

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 047**

51 Int. Cl.:
A61K 31/77 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06736222 .8**
96 Fecha de presentación: **27.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1853280**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2007**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para el tratamiento y prevención de la miocardiopatía y la enfermedad cardíaca**

30 Prioridad:
25.02.2005 US 656570 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.05.2012

73 Titular/es:
**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN
3003 SOUTH STATE STREET
ANN ARBOR, MICHIGAN 48109, US**

72 Inventor/es:
**METZGER, Joseph;
TOWNSEND, Dewayne;
YASUDA, Soichiro y
MICHELE, Dan**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 380 047 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

Composiciones y procedimientos para el tratamiento y prevención de la miocardiopatía y la enfermedad cardíaca

La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional Estadounidense Núm. 60/656.570, presentada el 25 de febrero de 2005.

5 Campo de la invención

La presente invención está definida en las reivindicaciones y se refiere a composiciones que comprenden poloxámero 188 para su uso en el tratamiento de la disfunción diastólica (por ejemplo, en un sujeto deficiente en distrofina).

Antecedentes de la invención

10 La insuficiencia cardíaca es una enfermedad progresiva crónica. En Estados Unidos, existen 5 millones de pacientes con insuficiencia cardíaca. Aproximadamente se diagnostican 550.000 nuevos casos y se producen más de 285.000 muertes anualmente por insuficiencia cardíaca, lo que indica que el número de pacientes con insuficiencia cardíaca está aumentando.

15 Schaer et al ("Beneficial effects of RheothRx injection in patients receiving thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial" CIRCULATION, AMERICAN HEART ASSOCIATION, DALLAS, TX, volumen 94, número 3, 1 de enero de 1996 (1996-01-0), páginas 298-307, XP008096313ISSN: 0009-7322) divulga el uso de poloxámero 188 en pacientes que reciben terapia trombolítica por infarto agudo de miocardio. La terapia adyuvante con poloxámero resultó en un beneficio sustancial que incluye infartos más pequeños, mayor salvamento del miocardio, mejor función del ventrículo izquierdo y una menor incidencia de reinfarcto. El poloxámero se administró concomitantemente con nitratos y beta-bloqueadores.

20 Toth et al ("The effect of RheothRx injection on the hemorheological parameters in patients with acute myocardial infarction" CLINICAL HEMORHEOLOGY AND MICROCIRCULATION, IOS PRESS, AMSTERDAM, NL, volumen 17, no. 2, 1 de enero de 1997 (1997-01-01), páginas 117-125, ISSN: 1386-0291) evalúa los efectos hemorreológicos de RheothRx (Poloxámero 188) en pacientes con infarto agudo de miocardio. Se ha demostrado que el poloxámero 188 reduce significativamente la agregación de RBC y otros parámetros hemorreológicos. Los pacientes reclutados en el estudio CORE recibieron concomitantemente terapia para infarto tal como inhibidores de ACE.

25 Yasuda et al ("Membrane sealant poloxamer 188 corrects the primary defect caused by dystrophin deficiency in single cardiac myocytes from Mdx mice" CIRCULATION, volumen 110, número 17, Supl. S, octubre de 2004 (2004-10), página 135, XP008096472& 77TH SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN-HEART-ASSOCIATION; NEW ORLEANS, LA, EEUU; 07-10 de Noviembre de 2004 ISSN: 0009-7322) describe el uso de poloxámero in vitro en miocitos cardíacos deficientes en distrofina. La disfunción contráctil y muerte celular de los miocitos fueron restauradas por el compuesto de sellado de membrana poloxámero 188.

30 MODI N B ("Flocor CytRx Corp" IDRUGS, CURRENT DRUGS LTD, GB, volumen 2, número 4, 1 de enero de 1999 (1999-01-01), páginas 366-374, XP008096291ISSN: 1369-7056) proporciona una perspectiva general de los datos clínicos y farmacológicos obtenidos con RheothRx. Los ensayos de fase III para el tratamiento del infarto agudo de miocardio se han interrumpido en forma prematura debido a la falta de eficacia y un perfil de efecto adverso inaceptable relacionado con un incremento en la creatinina sérica. Flocor, una versión altamente purificada del poloxámero 188, ha sustituido a RheothRx y ha sido ensayado en ensayos clínicos de fase III que están en curso. No se ha observado ninguna elevación de la creatinina sérica.

40 La deficiencia en distrofina provoca distrofia muscular de Duchenne (DMD) en seres humanos, una enfermedad progresiva y hereditaria de deterioro del músculo estriado que incluye frecuentemente la miocardiopatía pronunciada (Véase, por ejemplo, Muntoni, Curr Opin Neurol 16, 577-83 (2003)). La Insuficiencia cardíaca representa un 15% estimado de muertes en DMD (Véase, por ejemplo, Emery, A. E. H. en Duchenne Muscular Dystrophy (ed. Emery, A. E. H.) (Oxford University Press, Oxford, 2003)). El avance con respecto a la definición de la base molecular de la enfermedad en DMD mayormente proviene de estudios sobre músculos esqueléticos, con comparativamente poca atención dirigida al músculo cardíaco.

45 Los mecanismos fisiopatológicos involucrados en los miocitos cardíacos posiblemente difieren significativamente de las miofibras esqueléticas, según lo recalado por los pacientes con enfermedad cardíaca significativa con niveles reducidos o truncados de distrofina sin enfermedad del músculo esquelético (Véase, por ejemplo, Finsterer y Stollberger, Cardiology 99, 1-19 (2003)). De ese modo, diversas preguntas fundamentales, con respecto a las consecuencias de la deficiencia en distrofina en el músculo cardíaco permanecen sin respuesta. Notablemente, se desconoce si la deficiencia en distrofina provoca directamente alteración de la transmisión de la fuerza y/o fragilidad de membrana en el músculo cardíaco solo a nivel de los miocitos.

55 Existe una necesidad de nuevas composiciones y nuevos procedimientos para tratar la enfermedad cardíaca en general, así como la enfermedad cardíaca relacionada con células, tejidos y sujetos distróficos, y para prevenir y/o

corregir las bases subyacentes de la patogénesis en sujetos con enfermedad cardíaca (por ejemplo, sujetos en general así como en distróficos).

Sumario de la invención

5 La presente invención está definida en las reivindicaciones y se refiere a composiciones que comprenden poloxámero 188 para su uso en el tratamiento de la disfunción diastólica en un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano. Puede tratarse una variedad de sujetos, incluyendo ratones, perros, cerdos y otros mamíferos no humanos. En algunas realizaciones, la composición se administra a través de la administración intravenosa. Puede utilizarse una variedad de vías para la administración, incluyendo, pero sin limitación, la administración intraarterial, subcutánea, intraventricular, oral (por ejemplo, a través de la ingestión) u otras vías de administración. En algunas realizaciones, la mejora en la disfunción diastólica comprende una mejora en la función del ventrículo izquierdo en el sujeto. En algunas realizaciones, la mejora en la función del ventrículo izquierdo comprende una mejora en el desempeño hemodinámico basal en el sujeto. En algunas realizaciones, la mejora en la disfunción diastólica comprende un incremento en el volumen diastólico del ventrículo izquierdo en el sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto deficiente en distrofina. En algunas realizaciones, el sujeto tiene distrofia muscular de Duchene. En algunas realizaciones el sujeto tiene insuficiencia cardíaca diastólica o insuficiencia cardíaca aguda. En algunas realizaciones, el tratamiento reduce la sensibilidad a la sobrecarga de calcio en el tejido cardíaco del sujeto. En algunas realizaciones, la reducción de la sensibilidad a la acumulación de calcio en el tejido cardíaco del sujeto comprende reducir los niveles de Ca^{+2} intracelular en los miocitos cardíacos del sujeto. En algunas realizaciones, reducir los niveles de Ca^{+2} intracelular en los miocitos cardíacos evita la remodelación o remodelación inversa del tejido muscular cardíaco en el sujeto. En algunas realizaciones, el tratamiento reduce la contractura celular y/o muerte celular en el tejido cardíaco del sujeto. En algunas realizaciones, el poloxámero es un poloxámero purificado y/o fraccionado. En algunas realizaciones, la composición que comprende un poloxámero según se reivindica en la reivindicación 1 es coadministrada con uno o más agentes utilizados para el tratamiento de la enfermedad cardíaca, incluyendo, pero sin limitación, un diurético, un agente en bucle, un agente ahorrador de potasio, un vasodilatador, un inhibidor de ACE, un antagonista de angioestatina II, un agente inotrópico positivo, un inhibidor de la fosfodiesterasa, un antagonista de receptores beta-adrenérgicos, un bloqueador de canales de calcio, un nitrato, un bloqueador alfa, un antagonista central alfa, una estatina, o una combinación de estos agentes. En algunas realizaciones, la composición de la presente invención encuentra uso en investigación y/o aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, terapia clínica).

30 El uso del poloxámero 188 puede dar lugar a un volumen diastólico creciente del ventrículo izquierdo en un sujeto deficiente en distrofina. El poloxámero puede reducir la concentración de calcio intracelular en miocitos cardíacos deficientes en distrofina en el sujeto. La reducción de la concentración de calcio intracelular en miocitos deficientes en distrofina puede reducir la sensibilidad del sujeto a la acumulación de calcio. El volumen diastólico creciente del ventrículo izquierdo en el sujeto puede prevenir la insuficiencia aguda cardíaca en el sujeto. La mejora en la función del ventrículo izquierdo puede comprender una mejora basal en el desempeño hemodinámico en el sujeto. El sujeto deficiente en distrofina puede ser un sujeto humano con distrofia muscular de Duchene. La reducción en la concentración de calcio intracelular en miocitos cardíacos deficientes en distrofina puede prevenir la remodelación y/o remodelación inversa del tejido muscular cardíaco en el sujeto. El poloxámero puede ser un poloxámero purificado. El poloxámero puede ser un poloxámero fraccionado. La composición que comprende un poloxámero puede coadministrarse con uno o más agentes utilizados para el tratamiento de la enfermedad cardíaca, incluyendo, pero sin limitación, un diurético, un agente en bucle, un agente ahorrador de potasio, un vasodilatador, un inhibidor de ACE, un antagonista de angioestatina II, un agente inotrópico positivo, un inhibidor de la fosfodiesterasa, un antagonista de receptores beta-adrenérgicos, un bloqueador de canales de calcio, un nitrato, un bloqueador alfa, un antagonista central alfa, una estatina, o una combinación de estos agentes. El uso del poloxámero 188 puede dar lugar a la reducción de la concentración de calcio en los miocitos cardíacos al administrar una composición que comprende un poloxámero a los miocitos cardíacos. Los miocitos cardíacos pueden comprender miocitos cardíacos deficientes en distrofina. La administración de una composición que comprende un poloxámero a los miocitos cardíacos puede prevenir la contractura celular de los miocitos cardíacos. La administración de una composición que comprende un poloxámero a los miocitos cardíacos puede prevenir la muerte celular de los miocitos cardíacos.

50 Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra registros representativos de tensión activa y pasiva, y $[Ca^{2+}]_i$, en miocitos cardíacos individuales de ratones control (paneles izquierdos) y *mdx* (paneles derechos). A. Microfotografías de miocitos individuales antes (a, e), durante (b, f), inmediatamente después (c, g) y alrededor de 40 s después de (d, h) un estiramiento pasivo único. La barra es de 20 μm . B. Los trazos superiores son cambios en la longitud de los miocitos, comenzando en SL de reposo de 1,75-1,80 μm (0% de estiramiento; contracción isométrica) y extendiéndose hasta 2,1 μm (20% de estiramiento y más allá). Los trazos marcados a-h corresponden a la secuencia de estiramiento celular (a-h) que se muestra en la parte A. Los trazos medios son registros de tensión en respuesta al estiramiento. Los trazos de base son $[Ca^{2+}]_i$ (tasa de Fura2) durante los estiramientos. La mayoría de los trazos de la izquierda son contracciones isométricas activas. Los registros pasivos son en ausencia de estímulo eléctrico. En *mdx*, después del estiramiento (f) y regreso a la longitud de reposo (g) el miocito se tornó inestable, con un incremento masivo en $[Ca^{2+}]_i$, hipercontractura y muerte (h).

La Figura 2 muestra la tensión pasiva y $[Ca^{2+}]_i$ durante el estiramiento SL en miocitos cardíacos individuales de control y *mdx*. **A.** Efectos de P188 sobre las relaciones extensión-tensión pasiva. Los asteriscos indican *mdx* mayor que control (SLs 2,0 y 2,1 μm), y #'s indican *mdx*+P188 menor que *mdx* no tratado, $p < 0,05$. **B.** Resumen de los efectos de P188 y nifedipina sobre el $[Ca^{2+}]_i$ en los miocitos tras el estiramiento SL hasta 2,1 μm . Los asteriscos indican *mdx* mayor que BL/10, $p < 0,05$.

La Figura 3 muestra los efectos agudos de P188 sobre la hemodinámica *in vivo* y la supervivencia de *mdx*. **A.** Bucles de presión-volumen representativos en control (**1**) y *mdx* en presencia o ausencia de infusión aguda de P188 (2 y 3, respectivamente). **B.** Resumen de los volúmenes diastólicos finales del ventrículo izquierdo después de la infusión de P188 en ratones de control y *mdx*. **C.** Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier durante la infusión de 42 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de dobutamina. Control (1), *mdx* (3), *mdx* + P188 (2). Los ratones fueron retirados del estudio cuando las presiones sistólicas cayeron por debajo de 60 mmHg.

