

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 301**

51 Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 15/04 (2006.01)

A61P 7/10 (2006.01)

A61P 7/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2011 E 11709841 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2544706**

54 Título: **Modulación de acuaporinas con relaxina**

30 Prioridad:

15.03.2010 US 340349 P

10.03.2010 US 339981 P

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

17.07.2015

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (50.0%)
Grattan Street
Parkville VIC 3010, AU y
THE UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

PARRY, LAURA y
CONRAD, KIRK

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 541 301 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

Modulación de acuaporinas con relaxina

Campo técnico

5 La presente descripción se refiere a composiciones para modular los canales de acuaporina. Particularmente, la descripción proporciona métodos de modulación de los canales de acuaporina en un tejido de un mamífero, mediante la administración de relaxina.

Antecedentes de la invención

La Familia de las Acuaporinas

10 Las acuaporinas son una familia de pequeñas proteínas de membrana integrales, formadoras de poros (24-30 kDa) caracterizadas por seis hélices transmembranales que permiten selectivamente el paso de agua u otras moléculas pequeñas sin carga a lo largo de un gradiente osmótico. Estas proteínas forman tetrámeros, en donde cada monómero define un solo poro. La familia de las proteínas acuaporinas recibió su nombre por la proteína intrínseca mayor (PIM) del cristalino de los mamíferos, la cual actualmente se designa como AQP0. Cuando eventualmente se demostró que los homólogos de la PIM funcionaban como canales de agua, se adoptó el nombre de acuaporinas para esta familia. La familia de las acuaporinas tiene representantes en todos los reinos, incluyendo los reinos archaea, eubacteria, fungi, plantas y animales. Los homólogos de la PIM con una permeabilidad al agua exclusiva se refieren como acuaporinas, mientras que los homólogos permeables al agua y al glicerol se refieren como acuagliceroporinas. En los vertebrados, hasta la fecha se han identificado once diferentes acuaporinas, correspondiente a las proteínas humanas AQP0-AQP10. De éstas, siete acuaporinas (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 y AQP8) han sido caracterizadas como acuaporinas clásicas, que promueven el transporte de agua en mamíferos. Las otras cuatro acuaporinas (AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10) promueven el transporte de glicerol en mamíferos y, por lo tanto, se les ha asignado a la subfamilia GLP. Se han identificado acuaporinas adicionales en *E. coli*, levaduras y plantas (Kruse et al. (2006) *Genome Biology* 7(2)(206):1-6).

25 El primer miembro de la familia de las acuaporinas que fue extensamente descrito, fue la proteína de membrana integral similar a un canal, de la membrana eritrocitaria de seres humanos. Esta proteína fue conocida originalmente como la proteína de 28 kDa CHIP28. Con base en análisis funcionales, esta proteína posteriormente fue renombrada a acuaporina-1 (AQP1). Experimentos con la secuencia de proteína primaria de la acuaporina-1 (AQP1), predijeron seis hélices transmembranales (I-VI) conectadas por cinco asas (asas A-E). Las asas A, C y E son extracelulares y las asas B y D son intracelulares. Además, la proteína comprende dos repeticiones en tándem internas, abarcando aproximadamente las mitades amino-terminal y carboxilo-terminal de la proteína. Cada repetición consiste de tres hélices transmembranales y un asa altamente conservada después de la segunda hélice transmembranal (asas B y E, respectivamente). Esta asa incluye el motivo de firma conservada asparagina-prolina-alanina (NPA). Las asas B y E forman hélices α cortas que se pliegan en la membrana, en donde el asa B entra a la membrana desde el lado citoplasmático, y el asa E desde el lado extracelular. Un séptimo dominio transmembranal, en el cual las dos cajas NPA están orientadas a 180 grados una con respecto a la otra, se forma creando una ruta acuosa a través del poro proteico. Como todas las acuaporinas están estructuralmente relacionadas y tienen regiones similares consensuales, particularmente en los dominios formadores de poro, es probable un mecanismo de transporte similar. El dominio hidrofóbico creado por las asas B y E, se ha sugerido que está involucrado en la especificidad de sustrato y/o en la restricción del tamaño. La trayectoria a través del monómero de acuaporina está forrada con residuos hidrofóbicos conservados, que permiten el rápido transporte de agua en forma de una sola cadena de moléculas de agua con enlaces de hidrógeno. El poro contiene dos sitios de constricción; es decir, una región aromática que comprende un residuo arginina conservado (Arg195) forma la parte más estrecha del poro, mientras que los motivos NPA altamente conservados, forman un segundo filtro, en donde moléculas de agua individuales interactúan con las dos cadenas laterales de asparagina. Como hay una interacción directa entre las moléculas de agua y los motivos NPA, la molécula de agua dipolar rota 180 grados durante su paso a través del poro. Ambas regiones de filtro constituyen barreras electrostáticas, las cuales previenen la permeación de protones. En la AQP1 humana, una cadena lateral de fenilalanina hidrofóbica (Phe24) se incrusta en el poro y mejora la interacción de moléculas de agua de permeación individuales, con las asas NPA. De hecho, la Phe24 actúa como un filtro de exclusión de tamaño, evitando el paso de moléculas más grandes, tales como el glicerol, a través de la AQP1. La permeabilidad al agua de las acuaporinas humanas, se estima que está entre $0,25 \times 10^{-14} \text{ cm}^3/\text{seg.}$ para la AQP0 y $24 \times 10^{-14} \text{ cm}^3/\text{seg.}$ para la AQP4. Sin embargo, se piensa que las acuaporinas tienen diferentes requerimientos de osmorregulación y movimiento de agua transmembranal en diferentes tejidos, órganos y etapas del desarrollo. En mamíferos, las acuaporinas están localizadas en epitelios que necesitan una alta tasa de flujo de agua, tales como el conducto colector de los riñones, los capilares pulmonares, y las células secretorias de las glándulas salivales. Además, las acuaporinas de mamífero difieren en su regulación transcripcional, regulación postranscripcional y distribución subcelular (Kruse et al. (supra)).

