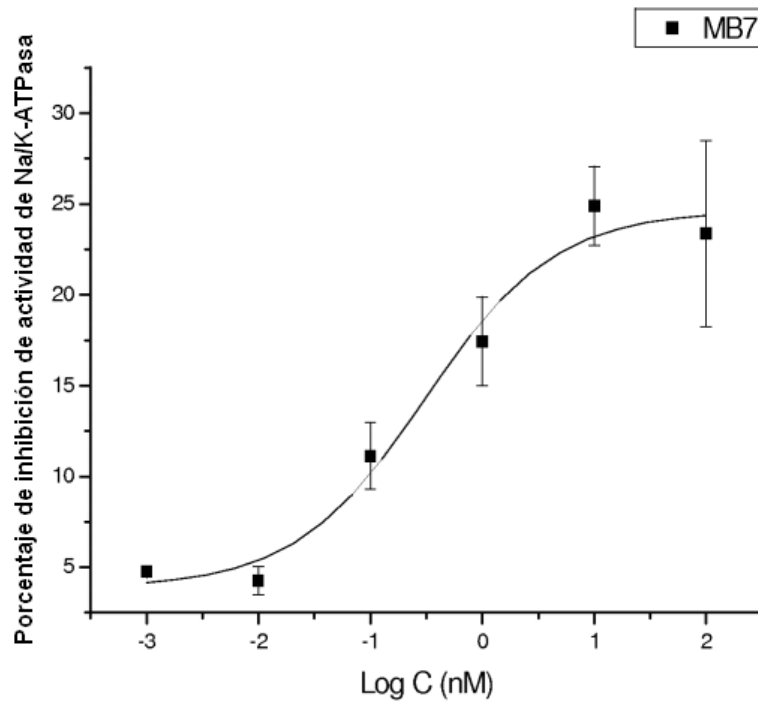


Figura 7C

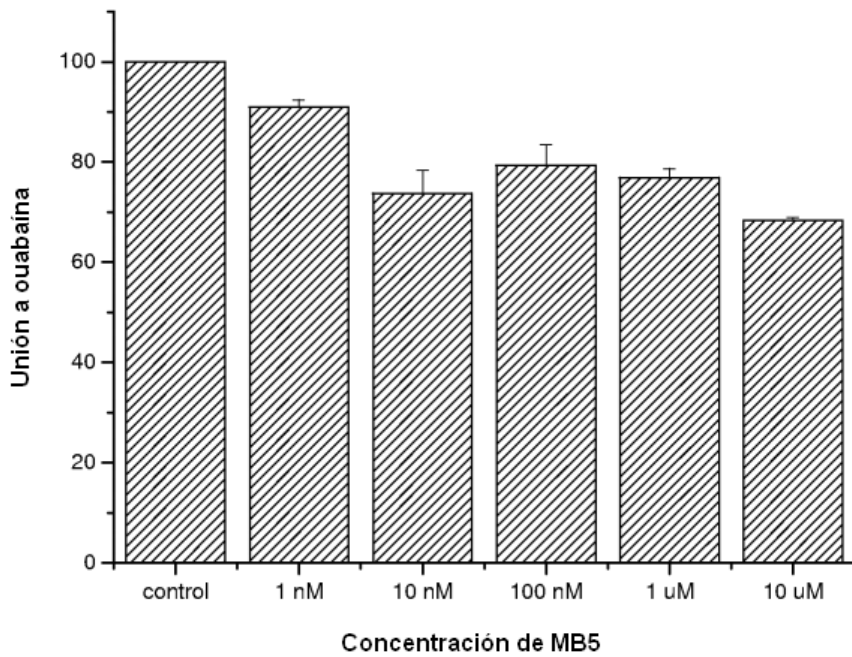
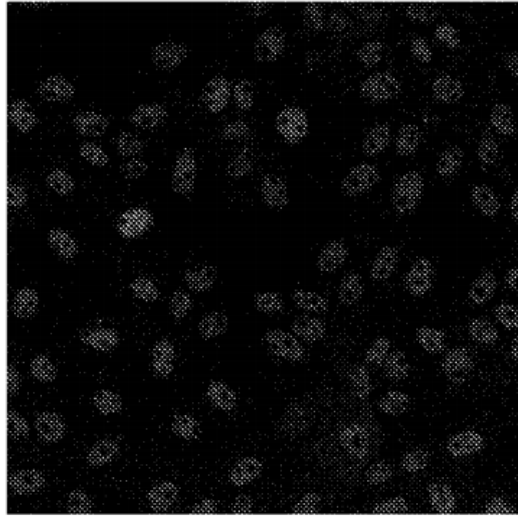
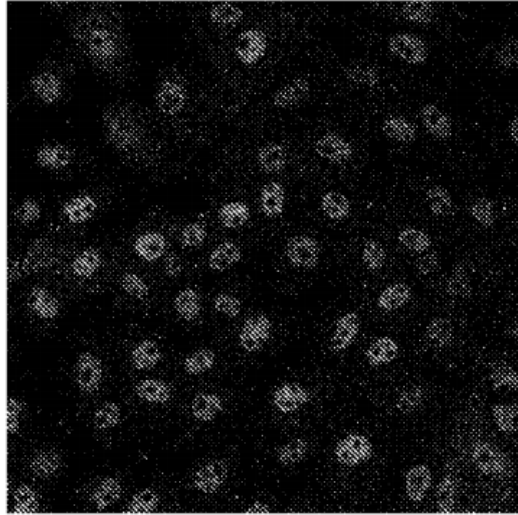