La Figura 4 muestra el equipo mecánico a base de microfibras de carbono. **A.** Diagrama esquemático de ajuste. Se registraron las imágenes del campo brillantes ($>590\text{nm}$) del miocito unido a un par de fibras de carbono (CF) en cada extremo para medir las dimensiones del miocito y la longitud del sarcómero. El control programado de la longitud de miocitos general se logró mediante un traductor piezoeléctrico (PT). El desarrollo de tensión se detectó por medio de un transductor de fuerzas (200 mV/mg) (FT). La intensidad de fluorescencia de emisión (510nm), resultante del cambio de alta velocidad de la excitación de fluorescencia (340 y 380nm), se detectó mediante un tubo fotomultiplicador (PMT). **B.** Las microfotografías de miocitos cardíacos individuales, unidos con fibras de microcarbono en cada extremo, antes del estiramiento pasivo (parte superior) y después del estiramiento (parte inferior). Barra = 20 μm . Las vistas expandidas muestran la longitud del sarcómero (1,8 μm (parte superior), 2,2 μm (parte inferior)).

La Figura 5 muestra los efectos protectores de P188 sobre el déficit de fuerza de contracción después del alargamiento-contracción individual en miocitos cardíacos *mdx*. Se obtuvo la tensión de la contracción isométrica, seguida del alargamiento-contracción individual durante una contracción. Después se registró la tensión de contracción isométrica posterior al estiramiento. Se representó la amplitud de contracción posterior al estiramiento/amplitud de contracción previa al estiramiento (post/pre) en función de la magnitud respecto del estiramiento.

La Figura 6 muestra los efectos de P188 sobre las relaciones tensión-extensión pasiva en miocitos cardíacos individuales intactos de membrana de perros normales y distróficos.

La Figura 7 muestra las propiedades de contracción isométrica de miocitos individuales de perros de control y distróficos.

La Figura 8 muestra (A) la estructura principal de un poloxámero y (B) ejemplos de poloxámeros disponibles en el comercio.

Definiciones

La expresión "en el que dichos síntomas se reducen" se refiere a una reducción cualitativa o cuantitativa en síntomas detectables, incluyendo un incremento en el desempeño hemodinámico y un incremento en el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "composición terapéutica que comprende un poloxámero" se refiere a composiciones que contienen poloxámero 188 utilizado para el tratamiento de la disfunción diastólica. Una composición terapéutica que comprende un poloxámero también puede comprender uno o más compuestos o agentes adicionales, incluyendo agentes útiles para el tratamiento de la enfermedad cardíaca (por ejemplo, inhibidores de ACE, estatinas, beta bloqueadores y similares), otros agentes terapéuticos, líquidos, geles, vehículos, diluyentes, excipientes, salicilatos, inmunosupresores, antibióticos, ligantes, agentes de relleno, conservantes, agentes estabilizantes, emulsionantes y tampones fisiológicamente tolerables.

Según se utiliza en la presente memoria, las expresiones "agente útil para el tratamiento de la enfermedad cardíaca" y "agentes útiles para el tratamiento de la enfermedad cardíaca" se refieren a cualquiera de uno o más agentes actualmente utilizados para el tratamiento de los signos o síntomas de la enfermedad cardíaca. Estos agentes incluyen, sin limitación, un diurético, un diurético en bucle, un agente ahorrador de potasio, un vasodilatador, un inhibidor de ACE, un antagonista de angioestatina II, un agente inotrópico positivo, un inhibidor de la fosfodiesterasa, un antagonista de receptores beta-adrenérgicos, un bloqueador de canales de calcio, un nitrato, un bloqueador alfa, un antagonista central alfa, una estatina y combinaciones de dos o más de estos agentes. Se proporcionan ejemplos de estos agentes en la presente memoria. También están incluidos dentro del significado de estos términos los agentes que están siendo evaluados clínicamente (por ejemplo, en un ensayo clínico) para la eficacia en el tratamiento de signos o síntomas de la enfermedad cardíaca.

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "huésped," "sujeto" y "paciente" se refieren a cualquier animal, incluyendo animales humanos y no humanos (por ejemplo roedores, artrópodos, insectos (por ejemplo, Diptera), peces (por ejemplo, pez zebra), primates no humanos, ovinos, bovinos, rumiantes, lagomorfos, porcinos, caprinos,

equinos, caninos, felinos, aves, etc.), que es estudiado, analizado, ensayado, diagnosticado o tratado (por ejemplo recibiendo la administrado terapéutica o profiláctica de una composición que comprende un poloxámero de la presente invención). Los términos "huésped," "sujeto" y "paciente" se utilizan en forma indistinta, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria.

5 Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" y "cantidad efectiva", cuando se utiliza con referencia a una composición que comprende un poloxámero de la presente invención, se refiere a una cantidad (por ejemplo, un nivel de dosificación) suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados (por ejemplo, que sean efectivos en el tratamiento o prevención de signos o síntomas de la enfermedad cardíaca). Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones.

10 Según se utiliza en la presente memoria, los términos "administración" y "administrar" se refieren al acto de proporcionar un fármaco, profármaco, u otro agente o tratamiento terapéutico (por ejemplo, composiciones de la presente invención) a un sujeto (por ejemplo, un sujeto o células, tejidos y órganos *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*).

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "coadministración" y "coadministrar" se refieren a la administración de al menos dos agentes (por ejemplo, una composición que comprende un poloxámero y uno o más agentes adicionales - por ejemplo, un bloqueador de canales de calcio) o terapias a un sujeto. En algunas realizaciones, la coadministración de dos o más agentes o terapias es concurrente. En otras realizaciones, un primer agente/terapia se administra previo a un segundo agente/terapia. Aquellos con experiencia en la técnica entienden que las formulaciones y/o vías de administración de los diversos agentes o terapias utilizadas pueden variar. La dosificación apropiada para la coadministración puede ser determinada fácilmente por una persona con experiencia en la técnica. En algunas realizaciones, cuando se coadministran agentes o terapias, los respectivos agentes o terapias se administran en dosificaciones inferiores a las apropiadas para su administración como fármacos únicos. De ese modo, la coadministración es especialmente deseable en las realizaciones donde la coadministración de los agentes o terapias reduce la dosificación requerida de un agente potencialmente nocivo (por ejemplo, tóxico), y/o cuando la coadministración de dos o más agentes da lugar a la sensibilización de un sujeto a los efectos beneficiosos de uno de los agentes a través de la coadministración del otro agente.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" o equivalentes gramaticales engloban la mejora y/o reversión de los síntomas de la enfermedad cardíaca. Un agente que provoca una mejora en cualquier parámetro asociado a la enfermedad cuando se utiliza en los procedimientos de detección de la presente invención puede identificarse de ese modo como un compuesto terapéutico. El término "tratamiento" se refiere al tratamiento terapéutico y medidas profilácticas o preventivas. Por ejemplo, aquellos que pueden beneficiarse del tratamiento con las composiciones de la presente invención incluyen aquellos que ya tienen disfunción diastólica.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "en riesgo de enfermedad" se refiere a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que tiene predisposición a experimentar una enfermedad particular. Esta predisposición puede ser genética (por ejemplo, una tendencia genética particular a experimentar la enfermedad, tal como trastornos hereditarios), o debido a otros factores (por ejemplo, condiciones ambientales, hipertensión, síndrome metabólico, etc.).

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "que padece la enfermedad" se refiere a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que está experimentando una enfermedad particular. De ese modo, se pretende que la presente invención abarque a sujetos que están experimentando cualquier variante de enfermedad (por ejemplo, desde la manifestación subclínica hasta la enfermedad avanzada) en que el sujeto exhibe al menos algunos de los indicios (por ejemplo, signos o síntomas) asociados a la enfermedad particular.

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "enfermedad" y "afección patológica" se utilizan en forma indistinta para describir un estado, signos y/o síntomas que están asociados a cualquier deterioro del estado normal de un animal vivo o cualquiera de sus órganos o tejidos que interrumpe o modifica el desempeño de las funciones normales.

Los términos "compuesto" y "agentes" se refieren a cualquier especie química, producto farmacéutico, fármaco y similares que pueden utilizarse para tratar o prevenir una enfermedad, afección, dolencia o trastorno de la función corporal. Los compuestos comprenden tanto compuestos terapéuticos conocidos como potenciales. Un "compuesto terapéutico conocido" se refiere a un compuesto terapéutico que ha demostrado ser (por ejemplo, a través de ensayos en animales o experiencia previa con la administración a seres humanos) efectivo en dicho tratamiento. En otras palabras, un compuesto terapéutico conocido es un compuesto eficaz en el tratamiento de la enfermedad (por ejemplo, la enfermedad cardíaca).

Descripción detallada de la invención

Existen aproximadamente 5 millones de pacientes dentro de Estados Unidos que padecen enfermedad cardíaca, teniendo aproximadamente 2 millones de este grupo insuficiencia cardíaca de clase III o clase IV según la Asociación Cardiológica de Nueva York, que abarca la población con síntomas moderados a severos (Véase, por ejemplo, American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics- 2006 Update, Dallas: AHA, 2006).

Alrededor del 22% de los hombres y 46% de las mujeres víctimas de ataque cardíaco serán discapacitados con insuficiencia cardíaca dentro de 6 años. Esta enfermedad típicamente avanza de la clase III a IV en 3-10 años, durante los cuales el paciente puede ser tratado con terapia farmacológica incluyendo β -bloqueadores, bloqueadores tipo 1 del receptor de angiotensina II, inhibidores enzimáticos conversores de angiotensinas I, bloqueadores de canales de calcio y vasodilatadores. A medida que aparecen síntomas adicionales los pacientes pueden requerir dispositivos médicos tales como marcapasos implantables o desfibriladores y posiblemente dispositivos de asistencia del ventrículo izquierdo (LVAD). Con la posible excepción de LVADs, estas terapias prolongan la vida pero no interrumpen ni invierten el deterioro de la función cardíaca. En las etapas finales de esta enfermedad, los pacientes son hospitalizados frecuentemente con fracción de eyección peligrosamente baja del ventrículo izquierdo y requieren inótrupos intravenosos (IV) para incrementar la contractilidad del músculo cardíaco y diuréticos para reducir la carga de líquidos.

Diversos factores de riesgo de insuficiencia cardíaca parecen estar incrementándose en la población general en forma de síndrome metabólico (por ejemplo, hipertensión, dislipidemia, obesidad y diabetes). Se estima que 1 millón de adolescentes de 12-19 años de edad en Estados Unidos tiene síndrome metabólico o el 4,2% del total. Cuarenta y siete millones de adultos en EEUU tienen síndrome metabólico o el 23,7% del total. En el caso de la diabetes, la disfunción diastólica del ventrículo izquierdo puede representar la primera etapa de miocardiopatía diabética (Véase, por ejemplo, Raev, (1994) Diabetes Care 17: 633-639).

La disfunción diastólica es una afección en la que las anomalías en la función mecánica del corazón están presentes durante la diástole. Puede ser el preludio de la insuficiencia cardíaca diastólica caracterizada por signos o síntomas de insuficiencia cardíaca en presencia de una fracción de eyección conservada y función diastólica anormal (Véase, por ejemplo, Zile y Brutsaert (2002) Circ. 105: 1387-1393). Estas anomalías son causadas por una reducción en la relajación ventricular y/o un incremento en la rigidez ventricular. La disfunción diastólica es muy común. En un estudio realizado por la Mayo Clinic, en la población general de Minnesota, el 21% de los adultos por encima de los 45 años de edad tuvieron disfunción diastólica leve (Véase, por ejemplo, Redfield et al., 2003 JAMA 289: 194-202)

La mortalidad anual por miocardiopatía como causa primaria de muerte o como factor contribuyente es de 54.700 (Véase, por ejemplo, American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics-2006 Update, Dallas: AHA, 2006). El ochenta y siete por ciento de estos casos corresponde a miocardiopatía dilatada o congestiva (DCM). De los pacientes con DCM, el 50% están con vida 5 años después del diagnóstico inicial y el 25% están con vida después de 10 años (Facts About Cardiomyopathy, NIH, NHLBI, 1995).

Aproximadamente 1 de cada 3500 hombres se ve afectado por la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) mientras que la Distrofia Muscular de Becker (BMD) es menos común afectando aproximadamente a 1 de cada 30.000 hombres. Ambas enfermedades son el resultado de mutaciones en el gen ubicado en el cromosoma X, en Xp21.1 que codifica la distrofina. En la DMD, la distrofina está ausente mientras que en la BMD está reducida o es de tamaño anormal. La distrofina es una proteína estructural que participa en la organización celular en células musculares y promueve la estabilidad miofibrilar y del sarcolema (membrana celular muscular) (Véase, por ejemplo, Kaprielian y Severs, 2000 Heart Failure Reviews 5: 221-238). La enfermedad cardíaca en DMD y BMD se manifiesta como miocardiopatía dilatada y/o arritmia cardíaca. Se observa en pacientes jóvenes con una incidencia del 26% a la edad de 6 años. La muerte se produce en estos pacientes típicamente temprano hasta mediados de los 20. Aproximadamente el 20% de los pacientes con DMD y el 50% de los pacientes con BMD mueren por insuficiencia cardíaca. Las mujeres portadoras de DMD o BMD también están en riesgo de miocardiopatía. La edad de aparición no está clara pero se cree que se encuentra en los años de adultez. La afección cardíaca varía de insuficiencia cardíaca asintomática a severa.