Edema

El edema es la hinchazón de tejidos que ocurre cuando se acumula un exceso de líquido dentro de dichos tejidos. El edema es un síntoma de enfermedades sistémicas; es decir, enfermedades que afectan a varios sistemas de órganos del cuerpo. Podría ser causado por trastornos locales que involucran sólo las extremidades afectadas. En edema periférico, la hinchazón es el resultado de la acumulación de demasiado líquido bajo la piel, en los espacios dentro de los tejidos, también conocidos como espacios intersticiales o el intersticio conformado por tejido conectivo. La mayoría de los fluidos corporales que se encuentran fuera de las células, normalmente son almacenados en los vasos sanguíneos y en los espacios intersticiales. En varias enfermedades y bajo ciertas condiciones, se puede acumular un exceso de fluido en uno de ellos o ambos de los compartimientos ya mencionados. Los trastornos locales más comunes que causan edema son venas varicosas y tromboflebitis; es decir, la inflamación de las venas profundas de las piernas. Estos trastornos pueden causar un inadecuado bombeo de sangre por las venas, lo cual, a su vez, causa una insuficiencia venosa. El aumento en la presión de retroceso en las venas, obliga al líquido a permanecer en las extremidades, particularmente en los tobillos y pies. El exceso de líquido, entonces, se escapa hacia los espacios intersticiales, causando un edema. Aunque la inflamación puede limitarse a áreas específicas como las extremidades inferiores, también se puede diseminar sobre áreas grandes del cuerpo. El edema sistémico está más comúnmente asociado con enfermedades del corazón, del hígado y de los riñones. Ocurre principalmente porque el cuerpo retiene demasiada sal; es decir, cloruro de sodio, El exceso de sal causa que el cuerpo retenga agua. Esta agua, entonces, se drena hacia los espacios intersticiales, por lo que aparece el edema.

En general, el edema se clasifica por la localización del tejido hinchado. Existen numerosos ejemplos tales como el edema periférico, el cual principalmente es una hinchazón de las extremidades inferiores, el edema pulmonar, que es una acumulación de líquido en los pulmones; el edema periorbital, que es una hinchazón alrededor de los ojos, el edema ocular, que es una retención de líquido en la córnea; el edema cerebral, que es una hinchazón del tejido cerebral; la ascitis (exceso de fluido en el abdomen); el edema masivo (es decir, anasarca), que es una hinchazón que abarca gran parte del cuerpo; y similares. Otros lugares del cuerpo que pueden hincharse incluyen las encías, los ganglios linfáticos, el rostro, el abdomen, las mamas, el escroto, hígado, y las articulaciones. Los signos y síntomas del edema varían dependiendo de la ubicación del tejido y de la extensión de la inflamación. Para muchos tipos de edema, se acumula líquido bajo la piel, causando una inflamación y haciendo que el área se estire y quede brillante. El edema puede ser con fovea o sin fovea. En el edema con fovea, la presión de un dedo contra un área hinchada y después quitarlo, deja un hundimiento que desaparece lentamente. Cuando el edema se vuelve más grave, el tejido se inflama tanto que no puede ser desplazado y no se deja ningún hundimiento en la piel después de aplicar presión, tal como sucede en el edema sin fovea. Un edema que ocurre sobre puntos de presión de áreas con hueso del cuerpo, puede derivar en llagas o úlceras graves, especialmente en pacientes postrados en cama.