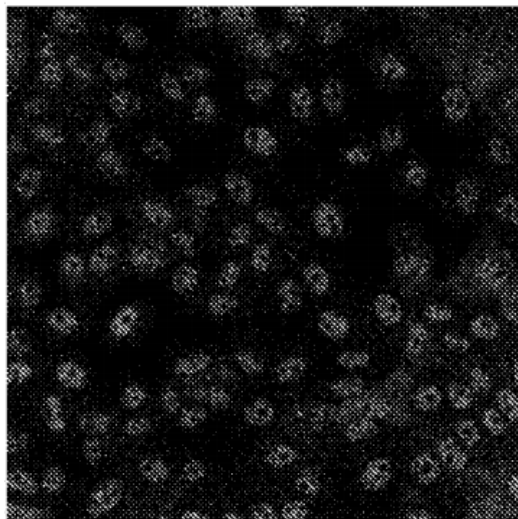
Figura 8



MB5 10 uM 10min

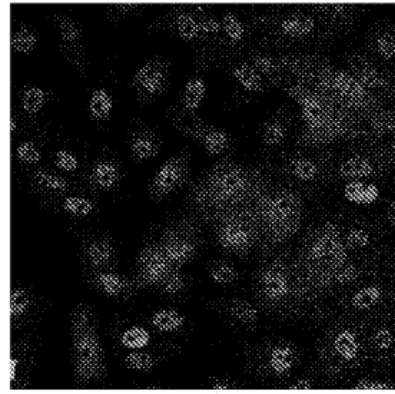


MB5 1nM 10min

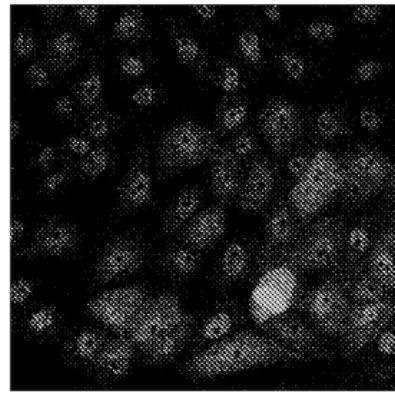


control