Sigue sin estar claro cómo la insuficiencia cardíaca que surge de diferentes etiologías se relaciona con la asociada a la DMD. La pérdida de distrofina y proteínas asociadas a la distrofina en las membranas de miocitos cardíacos de sujetos humanos y modelos animales está bien documentada y recientemente ha sido revisada (Véase, por ejemplo, Kawada et al., (2005). Pharmacol. Therap. 107: 31-43). Estas proteínas forman complejos que proporcionan resistencia mecánica a la sobreexpansión del sarcolema. La pérdida de una de estas proteínas puede resultar en desorganización del complejo, inestabilidad de la membrana, degeneración muscular y finalmente miocardiopatía. Se ha demostrado que existe una significativa pérdida de distrofina del sarcolema de miocitos cardíacos en la insuficiencia cardíaca. Esto se produce en respuesta a un conjunto diverso de factores estresantes incluyendo la administración de catecolamina, ligación coronaria que resulta en isquemia aguda del miocardio, y en insuficiencia cardíaca crónica después del infarto de miocardio. Los factores estresantes pueden ser a largo plazo, afectando la remodelación estructural del corazón, o inmediatos afectando la estabilidad de la membrana y los niveles de calcio intracelular. El incremento en la concentración de calcio hasta altos niveles activa las proteasas activadas por calcio (calpaínas) que, entre otras cosas, escinden la distrofina. Esta pérdida a la larga lleva a la degeneración muscular, miocardiopatía dilatada (DCM; enfermedad muscular cardíaca asociada a un corazón agrandado y que funciona inadecuadamente) e insuficiencia cardíaca. Esto a su vez puede llevar finalmente a insuficiencia cardíaca avanzada.

Además de los costos físicos y emocionales de la insuficiencia cardíaca, los costos financieros son altos. Los costos anuales son de aproximadamente \$38 mil millones con el 60% de ello relacionado con la hospitalización. Anualmente, esto asciende a 6,5 millones de días de hospital. Ha habido un incremento del 174% en las dadas de

alta hospitalarias relacionadas con la insuficiencia cardíaca de 1979 a 2003 (Véase, por ejemplo, American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics- 2006 Update, Dallas: AHA, 2006). La insuficiencia cardíaca es el motivo más común de hospitalización de los beneficiarios de cuidado médico (CDC, Heart Failure Fact Sheet). De ese modo, la insuficiencia cardíaca representa un creciente desafío médico con el 50% de los pacientes con 3 o más comorbilidades, y donde al paciente típico se le prescriben, en promedio, 6 medicaciones. El setenta y ocho por ciento de los sujetos con alguna forma de enfermedad cardíaca tuvo al menos 2 admisiones en hospital por año (Véase, por ejemplo, English y Mastream, (1995) Crit. Care Nurs. Q. 18:1-6).

Resulta notable que alrededor del 50% de los pacientes con insuficiencia cardíaca (aproximadamente 2 millones de sujetos) tienen disfunción diastólica. De ese modo, una necesidad médica principal no satisfecha es para las terapias que tratan la disfunción diastólica.

Por consiguiente, la presente invención proporciona nuevos entendimientos en la patogénesis de la miocardiopatía e insuficiencia cardíaca (por ejemplo, relacionadas con la disfunción diastólica (por ejemplo, en animales y miocitos deficientes en distrofina)) y composiciones para el tratamiento y prevención de las mismas y para usos de investigación. Específicamente, la presente memoria descriptiva identifica que los miocitos cardíacos deficientes en distrofina aislados intactos tienen una reducción en la elasticidad y un incremento en la susceptibilidad a la acumulación de calcio mediada por estiramiento, llevando a la contractura celular y muerte. Además, la presente invención se refiere al tratamiento de esta acumulación de calcio con un poloxámero sellador de membrana, particularmente el poloxámero 188, un copolímero no iónico que puede insertarse en monocapas de lípidos artificiales y sellar las membranas electroporadas. El tratamiento con el poloxámero 188 puede revertir las deficiencias diastólicas a nivel de miocitos y órganos (por ejemplo, en células, tejidos y sujetos distróficos; véanse los Ejemplos 3-6). Además, el tratamiento con un poloxámero puede prevenir la insuficiencia cardíaca aguda *in vivo*.

Los enfoques basados en genes o células, que han demostrado tener alguna eficacia en los estudios en animales, son complicados en la transferencia a seres humanos. Sin embargo, los poloxámeros son no tóxicos y demostraron ser seguros en seres humanos. De ese modo, en algunas realizaciones, la presente invención ofrece composiciones listas según se define en las reivindicaciones para la profilaxis y terapia de la enfermedad cardíaca provocada por disfunción diastólica (por ejemplo, relacionada con la acumulación de calcio mediada por estiramiento (por ejemplo, en sujetos con DMD y otras enfermedades caracterizadas por inestabilidad de membrana)).

En particular, la presente memoria descriptiva proporciona, en conjuntos de datos experimentales que abarcan desde miocitos cardíacos individuales hasta animales completos, la identificación del defecto primario en el corazón distrófico, y su corrección mediante una estrategia de reparación de membrana a base de un producto químico. Primero, se empleó un ensayo de fibra de microcarbono único que permitió la introducción de excursiones de longitud de sarcómeros fisiológicamente relevantes en miocitos cardíacos individuales con vida de ratones normales y deficientes en distrofina (*mdx*). Los datos generados durante el desarrollo de la presente invención demuestran que los miocitos *mdx*, en respuesta a las distensiones pasivas en la longitud celular, tienen un aumento de la susceptibilidad a la acumulación de calcio intracelular, provocando la hipercontractura y muerte de los miocitos, lo que indica la fragilidad de la membrana en respuesta a la carga fisiológica. La presente memoria descriptiva también demuestra que las composiciones (por ejemplo, poloxámeros (por ejemplo, P188)) son capaces de restaurar inmediatamente la elasticidad de los miocitos *mdx* a la del control, e invertir el aumento de la susceptibilidad de los miocitos *mdx* a la acumulación de calcio/contractura celular/muerte (Véanse los Ejemplos 3-6). También se divulga el uso potencial para proteger células y sujetos (por ejemplo, seres humanos, mamíferos no humanos, etc.) de la insuficiencia cardíaca aguda (y posterior muerte) a través de la administración al sujeto de un poloxámero (por ejemplo, P188). Además, la invención se refiere a tratamientos para la disfunción diastólica en un sujeto que comprenden administrar (por ejemplo, administración intravenosa (IV)) al sujeto (por ejemplo, un sujeto distrófico) una composición que comprende poloxámero P188. Aunque no es necesario el entendimiento del mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no se limita a ningún mecanismo de acción particular, en algunas realizaciones, la administración de una composición que comprende un poloxámero (P188) produce mejoras (por ejemplo, inmediatas y/o sostenidas) en la función del ventrículo izquierdo debido al regreso al nivel normal del volumen diastólico del ventrículo izquierdo.

La presente memoria descriptiva demuestra que en los corazones deficientes en distrofina los incrementos anormales en $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por estiramiento producen una reducción en la elasticidad a nivel celular y reducen el volumen diastólico *in vivo* (Véanse los Ejemplos 2-4). Además, la presente memoria descriptiva demuestra que el influjo de calcio da lugar a una pérdida de integridad de la membrana, y que una composición que comprende un poloxámero (por ejemplo, P188) puede corregir estas anomalías.

Los paradigmas terapéuticos actuales para DMD se focalizan en la expresión de la distrofina, a través de salto de exones o transducción viral de la distrofina truncada, u otros genes (por ejemplo, utrofina o disferlina) que limitan las consecuencias de la deficiencia de distrofina (Véase, por ejemplo, Gregorevic, et al., Nat Med 10, 828-34 (2004); Squire et al., Hum Mol Genet 11, 3333-44 (2002); Torrente et al., J Clin Invest 114, 182-95 (2004); Goyenvalle et al., Science 306, 1796-9 (2004)). Estas estrategias son prometedoras pero presentan desafíos debido al direccionamiento requerido de todo el músculo estriado en el cuerpo. La presente invención proporciona una alternativa comparativamente simple basada en productos químicos para tratar la DMD que comprende administrar a un sujeto con DMD una composición que comprende P-188. Aunque el entendimiento del mecanismo no es

necesario para practicar la presente invención y la presente invención no se limita a ningún mecanismo de acción particular, en algunas realizaciones, la administración de un poloxámero produce una aguda estabilización y/o reparación de la membrana.

5 Según se demuestra en la presente memoria (por ejemplo, en modelos de ratón y perro de DMD; Véanse los Ejemplos 5 y 6), la administración de un poloxámero proporciona efectos hemodinámicos beneficiosos sencillos e inmediatos en condiciones basales y de tensión en sujetos distróficos. Actualmente, el P 188 se encuentra en ensayos clínicos de fase III para el tratamiento de crisis oclusiva de vasos en pacientes con anemia de células falciformes, que han demostrado recientemente la seguridad y no toxicidad de P188 en seres humanos (Véase, por ejemplo, Adams- Graves et al., Blood 90,2041-6 (1997)). Sin embargo, a diferencia del curso episódico de la anemia de células falciformes, la DMD es una enfermedad progresiva, y la terapia efectiva con poloxámero puede utilizar la administración intravascular crónica. De este modo, la presente invención se refiere a la utilización del poloxámero 188 de sellado de membrana que representa una nueva clase de agentes terapéuticos para prevenir o limitar el daño progresivo a corazones con disfunción diastólica (por ejemplo, en sujetos con DMD), y para tratar miocardiopatías asociadas a defectos en el complejo distrofina-glicoproteína (Véase, por ejemplo, Straub y Campbell, Curr Opin Neurol 10, 168-75 (1997)).

P188 es un miembro de una familia de moléculas de poloxámero originalmente desarrolladas por BASF en los años 1950. Es un copolímero tribloque no iónico hecho de poli(óxido de etileno)₈₀-poli(óxido de propileno)₃₀-poli(óxido de etileno)₈₀ (masa molecular ~8,4 Kda). La molécula tiene varios nombres incluyendo PLURONIC F68, RheothRx, y FLOCOR.

20 Los Poloxámeros (también denominados polímeros de bloque PLURONIC, disponibles de BASF Corp., Wyandotte, MI) en general comprenden bloques de óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO) dispuestos en una estructura básica A-B-A: EO-PO-EO. Esta disposición da como resultado un copolímero anfifílico, en el que el número de unidades EO_(x) hidrofílicas y PO_(y) hidrofóbicas puede alterarse (Véase, por ejemplo, Reeve, páginas 231-249, en Handbook of Biodegradable Polymers, Harwood Academic Pub., Eds. Domb et al., (1997). La estructura principal de los diversos poloxámeros se muestra en la FIG. 8A. Se muestra en la FIG 8B una lista de copolímeros de PLURONIC seleccionados disponibles de BASF Corp. Los copolímeros con diversos valores de x e y se caracterizan por el balance hidrofílico-lipofílico (HLB) diferente. Los poloxámeros pueden sintetizarse por adición secuencial de monómeros PO y EO en presencia de un catalizador alcalino, tal como hidróxido de potasio o sodio (Véase, por ejemplo, Schmolka, J. Am. Oil Chem. Soc. 54 (1977) 110-116). La reacción se inicia por polimerización del bloque PO seguido por el crecimiento de las cadenas de EO en ambos extremos del bloque PO. La polimerización aniónica habitualmente produce polímeros con un índice de polidispersidad (*M*/*M*) relativamente bajo.

35 En algunas realizaciones, una composición que comprende un poloxámero de la presente invención comprende un poloxámero purificado y/o fraccionado (por ejemplo, purificado y/o fraccionado utilizando filtración en gel o fraccionamiento cromatográfico (Véase, por ejemplo, Emanuele et al., Expert Opin Investig Drugs. 1998; 7:1193-20, Patentes Estadounidenses Núm. 6.977.045 y 6.761.824). En algunas realizaciones, se utilizan poloxámeros de los que se eliminan mezclas (por ejemplo, mezclas de homopolímero de PO y/o copolímero de bloque). En algunas realizaciones, se utiliza un poloxámero (por ejemplo, copolímero de polioxipropileno/polioxietileno) que es optimizado para la actividad biológica mejorada (Véase, por ejemplo, la Patente Estadounidense Núm. 6.747.064). En algunas realizaciones, se utilizan formas químicamente modificadas de uno o más poloxámeros en las composiciones de la presente invención según se define en las reivindicaciones.

Las modificaciones químicas de los poloxámeros incluyen radiomarcado, acetilación, biotilación, adición de un fluoróforo y otras modificaciones químicas.

45 Puede utilizarse una variedad de poloxámeros (por ejemplo, en una composición que comprende un poloxámero) que posean características y rasgos similares (por ejemplo, efectos biológicos) a los de P188 (por ejemplo, en base a las características descritas en la FIG 8b). Estos poloxámeros incluyen, sin limitación, P138, P237, P288, P124, P338 y P407. Puede utilizarse un poloxámero con un peso molecular de entre 5000 y 9000 dáltones (por ejemplo, en una composición (por ejemplo, composición farmacéutica)). Puede utilizarse un poloxámero con un peso molecular de entre 9000 y 12000 dáltones (por ejemplo, en una composición (por ejemplo, composición farmacéutica)). Puede utilizarse un poloxámero con un peso molecular de entre 12000 y 15000 dáltones. También puede utilizarse un poloxámero con un peso molecular por debajo de 5000 o mayor que 15000 dáltones (por ejemplo, en una composición (por ejemplo, composición farmacéutica)).