Se sabe que el edema por sí mismo es un síntoma asociado con varias enfermedades subyacentes diferentes, tal como enfermedad renal, hepática y cardíaca. Por lo tanto, el edema puede ser una manifestación de largo plazo y progresiva de un trastorno con consecuencias graves. Por ejemplo, un edema pulmonar puede ser una complicación de una insuficiencia cardíaca. Como el corazón bombea con menos eficiencia, se escapa líquido fuera de las venas en los pulmones y llena los sacos de aire o alveolos, lo cual dificulta la respiración. El edema pulmonar puede poner en peligro la vida y, si no se trata, rápidamente puede causar la muerte. Los síntomas del edema pulmonar incluyen acortamiento de la respiración, quejidos al respirar, crepitación o estertores en los pulmones, que se escuchan con el estetoscopio, jadeos, ansiedad, agitación, tos, sudoración excesiva, piel anormalmente pálida (palidez), pulso o ritmo cardíaco anormal, y dolor de pecho. Sin embargo, incluso pacientes con insuficiencia cardíaca menos grave, que podría no conducir a edema no pulmonar, podrían aún experimentar una inflamación en las extremidades inferiores. El edema también puede ser causado por enfermedad pulmonar crónica. La enfermedad pulmonar crónica grave, tal como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), el enfisema o la bronquitis crónica, pueden restringir el flujo de sangre en los vasos sanguíneos de los pulmones. El flujo de sangre restringido crea presión en los vasos sanguíneos, que puede regresar a través del resto del sistema circulatorio. Esta presión, a su vez, causa la fuga de líquido a los tejidos de alrededor, causando hinchazón; es decir, edema, tal como en las piernas y pies.

Algunas causas adicionales de edema son venas varicosas (como resultado de la acumulación de sangre en la porción inferior de las piernas); estar sentado o parado durante mucho tiempo, tal como en el edema ortoestático (por ejemplo, como resultado, del clima caliente, estancias prolongadas en avión y viajes en automóvil); ciertos medicamentos (por ejemplo, anticonceptivos orales que contengan estrógeno o progesterona, medicamentos para la presión arterial, ciertos antidepresivos, corticosteroides orales, testosterona); embarazo (como resultado de un aumento en la presión arterial en las extremidades inferiores, lo cual puede deberse a preeclampsia); reacciones alérgicas; quemaduras de sol; desnutrición, lesiones o traumas; bloqueos en el sistema linfático (por ejemplo, causados por infecciones, inflamaciones o cáncer), exposición a altitudes altas como en el edema de altura; cambios hormonales asociados con la menstruación en algunas mujeres; síndrome nefrótico (en el cual los riñones dañados pierden proteínas en exceso en la orina, causando una grave inflamación en los tobillos); y enfermedad hepática grave (que causa cirrosis e inflamación excesiva de los tobillos).

Como el edema a menudo es un síntoma de otros trastornos subyacentes, los factores de riesgo del edema son los mismos que los de otros trastornos subyacentes. Como tales, los mismos factores de riesgo que en la enfermedad renal, hepática, cardíaca y pulmonar, se aplican al edema. Por ejemplo, fumar es un factor de riesgo mayor para la

enfermedad pulmonar crónica, la presión arterial alta es un factor de riesgo mayor para la enfermedad cardíaca, y la obesidad es un factor de riesgo mayor tanto para enfermedad cardíaca como para diabetes. Todos estos factores de riesgo también incrementan el riesgo en un sujeto de desarrollar edema. Además, el edema se presenta más comúnmente en individuos de mayor edad, debido a que muchas de las causas subyacentes del edema ocurren con más frecuencia en poblaciones de mayor edad. El documento US 5952296 describe el uso de la relaxina como un agente terapéutico para tratar disfunciones de equilibrio de líquidos y electrolitos.

Breve descripción de las modalidades preferidas

La presente invención se refiere a una relaxina farmacéuticamente activa para su uso como un medicamento para el tratamiento de la diabetes insípida nefrogénica en un sujeto que lo necesite.