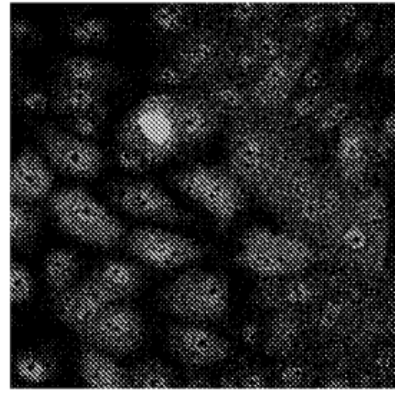
**Figura 9A**



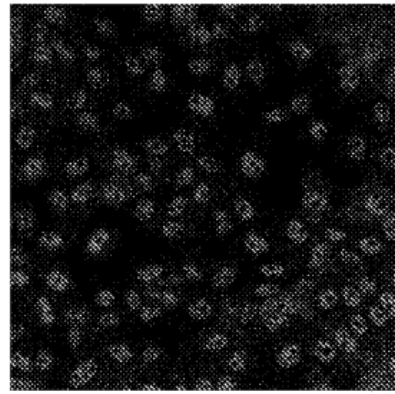
Ouabaina 1 nM MB5 10μM  
10min



Ouabaina 1 nM MB5 1 nM  
10min

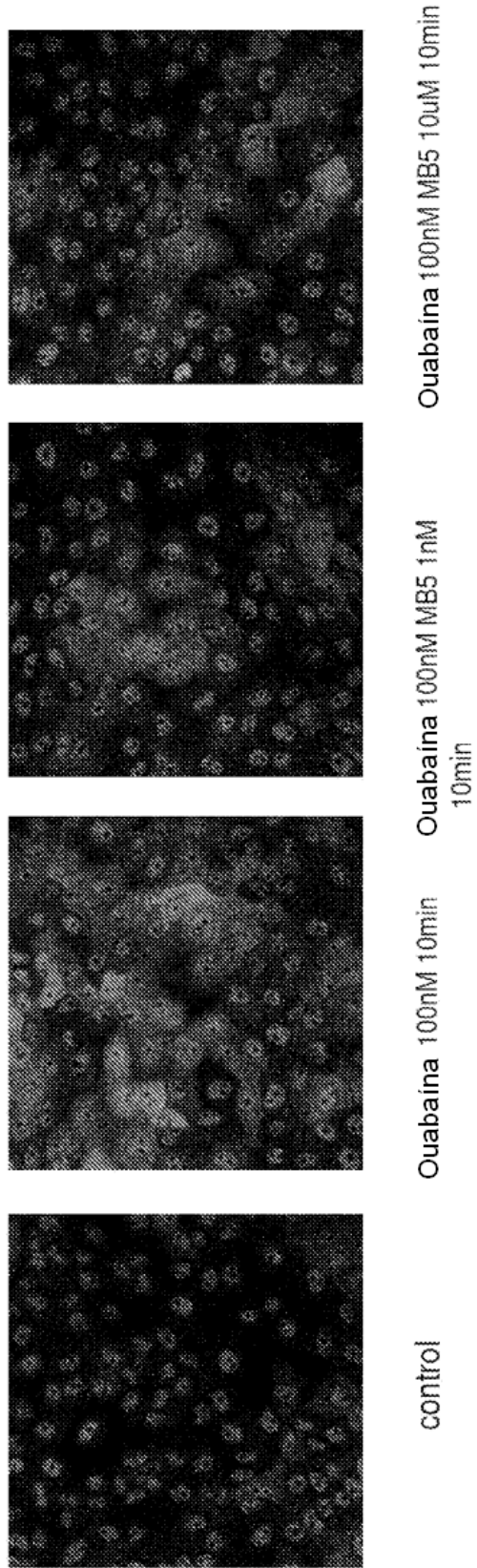