50 Puede utilizarse un poloxámero con un contenido de polioxietileno mayor que 50% (por ejemplo, en una composición (por ejemplo, composición farmacéutica)). Puede utilizarse un poloxámero con un contenido de polioxietileno entre 50 y 60%. Puede utilizarse un poloxámero con un contenido de polioxietileno entre 60 y 70%. También pueden utilizarse poloxámeros con un contenido por debajo de 50% y por encima de 70% (por ejemplo, en una composición (por ejemplo, composición farmacéutica)).

Algunos usos biológicos comunes de P188 incluyen el uso como ablandador de heces en diversos laxantes comercialmente disponibles, como ingrediente en cosméticos y como emulsionante para agentes farmacéuticos. Es un poderoso tensioactivo. Se ha demostrado que P188 se inserta en las monocapas de lípidos (Véase, por ejemplo,

Maskarinec et al., 2002 Biophys. J. 82: 1453-1459). El mismo tiene muchos efectos biológicos *in vivo* incluyendo la reparación de las membranas celulares eléctricamente dañadas (Véase, por ejemplo, Lee et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4524-4528), en la administración controlada de fármacos, para sensibilizar tumores respecto de la quimioterapia (Véase, por ejemplo, Kabanov et al., Adv Drug Deliv Rev 2002, 54, 759-779), y para la administración de terapias génicas, entre otros. Además, P188 demostró tener un efecto sobre el flujo y viscosidad sanguíneos así como sobre la adhesividad plaquetaria. (Véase, por ejemplo, Grover et al., (1969) Circ. 39 y 40: I249, (Suppl. I)). Fue desarrollado como agente terapéutico con el nombre de RheothRx por Glaxo Welcome (Véase, por ejemplo, Adams- Graves et al., (1997), Blood 90: 2041-2046) y por CytRx con el nombre de FLOCOR para crisis oclusiva de vasos en la enfermedad de células falciformes y ha estado en ensayos clínicos de fase III (Véase, por ejemplo, Emanuele, (1998) Expert Opin. Investig. Drugs 7:1193-1200). También estuvo en ensayos de fase III para evaluar la actividad trombolítica en pacientes con infarto agudo de miocardio (MI) (CORE), con resultados mixtos (Schaer et al., (1996) Circ. 94: 298-307; Chareonthaitawe et al., (2000) Heart 84: 142-148). El mismo ha estado en ensayos de fase II como adyuvante de la angioplastia coronaria transluminal percutánea primaria para MI agudo (Véase, por ejemplo O'Keefe, et al., 1996 Am. J. Cardiol. 78: 747-750). De este modo, la presente invención se refiere al uso del poloxámero P188 para tratar la disfunción diastólica.

P188 es seguro cuando se administra agudamente durante hasta 72 horas (Véase, por ejemplo, Adams-Graves et al., (1997), Blood 90: 2041-2046) y es bien tolerado en niños y adultos con exposición repetida (Véase, por ejemplo, Gibbs and Hagemann, 2004 Ann. Pharmacother. 38: 320-324). El efecto adverso más significativo en los estudios con RheothRx fue la disfunción renal pero esto no se observó con la forma más altamente purificada FLOCOR. Los efectos adversos experimentados más frecuentemente fueron dolor, anomalidades en el sitio de inyección y náuseas. Tiene una vida media en plasma de 7,5 horas en roedores y 18 horas en sujetos humanos. Los estudios de farmacocinética han demostrado que <5% del poloxámero purificado es metabolizado. Se ha detectado un único metabolito de mayor peso molecular y depuración más lenta (Véase, Gibbs y Hagemann, 2004 Ann. Pharmacother. 38: 320-324). La depuración renal es la vía de eliminación primaria.

La presente invención proporciona una composición que comprende poloxámero (188) que puede utilizarse como una terapia primera en su clase para la disfunción diastólica. En algunas realizaciones, una composición que comprende un poloxámero (P188) proporciona beneficios sinérgicos o aditivos al ser administrado con una o más composiciones (por ejemplo, productos farmacéuticos, fármacos, etc.) utilizada actualmente para la enfermedad cardíaca.

Las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para tratar miocitos deficientes en distrofina (por ejemplo, que desarrollan más tensión, en comparación con los miocitos cardíacos normales, cuando se estiran hasta longitudes sarcoméricas fisiológicamente relevantes para la diástole). Las composiciones de la presente invención que comprenden un poloxámero pueden utilizarse para tratar o prevenir que las células del músculo cardíaco se vuelvan inestables (por ejemplo, que muestren fibrilaciones, acumulación de calcio, contractura y/o muerte celular). Por ejemplo, una composición que comprende un poloxámero de la presente invención puede utilizarse para incrementar la elasticidad celular y reducir el Ca^{+2} intracelular para controlar los niveles en miocitos cardíacos inestables. Aunque no es necesario el entendimiento del mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no se limita a ningún mecanismo de acción particular, el tratamiento de miocitos cardíacos inestables con una composición que comprende un poloxámero de la presente invención (por ejemplo, la administración de una composición que comprende un poloxámero a los miocitos) puede alterar (por ejemplo, neutraliza el efecto perjudicial, y/o reconstituye (por ejemplo, repara)) pequeñas roturas en el sarcolema.

Estudios *in vivo* de la función cardíaca revelaron que la infusión intravenosa de poloxámero en sujetos con anomalidades diastólicas del corazón (por ejemplo, ratones mdx) mejoró el desempeño hemodinámico basal, incluyendo un incremento en el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo (Véanse los Ejemplos 3-6). De este modo, la presente invención se refiere a un procedimiento para incrementar el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que padece disfunción diastólica) que comprende proporcionar a un sujeto y administrar al sujeto una composición que comprende un poloxámero (por ejemplo, P188, o equivalente del mismo). Las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para incrementar el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo en sujetos con insuficiencia cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca sintomática o de etapa final (por ejemplo, en sujetos con distrofia muscular; o, insuficiencia cardíaca en general)). Aunque no es necesario el entendimiento del mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no se limita a ningún mecanismo de acción particular, la administración de un poloxámero a un sujeto puede reducir los niveles de Ca^{+2} intracelular en miocitos cardíacos del sujeto, previniendo de ese modo la remodelación del tejido muscular cardíaco y/o invirtiendo la remodelación del tejido cardíaco debido a insuficiencia cardíaca. En algunas realizaciones, el defecto diastólico es consecuencia de la miocardiopatía. La miocardiopatía puede ser una o más de un grupo diverso de enfermedades caracterizadas por la disfunción del miocardio. Las miocardiopatías se clasifican hemodinámicamente en miocardiopatía dilatada, hipertrófica, restrictiva y obliterativa, y puede ser de etiología idiopática o conocida. Entre las etiologías de la miocardiopatía dilatada están el embarazo, fármacos y toxinas, tales como alcohol, cocaína y agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, doxorubicina y daunorubicina, dactinomomicina, dacarbazina, ciclofosfamida, mitomicina y antraciclina), y procesos autoinmunes e infecciosos. La miocardiopatía hipertrófica es hereditaria en más del 50% de los casos y tiene un patrón distintivo de hipertrofia de miocardio (por ejemplo, engrosamiento de músculo) habitualmente con un patrón de engrosamiento asimétrico del tabique

5 interventricular (también denominada hipertrofia septal asimétrica). Las miocardiopatías restrictivas habitualmente son el producto de una enfermedad infiltrativa del miocardio, tal como la amiloidosis, hemocromatosis o una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, y también puede observarse en ciertos pacientes diabéticos. La miocardiopatía obliterativa puede ser provocada por fibrosis endomiocárdica y síndrome hipereosinofílico. Una complicación común de todas las miocardiopatías es la insuficiencia cardíaca congestiva progresiva.

10 La insuficiencia cardíaca congestiva a menudo se define como la incapacidad del corazón de entregar un suministro de sangre oxigenada suficiente para satisfacer las necesidades metabólicas de los tejidos periféricos a las presiones de llenado normales. La insuficiencia cardíaca congestiva crónica puede ser el resultado de una enfermedad arterial coronaria, miocardiopatía, miocarditis, estenosis aórtica, hipertensión, hipertrofia septal asimétrica idiopática, coartación de la aorta, regurgitación aórtica, regurgitación mitral, derivaciones de izquierda a derecha, músculo hipertrofiado, tamponada pericárdica, pericarditis constrictiva, estenosis mitral, mixoma atrial izquierdo, trombo atrial izquierdo, cor triatriatum y numerosas otras afecciones. La insuficiencia cardíaca congestiva en general se distingue de otras causas de administración inadecuada de oxígeno (por ejemplo, el colapso circulatorio de hemorragia u otras causas de pérdida severa de volumen, congestión provocada por acumulación de líquido y falla de salida de alto rendimiento provocada por un incremento en las demandas periféricas que se producen en condiciones tales como tirotoxicosis, fístula arteriovenosa, enfermedad de Paget y anemia). La terapia para la insuficiencia cardíaca congestiva típicamente se ha focalizado en el tratamiento de la etiología subyacente y los síntomas de la acumulación de líquido e insuficiencia cardíaca. La insuficiencia cardíaca congestiva crónica que persiste después de la corrección de las causas reversibles puede ser tratada con diuréticos (por ejemplo, incluyendo, sin limitación, 20 tiazidas tales como clorotiazida e hidroclorotiazida), diuréticos en bucle (por ejemplo, incluyendo, sin limitación, ácido etacrínico, furosemida, torsemida y bumetanida), agentes ahorradores de potasio (por ejemplo, incluyendo, sin limitación, espironolactona, triamtereno y amilorida), y otros agentes (por ejemplo, incluyendo, sin limitación, metolazona y otras quinazolina-sulfonamidas), vasodilatadores (por ejemplo, nitroglicerina, dinitrato de isosorbide, hidralazina, nitroprusiato de sodio, prostaciclina, captopril, enalapril, lisinopril, quinapril y losartán), agentes 25 inotrópicos positivos (por ejemplo, digitalis o digoxina), bloqueadores beta, o combinaciones de uno o más de estos agentes.

30 Se prevé que una amplia variedad de sujetos se vean beneficiados por la administración de una composición de la presente invención. En realizaciones preferentes, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, los sujetos humanos son de cualquier edad (por ejemplo, adultos, niños, lactantes, etc.) que tienen o tienen posibilidad de padecer enfermedad cardíaca (por ejemplo, provocada por disfunción diastólica (por ejemplo, un sujeto con DMD)). En algunas realizaciones, los sujetos son mamíferos no humanos (por ejemplo, cerdos, ganado, cabras, caballos, ovejas u otro tipo de ganado; o ratones, ratas, conejos u otro animal comúnmente utilizado en ámbitos de investigación

35 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas. Una composición que comprende un poloxámero de la presente invención puede utilizarse terapéuticamente para corregir la disfunción diastólica. Una composición que comprende un poloxámero de la presente invención puede administrarse a un sujeto a través de una cantidad de vías y procedimientos de administración diferentes.

40 En realizaciones preferentes, una composición que comprende un poloxámero de la presente invención se administra a través de la administración intravenosa (IV). En algunas realizaciones, una composición de la presente invención puede administrarse una o más veces por día durante varios días. En algunas realizaciones, una composición de la presente invención puede administrarse una o más veces por día durante más de una semana. En algunas realizaciones, una composición de la presente invención puede administrarse una o más veces por día durante dos o más semanas. En algunas realizaciones, una composición de la presente invención puede administrarse una o más veces por día durante uno o más meses, dos o más meses, cuatro o más meses, ocho o 45 más meses, o durante más de un año. En realizaciones preferentes, una composición de la presente invención se administra (por ejemplo, a través de la administración crónica (por ejemplo, se administra una, dos, tres o más veces por semana en el consultorio de un médico durante una duración (por ejemplo, durante un período de semanas, meses o años) que sea suficiente para incrementar la función cardíaca y/o interrumpir el avance de la enfermedad y/o la remodelación inversa del tejido cardíaco (por ejemplo, reduciendo y manteniendo los niveles de calcio intracelular en los niveles normales). Se prevé que cualquier modo de administración que introduzca una composición de la presente invención en la vasculatura sea útil como medio de administración. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición de la presente invención se administra a través de la administración parenteral. Los ejemplos de administración parenteral incluyen la administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, inyección o infusión intramuscular, intratecal o intraventricular.

55 Las composiciones y formulaciones para la vía de administración parenteral, IV u otra vía de administración pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos apropiados tales como potenciadores de penetración, compuestos vehículos y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

60 Una composición de la presente invención puede formularse para la administración mediante cualquier vía, tal como intravenosa u otra vía descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, una composición de la presente invención puede comprender preparaciones acuosas estériles. Los vehículos y disolventes aceptables incluyen

agua, solución de Ringer, solución salina tamponada con fosfato y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos y estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite mineral o no mineral blando incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables. Pueden encontrarse formulaciones vehículo apropiadas para la administración IV, parenteral, mucosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, oral (por ejemplo, a través de la ingestión) o a través de otras vías en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19ª edición, 1995.

En realizaciones preferentes adicionales, una composición de la presente invención se administra en una cantidad (por ejemplo, una dosis) que es suficiente para incrementar la función cardíaca y/o interrumpir el avance de la enfermedad y/o remodelación inversa del tejido cardíaco (por ejemplo, reduciendo o manteniendo los niveles de calcio en los niveles normales). La dosis deseada puede variar dependiendo del sujeto que está siendo tratado (por ejemplo, la edad, estado de salud, y el tipo y/o grado de enfermedad cardíaca que está siendo tratada).