Un aspecto de la descripción proporciona un método para modular un canal de acuaporina en un mamífero, que incluye administrarle al mamífero una relaxina en una cantidad efectiva para modificar la expresión de la acuaporina, en un tejido del mamífero. La expresión de la acuaporina puede ser la expresión de un gen de acuaporina y/o la expresión de una proteína acuaporina. Tanto la expresión del gen de acuaporina como de la proteína pueden ser reguladas de manera ascendente o descendente. En una modalidad, el gen del canal de acuaporina incluye, pero no se limita al gen de acuaporina-0 (aqp0), gen de acuaporina-1 (aqp1), gen de acuaporina-2 (aqp2), gen de acuaporina-3 (aqp3), gen de acuaporina-4 (aqp4), gen de acuaporina-5 (aqp5), gen de acuaporina-6 (aqp6), gen de acuaporina-7 (aqp7), gen de acuaporina-8 (aqp8), gen de acuaporina-9 (aqp9) y el gen de acuaporina-10 (aqp10). En otra modalidad, el canal de acuaporina incluye, pero no se limita a la acuaporina-0 (aqp0), acuaporina-1 (AQP1), acuaporina-2 (AQP2), acuaporina-3 (AQP3), acuaporina-4 (AQP4), acuaporina-5 (AQP5), acuaporina-6 (AQP6), acuaporina-7 (AQP7), acuaporina-8 (AQP8), acuaporina-9 (AQP9) y acuaporina-10 (AQP10). En otro aspecto más, el gen del canal de acuaporina incluye, pero no se limita al gen de acuaporina-1 (AQP1), gen de acuaporina-2 (AQP2), gen de acuaporina-3 (AQP3), gen de acuaporina-4 (AQP4) y gen de acuaporina-5 (AQP5).

Otro aspecto de la descripción proporciona un método para modular un canal de acuaporina en un mamífero, que incluye administrarle relaxina al mamífero en una cantidad efectiva para modificar la expresión de la acuaporina en un tejido del mamífero, en donde la expresión de acuaporina incluye uno o más genes de acuaporina *aqp2*, *aqp3*, *aqp4* y *aqp5* y/o proteínas de acuaporina AQP2, AQP3, AQP4 y AQP5. En un aspecto *aqp3* está regulado por incremento en el cuello uterino. En otro aspecto, *aqp5* está regulado por disminución en el cuello uterino. En otro aspecto, AQP5 está regulada por disminución en el cuello uterino. En otro aspecto, *aqp2* y *aqp4* están regulados por incremento en el riñón. En otro aspecto más, AQP2 y AQP4 están reguladas por incremento en el riñón.

Otro aspecto de la descripción proporciona un método para modular un canal de acuaporina en un mamífero, que incluye administrarle relaxina al mamífero en una cantidad efectiva para modificar la expresión de la acuaporina en un tejido del mamífero, en donde el tejido incluye, pero no se limita a, tejido de órganos, tejido muscular, tejido epitelial y tejido endotelial. En una opción, el tejido de órganos incluye, pero no se limita a, tejido cerebral, tejido renal, tejido pulmonar y tejido reproductivo. En otra modalidad, el mamífero es un ser humano.

La presente descripción además abarca un método para modular un canal de acuaporina en un mamífero, mediante la administración de relaxina al mamífero. En una opción, la relaxina modula la expresión del gen de acuaporina. En otra opción, la relaxina modula la expresión de la proteína acuaporina. En todavía otra opción, el gen de acuaporina incluye, pero no está limitado al gen de acuaporina-1 (aqp1), gen de acuaporina-2 (aqp2), gen de acuaporina-3 (aqp3), gen de acuaporina-4 (aqp4) y el gen de acuaporina-5 (aqp5). En otra opción, la proteína acuaporina incluye, pero no se limita a acuaporina-1 (AQP1), acuaporina-2 (AQP2), acuaporina-3 (AQP3), acuaporina-4 (AQP4) y acuaporina-5 (AQP5).