Ouabaina 1 nM 10min

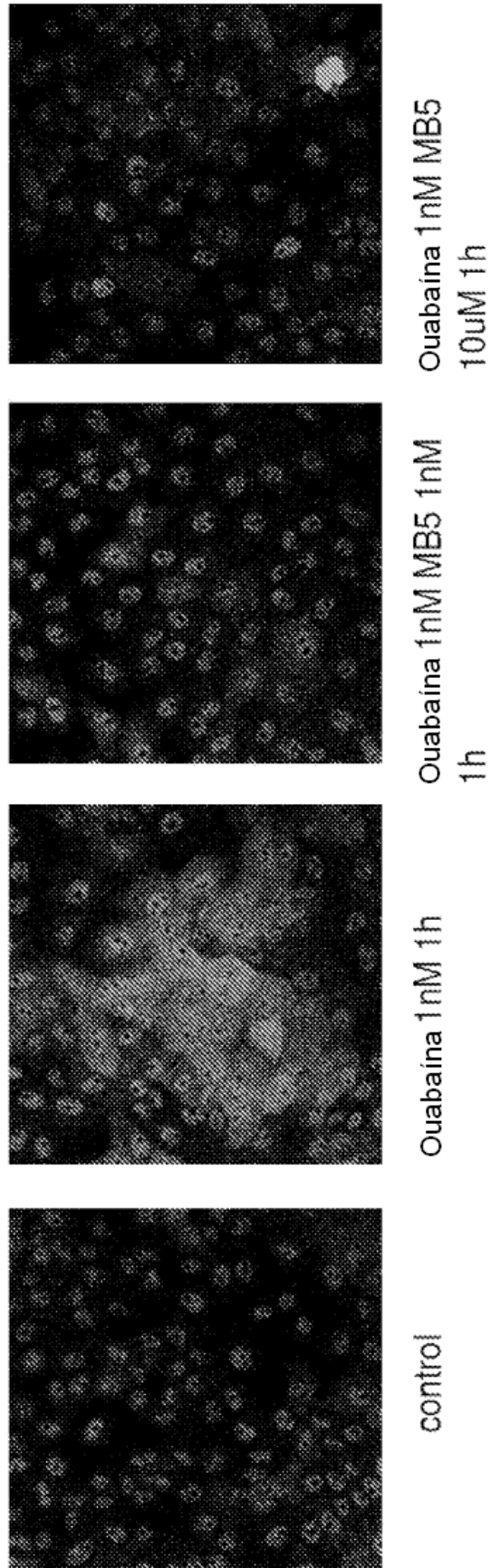


control

**Figura 9B**

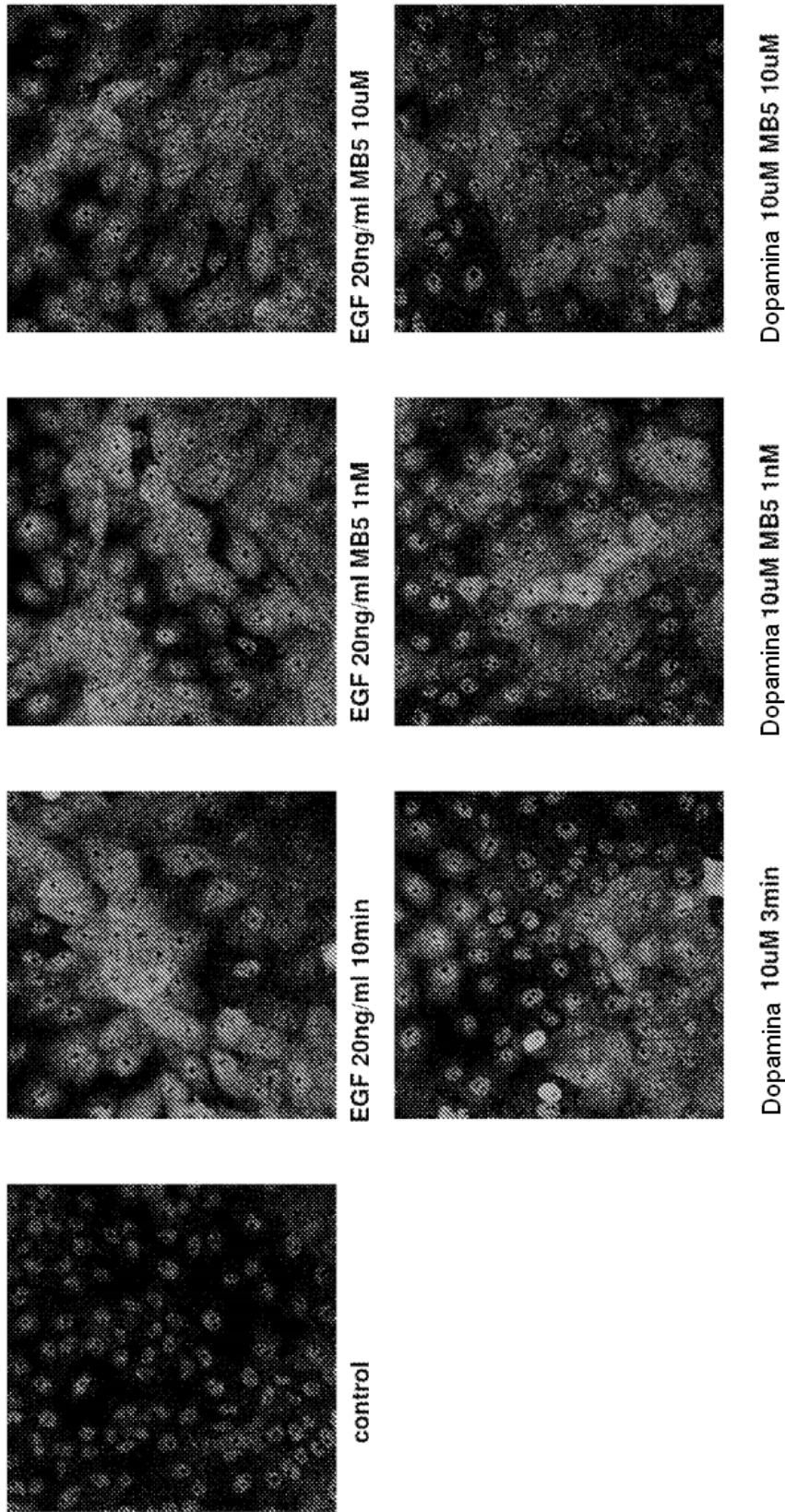


**Figura 9C**



**Figura 9D**





**Figura 9E**