En algunas realizaciones, se espera que cada dosis (por ejemplo, de una composición que comprende un poloxámero (por ejemplo, administrada a un sujeto para prevenir o tratar la enfermedad cardíaca (por ejemplo, provocada por disfunción diastólica)) comprenda entre 100 - 200 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende entre 200-400 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende entre 400-500 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende 500-2000 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende menos de 100 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende más de 2000 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. Puede averiguarse una cantidad óptima para una administración particular mediante estudios estándar que implican la observación de la función diastólica y otras respuestas biológicas (por ejemplo, saturación de oxígeno en sangre) en sujetos.

En algunas realizaciones, se espera que cada dosis (por ejemplo, de una composición que comprende un poloxámero que se administra a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano)) tenga 30% en peso de poloxámero. Sin embargo, una dosis puede comprender más o menos que esta cantidad de poloxámero. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una dosis puede comprender entre 30-40% de poloxámero en peso. En algunas realizaciones, una dosis puede comprender entre 40-50% p/p de poloxámero. En algunas realizaciones, una dosis puede comprender 50-60% p/p de poloxámero. En algunas realizaciones, una dosis puede comprender más del 60% de poloxámero en peso.

En algunas realizaciones, las preparaciones farmacéuticas que comprenden un poloxámero se formulan en forma de dosificación unitaria para la facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria, según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una unidad físicamente discreta de la preparación farmacéutica apropiada para el sujeto sometido a tratamiento (por ejemplo, la administración de una composición de la presente invención). Cada dosificación debe contener una cantidad de las composiciones que comprenden un poloxámero calculada para producir la repuesta deseada (por ejemplo, incremento en la presión diastólica). Los procedimientos para determinar la unidad de dosificación apropiada, además de estar descritos en la presente memoria, son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Las unidades de dosificación pueden incrementarse o reducirse proporcionalmente en base a diversos factores, incluyendo el peso, edad y estado de salud del sujeto. Además, las unidades de dosificación pueden incrementarse y reducirse en base a la respuesta del sujeto al tratamiento (por ejemplo, ganancias o pérdidas de presión diastólica).

En ciertas realizaciones de la invención, las composiciones también pueden comprender uno o más alcoholes, compuestos que contienen zinc, emolientes, humectantes, agentes espesantes y/o gelificantes, agentes neutralizantes y tensioactivos. El agua utilizada en las formulaciones preferentemente es agua desionizada con un pH neutro.

Las composiciones de la presente invención además pueden contener otros componentes adyuvantes convencionalmente hallados en las composiciones farmacéuticas. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos, compatibles y adicionales tales como, por ejemplo, agentes antipruriginosos, astringentes, anestésicos locales o antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como tinturas, conservantes, antioxidantes, opacantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, dichos materiales, al añadirse, preferentemente no interfieren indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, pueden mezclarse con agentes auxiliares (por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir sobre la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares) que no interactúan en forma nociva con el poloxámero de la formulación.

La presente invención también se refiere a la coadministración de una composición que comprende un poloxámero

con uno o más agentes activos adicionales (por ejemplo, agentes que son conocidos en la técnica para tratar o prevenir la insuficiencia cardíaca). De hecho, otro aspecto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas mediante la coadministración de una composición de la presente invención. En los procedimientos de coadministración, los agentes pueden administrarse en forma concurrente o secuencial. Las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse antes que el otro agente activo. Las formulaciones farmacéuticas y modos de administración pueden ser cualesquiera de los descritos en la presente memoria. Además, los dos o más agentes coadministrados pueden administrarse cada uno utilizando diferentes modos (por ejemplo, vías) o diferentes formulaciones. Los agentes adicionales a ser coadministrados puede ser cualesquiera de los agentes bien conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitación, aquellos que están en uso clínico en la actualidad.

Se contempla que la administración de una composición que comprende un poloxámero pueda coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos conocidos para tratar la enfermedad cardíaca. Por ejemplo, los agentes que son conocidos en la técnica para el tratamiento de la enfermedad cardíaca incluyen diuréticos (por ejemplo, tiazidas tales como clorotiazida, hidroclorotiazida y metolazona), diuréticos en bucle (por ejemplo, ácido etacrínico, furosemida, torsemida y bumetanida y sus congéneres), agentes ahorradores de potasio (por ejemplo, espironolactona, canrenona, triamterena y amilorida, y otros agentes tales como metolazona y otras quinazolina-sulfonamidas), vasodilatadores (por ejemplo, nitrovasodilatadores (por ejemplo, nitroglicerina, dinitrato de isosorbide y nitroprusiato de sodio), hidralazina, prostaciclina, inhibidores de ACE (por ejemplo; captopril, enalapril, lisinopril, quinapril y ramipril) y antagonistas de angiotensina II (por ejemplo, losartán), agentes inotrópicos positivos (por ejemplo, glicósidos cardíacos (por ejemplo, digitalis o digoxina)), inhibidores de fosfodiesterasa (por ejemplo, amrinona y milrinona), antagonistas de receptores beta-adrenérgicos (por ejemplo, beta bloqueadores tales como propanolol, metoprolol, atenolol, pindolol, acebutolol, labetalol, carvedilol y celiprolol) o combinaciones de estas medidas (Véase, por ejemplo, Goodman y Gilman, Ch. 34, The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw Hill, N.Y. (1996)).

Las recomendaciones terapéuticas actuales para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca diastólica se basan en la evidencia orientada a la enfermedad, incluyendo la fisiopatología, la extrapolación de conocimientos acerca de otros aspectos de la enfermedad cardiovascular, datos de estudios pequeños y opinión de expertos. Los lineamientos basados en la evidencia del Colegio Norteamericano de Cardiología/Asociación de Cardiología Norteamericana (ACC/AHA) y el Instituto de Mejoras de Sistemas Clínicos (ICSI) proporcionan alguna información con respecto a los regímenes de tratamiento (Véase, por ejemplo, Hunt et al., *Circulation* 2001;104:2996-3007; Institute for clinical systems improvements. Health care guidelines. Enero de 2002:1-71).

Por ejemplo, se recomiendan modificaciones en el estilo de vida para reducir el riesgo de todas las formas de enfermedad cardiovascular. Las medidas incluyen pérdida de peso, dejar de fumar, cambios dietarios y ejercicio. La identificación y tratamiento de las condiciones comórbidas, tales como alta presión sanguínea, diabetes e hipercolesterolemia, son importantes en la reducción del riesgo de la posterior insuficiencia cardíaca.

Una composición que comprende un poloxámero de la presente invención puede coadministrarse con uno o más agentes farmacéuticos utilizados para tratar la insuficiencia cardíaca diastólica. Por ejemplo, el tratamiento farmacológico de la insuficiencia cardíaca diastólica está dirigido a normalizar la presión sanguínea, promover la regresión de la hipertrofia del ventrículo izquierdo, prevenir la taquicardia, tratar los síntomas de congestión y mantener la contracción atrial (Véase, por ejemplo, Hunt et al., *Circulation* 2001; 104: 2996-3007; Institute for clinical systems improvements. Health care guidelines. Enero de 2002:1-71; Zile and Brutsaert, *Circulation* 2002;105: 1503-8). Tal tratamiento con diuréticos y vasodilatadores a menudo es importante para reducir la congestión pulmonar. Sin embargo, se requiere cuidado para prevenir la excesiva diuresis, que puede reducir la precarga y volumen sistólico. Los sujetos con disfunción diastólica son sensibles a los cambios de volumen y precarga. Los beneficios potenciales de los beta bloqueadores surgen de su capacidad de disminuir el ritmo cardíaco, incrementar el tiempo de llenado diastólico, reducir el consumo de oxígeno, reducir la presión sanguínea y provocar la regresión de la hipertrofia del ventrículo izquierdo. Un grupo está evaluando el efecto del bloqueador beta nebivolol en el tratamiento de pacientes de edad avanzada con insuficiencia cardíaca diastólica (Véase, por ejemplo, Shibata et al., *Int J Cardiol* 2002; 86:77-85). Por consiguiente, en algunas realizaciones, se coadministra una composición que comprende un poloxámero (P188) con un diurético y/o un vasodilatador y/o un bloqueador beta a un sujeto para tratar o prevenir la enfermedad cardíaca (por ejemplo, enfermedad provocada por disfunción diastólica) en el sujeto.

Puede coadministrarse una variedad de diuréticos, incluyendo amilorida (MmAMOR), bumetanida (BUMEX), clorotiazida (DICTRIL), furosemida (LASIX), hidroclorotiazida (ESIDRIX), indapamida (LOZOL) y espironolactona (AL-DACTONE).

Puede coadministrarse una variedad de bloqueadores beta, incluyendo acebutolol (SECTRAL), atenol (TENORMIN), betaxolol (KERLONE), bisoprolol/hidroclorotiazida (ZIAC), bisoprolol (ZEBETA), carteolol (CARTROL), metoprolol (LOPRESSOR, TOPROL XL), nadolol (CORGRAD), propranolol (INDERAL), sotolol (BETAPACE) y timolol (BLO-CADREN).

Los múltiples beneficios de los inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina (ACE) en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular convierten a estos agentes en agentes terapéuticos prometedores para el tratamiento de la enfermedad cardíaca (por ejemplo, provocada por disfunción diastólica). Los inhibidores de ACE provocan la

regresión de la hipertropía del ventrículo izquierdo, reducen la presión sanguínea y previenen y/o modifican la remodelación cardíaca. Por consiguiente, una composición que comprende un poloxámero (por ejemplo, P188) puede coadministrarse con un inhibidor de ACE a un sujeto para tratar o prevenir la enfermedad cardíaca en el sujeto (por ejemplo, enfermedad provocada por disfunción diastólica).

- 5 Los ejemplos de inhibidores de ACE que encuentran su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención incluyen BRL 36.378 de Beecham según se divulga en las Patentes Europeas Núm. 80822 y 60668; MC-838 de Chugai divulgado en CA. 102:72588v y Jap. J. Pharmacol. 40:373 (1986); CGS 14824 de Ciba-Geigy (ácido 3-([1-etoxicarbonil-3-fenil-(1S)-propil]-amino)-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1-(3S)-benzazepin-1-acético HCl) divulgado en la Patente del Reino Unido Núm. 2103614 y CGS 16.617 (ácido 3-(S)-[[[(1S)-5-amino-1-carboxipentil]amino]-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1H-1-benzazepin-1-etanoico) divulgado en la Patente Estadounidense Núm. 4.473.575; cetapril (alacepril, Dainippon) divulgado en Eur. Therap. Res. 39:671 (1986); 40: 543 (1986); ramipril (Hoechst) divulgado en la Patente Europea Núm. 79-022 y Curr. Ther. Res. 40: 74 (1986); Ru 44570(Hoechst) divulgado en Arzneimittelforschung 35: 1254 (1985), cilazapril (Hoffman-LaRoche) divulgado en J. Cardiovasc. Pharmacol. 9:39 (1987); R.sub.O 31-2201 (Hoffman- LaRoche) divulgado en FEBS Lett. 165: 201 (1984); lisinopril (Merck) divulgado en Curr. Therap. Res. 37:342 (1985) y Solicitud de Patente Europea Núm. 12-401, indalapril (delapril) divulgado en la Patente Estadounidense Núm. 4.385.051; rentiapril (fentiapril, Santen) divulgado en Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 10: 131 (1983); indolapril (Schering) divulgado en J. Cardiovasc. Pharmacol. 5:643, 655 (1983); spirapril (Schering) divulgado en Acta. Pharmacol. Toxicol. 59 (Supp. 5):173 (1986); perindopril (Servier) divulgado en Eur. J. Clin. Pharmacol. 31:519 (1987); quinapril (Warner-Lambert) divulgado en la Patente Estadounidense Núm. 4.344.949 y CI 925 (Warner-Lambert) (ácido [3S-[2[R(*)R(*)]]3R(*)]-2-[2-[[1-(etoxicarbonil)-3-fenylpropil]amino]-1-oxopropil]-1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi-3-isoquinolincarboxílico HCl) divulgado en Pharmacologist 26:243, 266 (1984), WY-44221 (Wyeth) divulgado en J. Med. Chem. 26:394 (1983).

La insuficiencia cardíaca diastólica también puede tratarse con bloqueadores de los canales de calcio (por ejemplo, verapamil y diltiazem) y bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos. En casos de congestión o isquemia pulmonar, los pacientes también pueden recibir diuréticos o nitratos, respectivamente.

Los antagonistas de los canales de calcio pueden mejorar la función diastólica directamente, atenuando la homeostasis del calcio, o indirectamente, reduciendo la presión sanguínea, reduciendo o previniendo la isquemia de miocardio, promoviendo la regresión de la hipertrofia del ventrículo izquierdo, reduciendo la velocidad del ritmo cardíaco (por ejemplo, utilizando verapamil y/o diltiazem), y mejorando los parámetros de llenado del ventrículo izquierdo. Por consiguiente, una composición que comprende un poloxámero (P188) puede coadministrarse con un bloqueador de los canales de calcio (por ejemplo, verapamil y diltiazem) y/o un bloqueador de receptores beta adrenérgicos para tratar o prevenir la enfermedad cardíaca (por ejemplo, enfermedad provocada por la disfunción diastólica) en el sujeto.