Otro aspecto de la descripción proporciona un método para el tratamiento del edema. El método incluye administrarle una relaxina farmacéuticamente activa a un ser humano, en una cantidad efectiva para reducir la acumulación de fluido asociada con el edema, en un tejido del ser humano. La relaxina se proporciona en forma de una formulación farmacéutica para el tratamiento del edema. La relaxina empleada en las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, puede ser, por ejemplo, relaxina sintética o recombinante, o un agonista de relaxina farmacéuticamente efectivo. En un aspecto de la presente invención, la relaxina es la relaxina humana H1. En otra opción, la relaxina es la relaxina humana H2. En otra opción más, la relaxina es la relaxina humana H3. En otra opción, la relaxina es relaxina humana sintética o relaxina humana recombinante, o un agonista de relaxina farmacéuticamente efectivo. Así pues, el sujeto puede ser tratado para el edema con una formulación farmacéutica de relaxina humana sintética o recombinante, o un agonista de relaxina, o cualquier agente que tenga actividad similar a la relaxina. En una opción de la presente invención, el sujeto es tratado con relaxina humana sintética. En otra opción, el sujeto es tratado con relaxina humana recombinante. En otra opción más, el sujeto es tratado con un agonista de relaxina farmacéuticamente efectivo. La relaxina puede ser administrada al sujeto humano a través de un número de diferentes vías, incluyendo, pero no limitándose a la vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, sublingual, intranasal, intracerebral, intracerebroventricular, tópica, intravítrea y por inhalación. Tales vías de administración incluyen, pero no se limitan a la infusión intravenosa, bolo intravenoso, infusión subcutánea, bolo subcutáneo, bomba subcutánea, inyección intravítrea y gotas tópicas para los ojos. Más específicamente, la formulación farmacéutica de relaxina o del agonista de relaxina, puede ser administrada al sujeto en una cantidad en

un rango de aproximadamente 10 a 1000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por día. En una opción, la relaxina se administrada a una tasa de infusión intravenosa o subcutánea en el rango de aproximadamente 3 µg/kg/día a aproximadamente 150 µg/kg/día. En otra opción, la relaxina se administra a una tasa de infusión intravenosa o subcutánea en el rango de aproximadamente 30 µg/kg/día. Como tal, la relaxina se administra al sujeto para mantener una concentración sérica de relaxina de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 ng/mililitro. En una opción, la relaxina se administra con el fin de mantener una concentración sérica de aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 100 ng/mililitro. En otra opción, la relaxina se administra con el fin de mantener una concentración sérica de aproximadamente 10 ng/mililitro. La reducción de la acumulación de fluido asociada con el edema, en el tejido del sujeto humano, se puede medir dentro de aproximadamente 24 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo. En algunas circunstancias, una reducción de la acumulación de fluido asociada con el edema en el tejido del sujeto humano, se puede medir de manera tan temprana como en un periodo de 4 a 6 horas después de establecer el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para el tratamiento del edema en el cerebro de un sujeto humano. El método incluye administrarle una relaxina farmacéuticamente activa a un sujeto humano, en una cantidad efectiva para reducir la acumulación de fluido asociada con el edema en el tejido cerebral del sujeto humano. El edema cerebral puede afectar una o más áreas del cerebro. En una opción, el edema en el cerebro es edema cerebral. También están incluidas otras formas de edema cerebral. Con el fin de tratar el edema cerebral, la relaxina, por ejemplo, se puede administrar por vía intravenosa, subcutánea, intracerebral o intracerebroventricular. Como tales, a los sujetos afectados se les puede administrar relaxina, por ejemplo, por infusión intravenosa, bolo intravenoso, infusión subcutánea, o bolo subcutáneo. El tipo de administración de relaxina depende del trastorno del paciente y de las circunstancias involucradas. En una opción, la relaxina se administra con el fin de mantener una concentración sérica de aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 100 ng/mL en el sujeto humano. En otra opción, la relaxina se administra con el fin de mantener una concentración sérica de aproximadamente 10 ng/mL en el sujeto humano. En otra opción, la relaxina se administra a una tasa de infusión intravenosa o subcutánea en el rango de aproximadamente 3 µg/kg/día a aproximadamente 150 µg/kg/día. En otra opción más, la relaxina se administra a una tasa de infusión intravenosa o subcutánea en el rango de aproximadamente 30 µg/kg/día. La relaxina se puede administrar por bolo intravenoso o subcutáneo en un rango de aproximadamente 3 µg/kg/día a aproximadamente 150 µg/kg/día. En otra opción más, la relaxina se administra mediante un bolo intravenoso o subcutáneo en el rango de aproximadamente 30 µg/kg/día. La reducción de la acumulación de fluido asociada con el edema en el tejido cerebral en el sujeto humano, se puede medir dentro de un periodo de aproximadamente 24 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo. En algunas circunstancias, una reducción de la acumulación de fluido asociada con el edema en el tejido cerebral en el sujeto humano, se puede medir de manera tan temprana como dentro de un periodo de aproximadamente 4 a 6 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo. Dependiendo del trastorno del paciente y de la gravedad del edema, una reducción de la acumulación de fluido se puede medir de tal modo que se pueda notar una mejoría en el edema, en los puntos de tiempo apropiados. Tal reducción en la acumulación de fluido se puede medir mediante una Imagen de Resonancia Magnética (IRM) u otras técnicas que están disponibles para los médicos. Además, una reducción en la acumulación de fluido en el cerebro, se puede ligar a mejorías en el comportamiento del paciente, tales como mejorías en la coordinación, en el nivel de conciencia y de entumecimiento, así como una reducción en los mareos, náusea y pérdida de memoria.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para el tratamiento del edema, incluyendo administrarle a un sujeto humano una relaxina farmacéuticamente activa, en una cantidad efectiva para modificar la expresión de la acuaporina en el tejido cerebral del sujeto humano. Tal método incluirá, pero no se limita al edema cerebral, incluyendo edema vasogénico y citotóxico.