Los ejemplos de bloqueadores de los canales de calcio incluyen amlodipina (NORVASC), bepridil (VASCOR), diltiazem (CARDIZEN, TIAZAC), felodipina (PLENDIL), nifedipina (ADALAT, PROCARDIA), nimodipina (NIMOTOP), nisoldipina (SU LAR) y verapamil (CALAN, ISOPTIN, VERELAN)

Verapamil ha demostrado por criterios objetivos mejorar la función diastólica, mejorar los síntomas e incrementar la tolerancia al ejercicio. En un ensayo doble ciego de cinco semanas realizado en 1990 por J.F. Setaro y colegas, 20 hombres de edad avanzada con disfunción diastólica aislada fueron tratados con verapamil o placebo. En aquellos que recibieron el fármaco, los síntomas mejoraron, el tiempo de ejercicio aumentó un 33%, la tasa máxima de llenado del ventrículo izquierdo se incrementó un 30% y el ritmo cardíaco disminuyó un 10% (p<0,05 para todos).

Una composición que comprende un poloxámero (P188) puede coadministrarse con un antagonista del receptor de angiotensina 2 y/o un bloqueador alfa y/o un agonista alfa central y/o una estatina para tratar o prevenir la enfermedad cardíaca (por ejemplo, enfermedad provocada por disfunción diastólica) en el sujeto.

Los ejemplos de antagonistas del receptor de angiotensina 2 que encuentran su uso en la presente invención incluyen candesartán (ATACAND), eprosartán (TEVETEN), irbesartán (AVAPRO), losartán (COZAAR), telmisartán (MICARDIS) y valsartán (DIOVAN). Los ejemplos de bloqueadores alfa que encuentran su uso en la presente invención incluyen mesilato de doxazosina (CARDURA), hidrocloreuro de prazosina (MINIPRESS), prazosina y politiazida (MINIZIDE) e hidrocloreuro de terazosina (HYTRIN). Los ejemplos de agonistas alfa centrales que encuentran su uso en la presente invención incluyen hidrocloreuro de clonidina (CATAPRES), hidrocloreuro de clonidina y clortalidona (CLORPRES, COMBIPRES), Acetato de Guanabenz (WYTENSIN), hidrocloreuro de guanfacina (TENEX), Metildopa (ALDOMET), Metildopa y clortiazida (ALDOCLOR), y metildopa e hidrocloreuro de guanfacina (ALDORIL). Los ejemplos de estatinas que encuentran su uso (por ejemplo, para la coadministración con una composición que comprende un poloxámero a un sujeto (por ejemplo, para tratar y/o prevenir la enfermedad cardíaca en el sujeto)) en la presente invención incluyen atorvastatina (LIPITOR), fluvastatina (LESCOL), lovastatina (MEVACOR), pravastatina (PRAVACHOL), rosuvastatina cálcica (CRESTOR) y simvastatina (ZOCOR).

PARTE EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar y además ilustrar ciertas realizaciones preferentes y

aspectos de la presente invención.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

5 Animales. Ratones de control (C57BL/10 SnJ) y *mdx* (C57BL/10 ScSn-*mdx*) obtenidos de Jackson Laboratories se mantuvieron en instalaciones de aislamiento con barrera en la Universidad de Michigan. Los procedimientos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité para el Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Michigan.

10 Medición de la longitud, tensión, y $[Ca^{2+}]$ intracelular ($[Ca]_i$) de miocitos cardíacos individuales. Se han informado procedimientos para aislar miocitos cardíacos de ratón adulto (Véase, por ejemplo, Coutu et al., *Circ Res* 94, 1235-41 (2004)). En síntesis, los miocitos individuales agudamente aislados se transfirieron a una cámara experimental que contenía una base de vidrio recubierta con silicona y electrodos de platino montados a los lados para estimular eléctricamente a los miocitos, que se montó en la platina de un microscopio invertido (TE300, Nikon; objetivo 40x). La cámara se mantuvo a 37°C con un dispositivo termoelectrónico. El sistema de medición de la longitud/tensión/ $[Ca^{2+}]_i$ de los miocitos cardíacos intactos de la membrana se desarrolló con modificaciones a partir de un procedimiento previamente informado (Véase, por ejemplo, Yasuda, S. I. et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H1442-6 (2001)) utilizando un par de fibras de microcarbono. Una fibra se conectó a un sistema transductor de fuerzas sensible (200 mV/mg, Aurora Scientific Inc., Canadá), y la otra se conectó a un traductor piezoeléctrico (P-173, PI Polytec) para controlar la longitud de los miocitos. Las fibras de carbono utilizadas en este estudio eran rígidas (diámetro, 40 μ m; elasticidad, 0,02 m/N), y no alteradas por las tensiones activa y pasiva producidas por los miocitos cardíacos individuales. La señal de tensión del transductor de fuerzas y la señal de longitud aplicada al traductor piezoeléctrico se registraron a una tasa de muestreo de 1000Hz con un sistema de registro análogo a digital (Accura 100, Nicolet). Los registros de video de los miocitos cardíacos se digitalizaron para medir la extensión celular y longitud del sarcómero a través de imágenes en una pantalla de computadora. Para la medición de $[Ca^{2+}]_i$, los miocitos se incubaron con éster acetoximetílico (AM) de Fura-2 5 μ M (Molecular Probes) y 0,02% de Pluronic F127 (Molecular Probes) durante 4 minutos a 37°C. Se obtuvieron muestras de la excitación de Fura-2 a 100 Hz utilizando un espectrómetro de fluorescencia basado en un microscopio (Photon Technology International). Se determinó $[Ca^{2+}]_i$ mediante un procedimiento previamente establecido (Véase, por ejemplo, Grynkiewicz et al., *J Biol Chem* 260, 3440-50 (1985)) después de sustraer la intensidad de fluorescencia de fondo. Se investigó el efecto de P188 (0,15 mM en tampón extracelular) (Véase, por ejemplo, Lee et al., *Ann N Y Acad Sci* 888, 266-73 (1999)) y nifedipina (1 μ M) sobre las características de extensión-tensión pasiva y $[Ca]_i$ de miocitos cardíacos individuales de control y *mdx*. En otro procedimiento, los miocitos cardíacos se estiraron durante la fase de elevación de tensión de contracción (contracción de alargamiento). Al restaurar SL, la tensión de contracción isométrica se comparó después y antes del estiramiento.

35 Hemodinámica Cardíaca In Vivo. Se adquirieron bucles de volumen de presión murinos mediante procedimientos descritos previamente (Véase, por ejemplo, Michele et al., *Circ Res* 91, 255-62 (2002)). En síntesis, se ventilaron ratones anestesiados con isoflurano al 2% y oxígeno al 98%. Se realizaron una toracotomía y pericardiotomía, y se insertó un catéter de volumen-presión en LV a través de una punción apical. Previo a la inserción del catéter, los ratones recibieron una infusión LV de \approx 150 μ l de albúmina humana al 10% con y sin P188 a una velocidad de \approx 200 μ l/kg/min. Después de la recolección de los datos hemodinámicos basales, se infundió dobutamina a una dosis de 40 42 μ g/kg/min. La dosis de P188, 460 mg/kg, demostró que era efectiva mitigando el daño muscular esquelético después de la electrocución (Véase, por ejemplo, Lee et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4524-8 (1992)). Se definió que se produjo la insuficiencia cardíaca aguda cuando la presión sistólica LV cayó debajo de 60 mmHg, ya que debajo de este nivel, la rápida descompensación y muerte serán sucesos frecuentes. Después de la provocación de 45 30 minutos con dobutamina o el desarrollo de insuficiencia cardíaca aguda, se calibraron las mediciones de volumen según se describe previamente (Véase, por ejemplo, Michele et al., *Circ Res* 91, 255-62 (2002)).

Ejemplo 2

Equipo mecánico a base de fibra de microcarbono

50 La presente invención proporciona una técnica de fibra de microcarbono única (Véase la FIG. 4) que permite por primera vez la evaluación simultánea de la fuerza y concentraciones de calcio intracelular de los miocitos intactos de la membrana aislada bajo carga mecánica fisiológicamente relevante. Al utilizar esta tecnología, los miocitos cardíacos adultos e intactos de membrana de ratones deficientes en distrofina (*mdx*) y de control se estiraron pasivamente en un intervalo fisiológicamente relevante de longitudes de sarcómero (1,75 a 2,2 μ m; (Véase, por ejemplo, Rodríguez, et al., *Am J Physiol* 263, H293-306 (1992))) y se registraron la tensión pasiva y $[Ca^{2+}]_i$. La FIG. 1A muestra microfotografías de miocitos de control y *mdx* en diferentes etapas durante el protocolo de estiramiento. 55 La FIG. 1B muestra registros simultáneos representativos de longitud, tensión y tasa de Fura-2 de miocitos cardíacos individuales de ratón de control y *mdx*. En la FIG. 1B, los trazos a la izquierda son la tensión de contracción activa y calcio transitorios durante una contracción isométrica eléctricamente estimulada en una longitud de sarcómero (SL) en reposo de 1,75-1,8 μ m. Los trazos restantes son registros de tensión y calcio durante el estiramiento pasivo del miocito a partir de una SL en reposo de 1,75 μ m (0% de estiramiento) hasta una SL

diastólica fisiológicamente relevante de 2,0 a 2,2 μm (20% de estiramiento).

Los resultados mostraron que la tensión de contracción isométrica máxima no es diferente entre los miocitos de control y *mdx* ($3,6 \pm 0,7$ y $4,4 \pm 0,8$ mN/mm^2 , respectivamente), lo que indica que el acoplamiento excitación-contracción y generación/transmisión de fuerza son normales en los miocitos *mdx*. La deficiencia en distrofina, sin embargo, provocó efectos significativos en los estiramientos fisiológicos pasivos en la longitud SL de miocitos (Véase la FIG. 1B). Con las excursiones pasivas de la SL en reposo de 1,8 μm a SLs mayores, los miocitos *mdx* desarrollaron tensión significativamente incrementada en comparación con los miocitos de control (Véase la FIG. 2A). Esto se contrapone con los estudios previos en miotubos esqueléticos, donde se descubrió que los músculos distróficos eran más elásticos que los músculos de control (Véase, por ejemplo, Pasternak et al., J Cell Biol 128, 355-61 (1995)). Los estiramientos a SL > 2,1 μm y mayores dieron por resultado que los miocitos *mdx* se volvieron inestables, con un incremento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$, fibrilaciones, acumulación de calcio eventual, y posterior contractura y muerte de miocitos (Véase la FIG. 1). Reducir el Ca^{2+} extracelular de 1,8 a 0,2 mM desplazó las curvas de tensión-extensión hacia la derecha permitiendo un estiramiento de hasta 2,3 μm en miocitos *mdx* y de control, lo que indica un importante papel del calcio extracelular para mediar la reducción de la elasticidad de los miocitos *mdx*.

Así, la presente invención demuestra un defecto primario en la elasticidad celular en miocitos *mdx* aislados individuales, con un incremento en la susceptibilidad a la inestabilidad de membrana mediada por estiramiento e hipercontractura dependiente del calcio.

Ejemplo 3

Estabilización de las membranas de miocitos *mdx*

A continuación, se determinó si un enfoque de reparación de membrana (por ejemplo, un enfoque de reparación de membrana basado en productos químicos) tendría eficacia en miocitos *mdx* aislados. El copolímero tribloque no iónico Poloxámero 188 [P188; poli(óxido de etileno)₇₀-poli(óxido de propileno)₃₅-poli(óxido de etileno)₇₀; PM ~8400g/mol], que previamente se demostró que se inserta en las monocapas de lípidos artificiales y repara las membranas biológicas dañadas (Véase, por ejemplo, Wu; G. et al., Phys Rev Lett 93, 028101 (2004); Lee et al., Proc Natl Acad Sci U S A 89, 4524-8 (1992)), se evaluó en cuanto a su capacidad para estabilizar las membranas de miocitos *mdx* durante condiciones de carga fisiológica *in vitro* (Véase la FIG. 2A). Dentro del intervalo de SL fisiológicamente relevante de 1,8 – 2,1 μm , P188 0,15 mM (Véase, por ejemplo, Lee et al., Ann N Y Acad Sci 888, 266-73 (1999)) restauró completamente la elasticidad de los miocitos *mdx* y $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta niveles de control (Véase la FIG. 2A). P188 también mejoró significativamente el desempeño de tensión por contracción después de una contracción de alargamiento. P188 no tuvo ningún efecto sobre la elasticidad de los miocitos C57BL/10 dentro de este intervalo de SL (Véase la FIG. 2A). El incremento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ resultante del estiramiento pasivo es significativamente mayor en los miocitos *mdx*, y esto es corregido por P188.

Para además tratar el mecanismo de ingreso de calcio, los miocitos se trataron con el bloqueador de canales de Ca^{2+} de tipo L nifedipina. En oposición a P188, el aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con el estiramiento SL no fue bloqueado por la nifedipina (Véase la FIG. 2B), sugiriendo que el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevado puede surgir de canales insensibles a DHP, o más posiblemente de pequeñas roturas en la membrana que son evitadas por P188 en los miocitos *mdx*.

Ejemplo 4

Prevención de la disfunción cardíaca en ratones *mdx*

Se determinó si estos efectos celulares de P188 para prevenir la inestabilidad de membrana inducida por estiramiento en miocitos cardíacos *mdx* se traduciría en la prevención de la disfunción cardíaca en ratones *mdx in vivo*. Se deprimió el desempeño hemodinámico del ventrículo izquierdo basal en ratones *mdx*, incluyendo una reducción en el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo (LVEDV) (Véase la FIG. 3; Tabla 1). El pretratamiento mediante infusión intravenosa de P188 aumentó LVEDV a los niveles observados en los corazones de control. Se llegó a la hipótesis de que el LVEDV inferior en los corazones *mdx* es una manifestación a nivel orgánico del defecto de membrana observado en miocitos aislados individuales, y que la remediación aguda de LVEDV en el corazón *mdx* es un efecto directo de P188 para restaurar la elasticidad normal en miocitos cardíacos *mdx* individuales (Véase la FIG. 2).

La miocardiopatía e insuficiencia agudas pueden ser incitadas por factores estresantes cardiovasculares en ratones *mdx* (Véase, por ejemplo, Danialou, et al., Faseb J 15, 1655-7 (2001)). Por ello, se ensayó si una provocación aguda de estrés con dobutamina *in vivo* provocaría insuficiencia cardíaca aguda, y si este fenotipo podría ser bloqueado por P188. Los ratones *mdx* no tratados tuvieron respuesta muy atenuada a la infusión de dobutamina y una incidencia significativa de insuficiencia cardíaca aguda (Véase la FIG. 3C) durante el régimen de ensayo con estrés de 30 minutos. El pretratamiento de animales *mdx* por infusión intravenosa de P188 inmediatamente mejoró la respuesta hemodinámica a la infusión de dobutamina, y confirió protección a partir de la insuficiencia cardíaca aguda inducida por dobutamina *in vivo* ($p=0,005$; Véase la FIG. 3C).

Tabla 1. Resumen de datos hemodinámicos basales. Los datos son SEM.

	C57BL/10 (n=13)	C57BL/10+ Poloxámero 188 (n=7)	<i>mdx</i> (n= 13)	<i>mdx</i> + Poloxámero 188 (n=11)
Ritmo cardíaco (bpm)	598±13	600±7	582±10	585±13
Volumen sistólico final (μl)	19±2	19±4	7±13	13±3
Volumen diastólico final (μl)	36±5	36±4	22±3	34±3
Presión máxima (mmHg)	107±4	115±6	89 ±2	89±3
Presión mínima (mmHg)	2,1±0,3	1,7±0,9	2,2±0,4	3,5±0,4
Volumen sistólico (μl)	19±2	19±3	16±2	24±2
(dP/dt) _{Max} (mmHg/s)	11,440 ± 660	13,390 ± 460	10,110 ± 619	10,880 ± 610
(dP/dt) _{Min} (mmHg/s)	-11,420 ± 616	-11,810 ± 440	-8,140 ± 580	-7,110 ± 390

Ejemplo 5

La administración de poloxámero restaura los defectos mecánicos pasivos en un modelo canino de miocardiopatía

5 Se estudiaron los efectos de P188 sobre las relaciones de tensión pasiva-extensión en miocitos cardíacos intactos individuales de membrana de perros normales y distróficos. Los estudios en miocitos ventriculares aislados de animales según el modelo de perro golden retriever deficiente en distrofina (GRMD, Véase, por ejemplo, Howell et al., Hum Gene Ther. 1998; 9: 629-634) muestran que la curva de tensión pasiva-extensión está marcadamente desplazada hacia arriba y hacia la izquierda en comparación con los miocitos de perro de control (Véase, FIG. 6). De este modo, la presente invención proporciona que el defecto de elasticidad celular observado en los miocitos cardíacos del modelo de ratón *mdx* es mucho más pronunciada en los miocitos distróficos de perros GRMD.

10 A continuación, se determinó si el tratamiento con poloxámero (por ejemplo, administración de una composición que comprende un poloxámero) utilizando P188 podía mejorar la función de los miocitos. Se observó que el P188 (150 μM) restaura la elasticidad y la función celular, según se pone de manifiesto en la forma y posición de la curva de tensión pasiva-extensión nuevamente casi completamente al nivel normal/control aún en estos miocitos caninos más severamente afectados que tienen miocardiopatía pronunciada. Estos datos demuestran que la magnitud del efecto correctivo resultante de la administración de un poloxámero a un sujeto distrófico (por ejemplo, el efecto de P188) es comparativamente mayor en miocitos distróficos caninos en comparación con los miocitos distróficos de ratón. Así, la presente invención demuestra que los miocitos cardíacos individuales de animales GRMD se ven severamente afectados en términos de propiedades mecánicas pasivas, y que estos defectos mecánicos pasivos son corregidos y restaurados por la administración de P188.

Ejemplo 6

La administración de poloxámero corrige el desempeño de relajación lento en miocitos caninos distróficos.

25 Después se determinó si P188 alteraría las propiedades contráctiles de contracción isométrica de los miocitos cardíacos individuales intactos de la membrana de perros normales y distróficos. Los datos generados durante el desarrollo de la presente invención indican que la deficiencia en distrofina tiene un efecto profundo sobre el lento desempeño de la relajación en miocitos individuales bajo carga fisiológica. Más importante aún, la administración de un poloxámero (P188) corrigió agudamente este defecto de relajación (Véase la FIG. 7). Aunque no es necesario el entendimiento del mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no se limita a ningún mecanismo de acción particular, en algunas realizaciones, la administración de un poloxámero (P188) corrige los defectos de inestabilidad de membrana inducidos por contracción y el consecuente ingreso de Ca²⁺ (por ejemplo, acumulación de calcio), previniendo de ese modo la alteración de las propiedades mecánicas (por ejemplo, la disfunción diastólica) de un corazón distrófico intacto (por ejemplo, miocitos y tejido cardíacos).

35

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un poloxámero-188 para su uso en el tratamiento de la disfunción diastólica en un sujeto.
- 5 2. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho poloxámero es un poloxámero purificado o fraccionado.
3. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho sujeto es un sujeto humano.
4. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición se administra mediante administración intravenosa.
- 10 5. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho sujeto es un sujeto deficiente en distrofina.
6. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicho sujeto tiene distrofia muscular de Duchene.
- 15 7. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición que comprende un poloxámero-188 es coadministrada con uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en un diurético, un diurético en bucle, un agente ahorrador de potasio, un vasodilatador, un inhibidor de ACE, un antagonista de angiotensina II, un agente inotrópico positivo, un inhibidor de la fosfodiesterasa, un antagonista de receptores beta-adrenérgicos, un bloqueador de canales de calcio, un nitrato, un bloqueador alfa, un antagonista central alfa, una estatina o una combinación de estos agentes.