La presente invención además incluye un método para el tratamiento del edema, que incluye administrarle a un sujeto humano una relaxina farmacéuticamente activa, en una cantidad efectiva para reducir la acumulación de fluido asociada con el edema, en el tejido corneal de dicho sujeto humano. En una opción, el edema es edema ocular. Con el fin de tratar el edema ocular, la relaxina se puede administrar por vía intravenosa, subcutánea, tópica o intravítrea. La administración intravenosa puede ocurrir mediante infusión intravenosa o bolo intravenoso. La administración subcutánea se puede llevar a cabo por infusión subcutánea o bolo subcutáneo. La administración tópica se puede llevar a cabo mediante gotas tópicas para los ojos. La administración intravítrea se puede llevar a cabo mediante una inyección, por ejemplo, una inyección en el ojo. En una opción, la relaxina se administra con el fin de mantener una concentración sérica de aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 100 ng/mL en el sujeto humano. En otra opción, la relaxina se administra con el fin de mantener una concentración sérica de aproximadamente 10 ng/mL en el sujeto humano. En otra opción, la relaxina se administra a una tasa de infusión intravenosa o subcutánea en el rango de aproximadamente 3 µg/kg/día a aproximadamente 150 µg/kg/día. En otra opción, la relaxina se administra a una tasa de infusión intravenosa o subcutánea en el rango de aproximadamente 30 µg/kg/día. En otra opción más, la relaxina se administra mediante un bolo intravenoso o subcutáneo en el rango de aproximadamente 3 µg/kg/día a aproximadamente 150 µg/kg/día. Se incluye además la administración de relaxina mediante un bolo intravenoso o subcutáneo en el rango de aproximadamente 30 µg/kg/día. La reducción de la acumulación de fluido asociada con el edema en el tejido corneal en el sujeto humano, se puede medir dentro de un periodo de aproximadamente 24 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo. En algunos pacientes, una reducción de la acumulación de fluido asociada con el

edema en el tejido corneal en el sujeto humano, se puede medir de manera tan temprana como dentro de un periodo de 4 a 6 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo. Dependiendo del trastorno del paciente y de la gravedad del edema ocular, una reducción en la acumulación de fluido puede ser medible de tal modo que se puede observar una mejoría en el edema en los puntos de tiempo apropiados. Tal reducción en la acumulación de fluido se puede medir por Imagen de Resonancia Magnética (IRM), observando la hinchazón y/o inflamación de la córnea mediante una evaluación ocular por un médico, por una reducción en la visión distorsionada, así como por una reducción en el malestar en los ojos y en la fotofobia.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para el tratamiento del edema, que incluye administrarle una relaxina farmacéuticamente activa a un sujeto humano, en una cantidad efectiva para modificar la expresión de acuaporina en el tejido corneal del sujeto humano. Tal método incluye, pero no se limita al edema ocular.