20

25

30

35

40

FIGURA 1

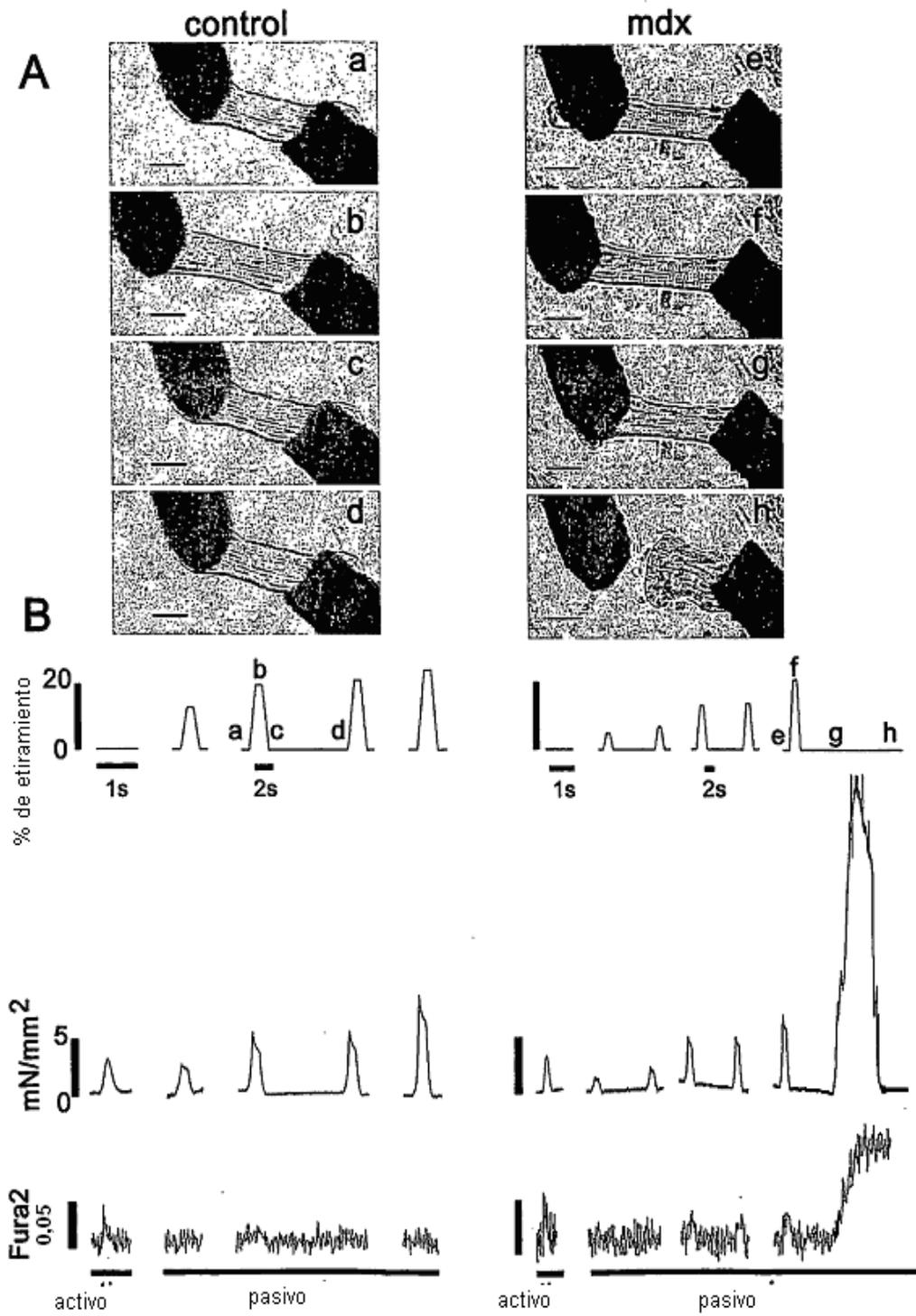


FIGURA 2

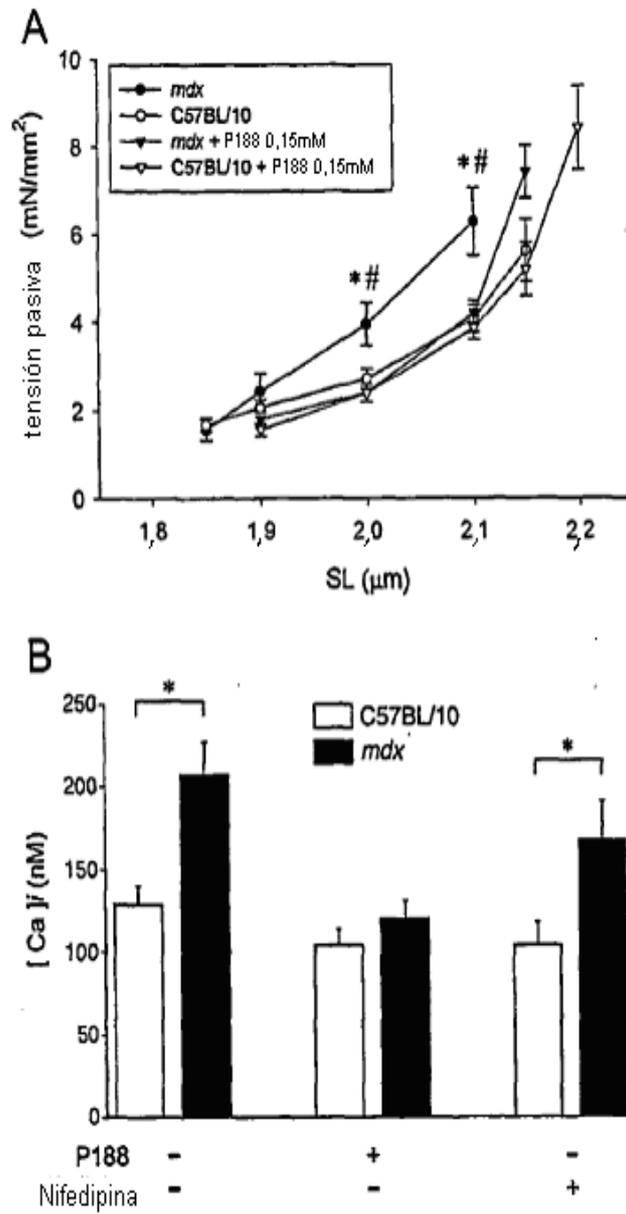


FIGURA 3

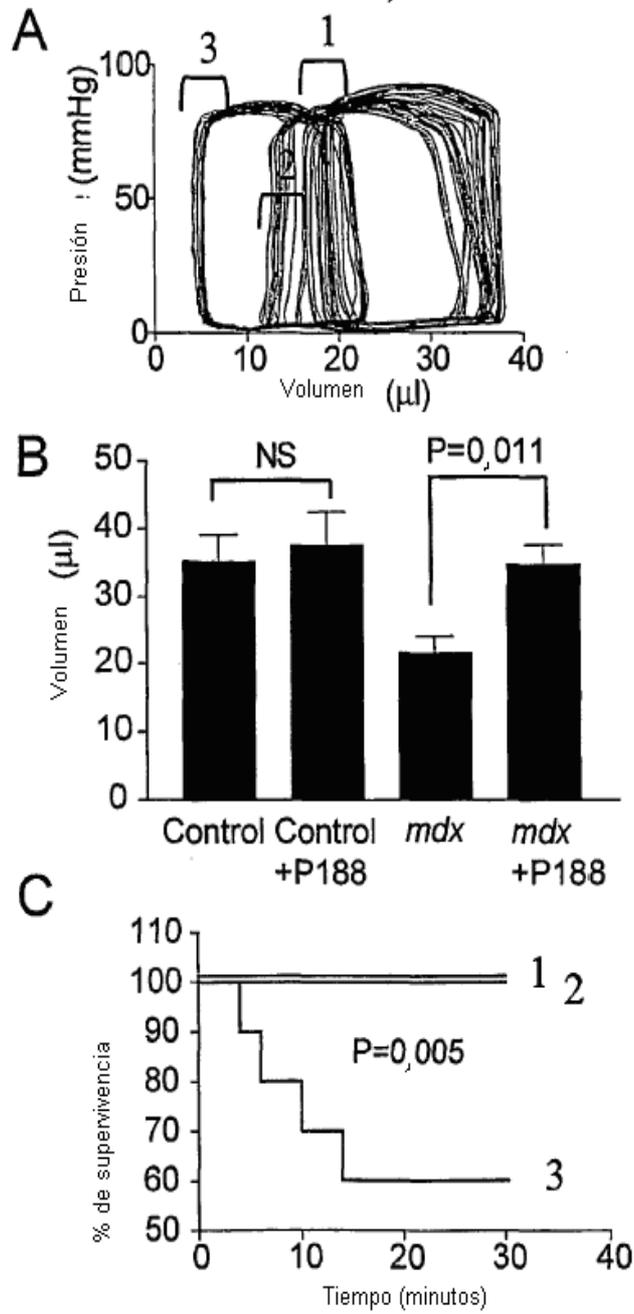


FIGURA 4

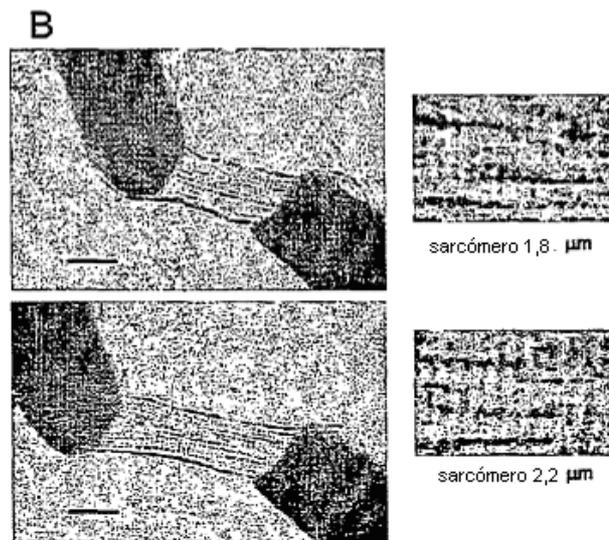
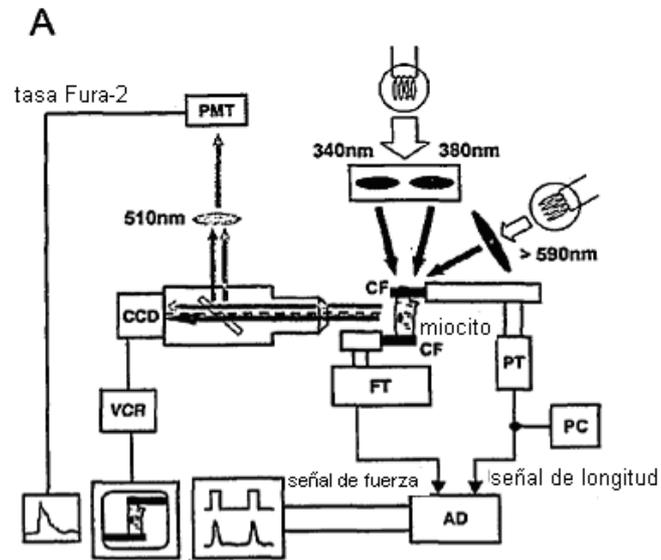
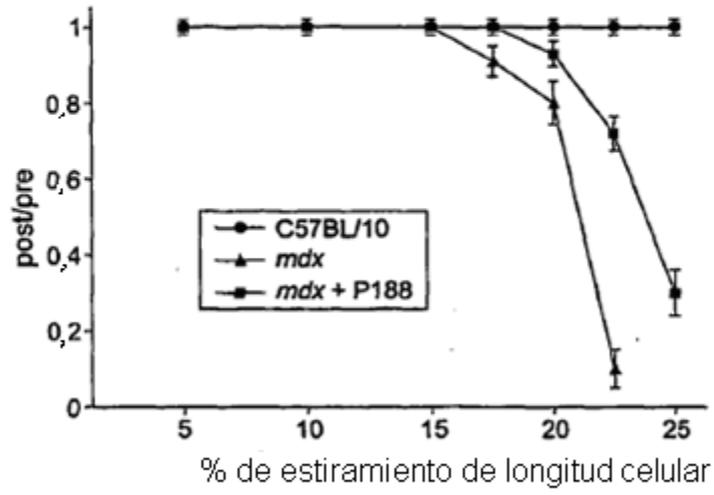


FIGURA 5



5

10

15

FIGURA 6

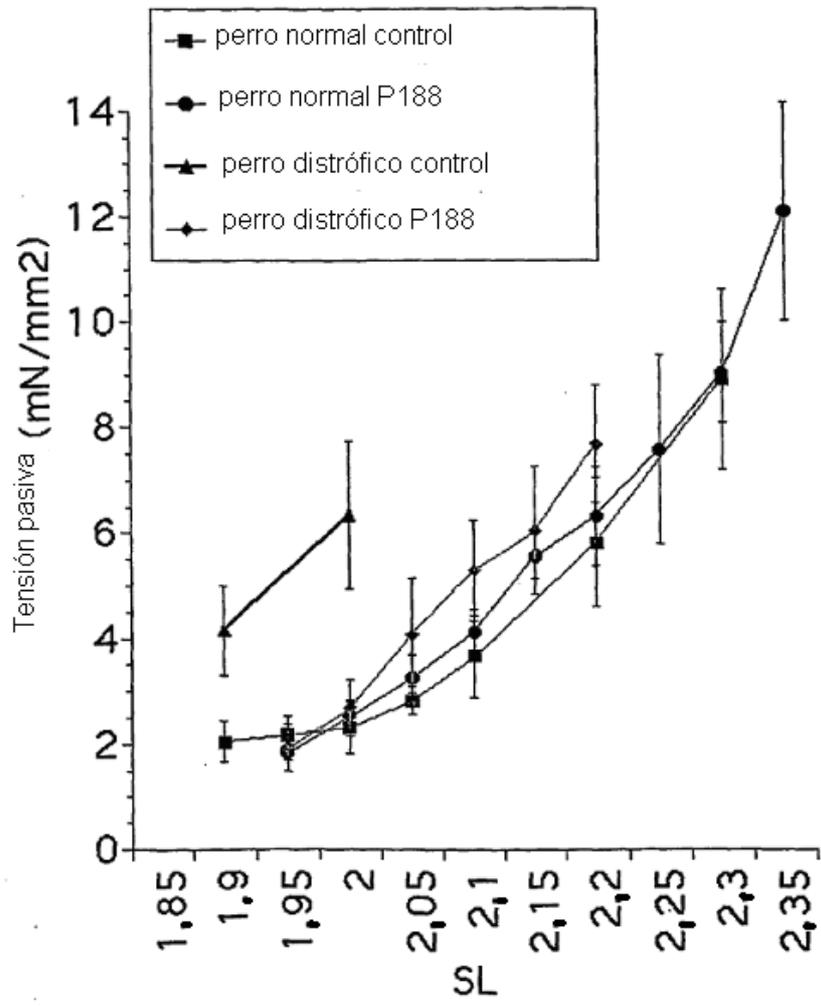


FIGURA 7

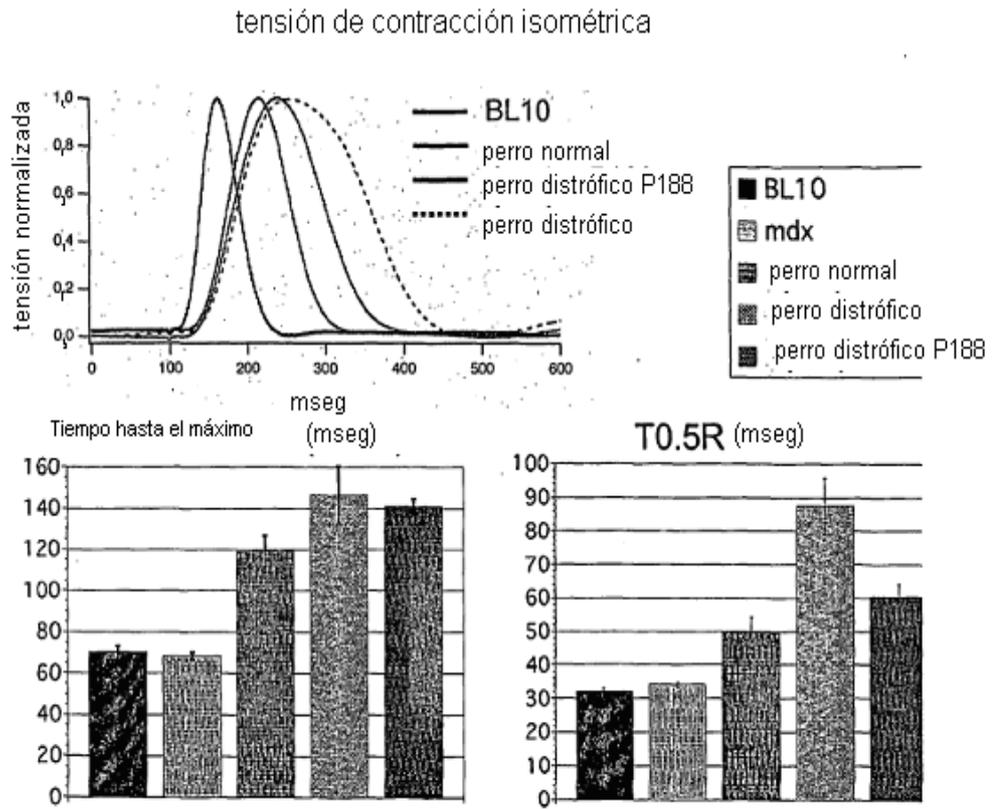
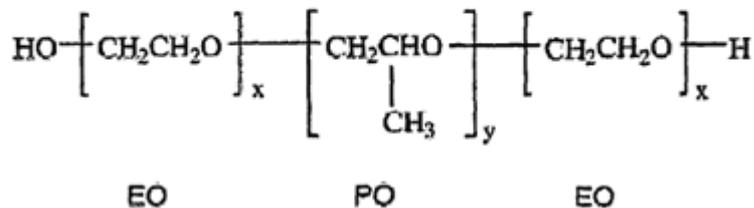


FIGURA 8

A



B

Copolímero	PM ^a	Número de unidades de EO promedio (x) ^b	Número de unidades de PO promedio (y) ^b	HLB ^c	Punto de enturbiamiento en solución acuosa al 1% (°C) ^c	CMC (M) ^d
L35	1900	21,59	16,38	19	73	5,3 X 10 ⁻³
L43	1850	12,61	22,33	12	42	2,2 X 10 ⁻³
L44	2200	20,00	22,76	16	65	3,6 X 10 ⁻³
L61	2000	4,55	31,03	3	24	1,1 X 10 ⁻⁴
L62	2500	11,36	34,48	7	32	4,0 X 10 ⁻⁴
L64	2900	26,36	30,00	15	58	4,8 X 10 ⁻⁴
F68	8400	152,73	28,97	29	>100	4,8 X 10 ⁻⁴
L81	2750	6,25	42,67	2	20	2,3 X 10 ⁻⁵
P84	4200	38,18	43,45	14	74	7,1 X 10 ⁻⁵
P85	4600	52,27	39,66	16	85	6,5 X 10 ⁻⁵
F87	7700	122,50	39,83	24	> 100	9,1 X 10 ⁻⁵
F88	11400	207,27	39,31	28	>100	2,5 X 10 ⁻⁴
L92	3650	16,59	50,34	6	26	8,8 X 10 ⁻⁵
F98	13000	236,36	44,83	28	>100	7,7 X 10 ⁻⁵
L101	3800	8,64	58,97	1	15	2,1 X 10 ⁻⁶
P103	4950	33,75	59,74	9	86	6,1 X 10 ⁻⁶
P104	5900	53,64	61,03	13	81	3,4 X 10 ⁻⁶
P105	6500	73,86	56,03	15	91	6,2 X 10 ⁻⁶
P108	14600	265,45	50,34	27	> 100	1,2 X 10 ⁻⁵
L121	4400	10,00	68,28	1	14	1,0 X 10 ⁻⁶
P123	5750	39,20	69,40	8	90	4,4 X 10 ⁻⁶
F127	12600	200,45	65,17	22	> 100	2,8 X 10 ⁻⁶

a Pesos moleculares promedio proporcionados por el fabricante (BASF, Wyandotte, MI).

b Los números de unidades de EO y PO promedio se calcularon utilizando los pesos moleculares promedio.

c Valores de HLB de los copolímeros; los puntos de enturbiamiento fueron determinados por el fabricante.

d Los valores de concentración micelar crítica se determinaron previamente utilizando una muestra de pireno (Véase, por ejemplo, Kozlov et al., *Macromolecules* 33 (2000) 3305-3313)