La presente invención además comprende el tratamiento del edema, que incluye administrarle una relaxina farmacéuticamente activa a un sujeto humano, en una cantidad efectiva para reducir la acumulación de fluido asociada con el edema en el tejido pulmonar del sujeto humano. En una opción, el edema es edema pulmonar. Con el fin de tratar el edema pulmonar o cualquier edema que ocurra en los pulmones, la relaxina se puede administrar por vía intravenosa o subcutánea. La administración intravenosa puede realizarse mediante infusión intravenosa o bolo intravenoso. La administración subcutánea puede realizarse mediante infusión subcutánea o bolo subcutáneo. En una opción, la relaxina se administra con el fin de mantener una concentración sérica de aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 100 ng/mL en el sujeto humano. En otra opción, la relaxina se administra con el fin de mantener una concentración sérica de aproximadamente 10 ng/mL en el sujeto humano. En otra opción, la relaxina se administra a una tasa de infusión intravenosa o subcutánea en el rango de aproximadamente 3 µg/kg/día a aproximadamente 150 µg/kg/día. En otra opción más, la relaxina se administra a una tasa de infusión intravenosa o subcutánea en el rango de aproximadamente 30 µg/kg/día. En otra opción más, la relaxina se administra mediante bolo intravenoso o subcutáneo en un rango de aproximadamente 30 µg/kg/día a aproximadamente 150 µg/kg/día. Además, está incluida la administración de relaxina mediante un bolo intravenoso o subcutáneo en un rango de aproximadamente 30 µg/kg/día. La reducción de acumulación de fluido asociada con el edema en el tejido pulmonar del sujeto humano, se puede medir dentro de un periodo de aproximadamente 24 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo. En algunos pacientes, una reducción de la acumulación de fluido asociada con el edema en el tejido pulmonar del sujeto humano, se puede medir tan temprano como dentro de un periodo de aproximadamente 4 a 6 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo. Dependiendo del trastorno del paciente y de la gravedad del edema pulmonar, se puede medir una reducción de la acumulación de fluido de tal modo que se puede notar una mejoría en el edema en los puntos de tiempo apropiados. Tal reducción en la acumulación de fluido se puede medir mediante una radiografía de tórax. Además, una reducción en la acumulación de fluido puede estar ligada al alivio del paciente de la congestión pulmonar, así como a mejorías en la respiración (mediante un examen por auscultación para escuchar las mejorías en la respiración) y un incremento en la saturación de oxígeno (mediante mediciones del gas de sangre arterial).

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para tratar el edema, que comprende administrarle a un sujeto humano una relaxina farmacéuticamente activa en una cantidad efectiva para modificar la expresión de acuaporina en el tejido pulmonar del sujeto humano. En una opción, el edema es edema pulmonar.

Todavía, otro aspecto de la presente invención proporciona un método para tratar el edema periférico, que incluye administrarle a un sujeto humano una relaxina farmacéuticamente activa en una cantidad efectiva para reducir la acumulación de fluido asociada con el edema en el tejido hinchado del sujeto humano, en donde el tejido hinchado incluye un área bajo la piel del sujeto humano. En un aspecto, el tejido hinchado es el tejido conectivo de la piel. El edema periférico se puede presentar en poblaciones específicas de pacientes, tales como poblaciones de pacientes que sufren de un trastorno particular, incluyendo insuficiencia cardiaca congestiva, trauma, alcoholismo, enfermedad de altura, embarazo, hipertensión, u otros. Además, tales pacientes pueden sufrir de enfermedad hepática o un tipo específico de trastorno cardiaco. En adición, tales pacientes también pueden sufrir de insuficiencia de órganos de un tipo u otro. El edema periférico también puede ocurrir de manera aislada, tal como en pacientes que se presentan con extremidades hinchadas, en donde la hinchazón no está asociada con ningún trastorno específico y no se puede relacionar con ninguna enfermedad u origen específico. A veces tales sujetos únicamente estuvieron periodos prolongados en posición sentada o de pie sin moverse (por ejemplo, personas en oficinas que se sientan en escritorios por periodos largos o personas que trabajan en líneas de ensamblaje, que permanecen de pie por periodos de tiempo prolongados). La relaxina se puede utilizar para tratar el edema periférico que ocurre de manera aislada, o el edema que es un síntoma de alguna otra enfermedad o está relacionado con alguna enfermedad. Con el fin de tratar el edema periférico, se puede administrar relaxina por vía intravenosa o subcutánea. La administración intravenosa se puede realizar mediante infusión intravenosa o bolo intravenoso. La administración subcutánea se puede realizar mediante infusión subcutánea o bolo subcutáneo. En una opción, la relaxina se administra con el fin de mantener unas concentraciones séricas de aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 100 ng/mL en el sujeto humano. En otra opción, la relaxina se administra con el fin de mantener una concentración sérica de aproximadamente 10 ng/mL en el sujeto humano. En otra opción, la relaxina se administra a una tasa de infusión intravenosa o subcutánea en el rango de aproximadamente 3µg/kg/día a aproximadamente 150 µg/kg/día.

En otra opción más, la relaxina se administra a una tasa de infusión intravenosa o subcutánea en el rango de aproximadamente 30 µg/kg/día. En otra opción más, la relaxina se administra mediante un bolo intravenoso o subcutáneo en un rango de aproximadamente 3 µg/kg/día a aproximadamente 150 µg/kg/día. Además se describe la administración de relaxina mediante un bolo intravenoso o subcutáneo en un rango de aproximadamente 30 µg/kg/día. La reducción de la acumulación de fluido asociada con el edema periférico en el tejido hinchado en el sujeto humano, se puede medir dentro de un periodo de 24 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo. En algunos pacientes, una reducción de la acumulación de fluido asociada con el edema periférico en el tejido hinchado en el sujeto humano, se puede medir de manera tan temprana como dentro de un periodo de aproximadamente 4 a 6 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo. Dependiendo del trastorno del paciente y de la gravedad del edema periférico, una reducción en la acumulación del fluido se puede medir de tal manera que se pueda observar una mejoría en el edema en los puntos de tiempo apropiados. Tal reducción en la acumulación de fluidos se puede medir mediante una reducción en la hinchazón, mediante un examen físico, así como una disminución aguda en el peso corporal en un periodo de 24 a 48 horas. A medida que el paciente pierde agua, el peso corporal disminuye notablemente, lo cual, a su vez, se relaciona directamente con la reducción del edema.

Otro aspecto de la presente invención, proporciona un método para tratar el edema periférico, que comprende administrarle a un sujeto humano una relaxina farmacéuticamente activa, en una cantidad efectiva para modificar la expresión de acuaporina en un tejido del sujeto humano. En una opción, el tejido está hinchado, el cual incluye un área bajo la piel. En otra opción, el tejido es tejido conectivo.

La presente descripción además incluye un método para el tratamiento del edema sistémico, que incluye administrarle a un sujeto humano una relaxina farmacéuticamente activa, en una cantidad efectiva para reducir la acumulación de fluido asociada con el edema en un tejido del sujeto humano. El tejido puede incluir, pero no se limita a tejido pulmonar, cardíaco, renal y hepático. De manera similar, al edema periférico, el edema sistémico puede presentarse en poblaciones específicas de pacientes, tales como poblaciones de pacientes que sufren de un trastorno particular. Por ejemplo, tales pacientes podrían sufrir de una enfermedad hepática, un tipo específico de enfermedad cardíaca, un trastorno hipotiroideo, un trastorno pulmonar, un trastorno renal, y similares. Además, tales pacientes también pueden sufrir de una insuficiencia de órganos de un tipo u otro. El edema sistémico también puede presentarse en un solo órgano, tales como en pacientes que presentan cirrosis y/o ascitis y sufren de edema en el hígado. Alternativamente, el edema sistémico puede ocurrir en más de un órgano al mismo tiempo. La relaxina se puede usar para el tratamiento del edema sistémico que ocurre en uno o en múltiples órganos. Con el fin de tratar el edema sistémico, se puede administrar relaxina por vía intravenosa o subcutánea. La administración intravenosa se puede realizar mediante infusión intravenosa o bolo intravenoso. La administración subcutánea se puede realizar mediante infusión subcutánea o bolo subcutáneo. En una opción, la relaxina se administra con el fin de mantener una concentración sérica de aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 100 ng/mL en el sujeto humano. En otra opción, la relaxina se administra con el fin de mantener una concentración sérica de aproximadamente 10 ng/mL en el sujeto humano. En otra opción, la relaxina se administra a una tasa de infusión intravenosa o subcutánea en el rango de aproximadamente 3 µg/kg/día a aproximadamente 150 µg/kg/día. En otra opción más, la relaxina se administra a una tasa de infusión intravenosa o subcutánea en el rango de aproximadamente 30 µg/kg/día. En todavía otra modalidad, la relaxina se administra mediante un bolo intravenoso o subcutáneo en un rango de aproximadamente 3 µg/kg/día a aproximadamente 150 µg/kg/día. Además se incluye la administración de relaxina mediante un bolo intravenoso o subcutáneo en un rango de aproximadamente 30 µg/kg/día. La reducción de la acumulación de fluido asociada con el edema sistémico en el tejido u órgano afectado en el sujeto humano, se puede medir dentro de un periodo de aproximadamente 24 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo. En algunos pacientes, una reducción de la acumulación de fluido asociada con el edema sistémico en el tejido u órgano afectado en el sujeto humano, se puede medir de manera tan temprana como dentro de un periodo de aproximadamente 4 a 6 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo. Dependiendo del trastorno del paciente y de la gravedad del edema sistémico, una reducción en la acumulación del fluido puede ser medible de tal manera que se pueda observar una mejoría en el edema en los puntos de tiempo apropiados. Tal reducción en la acumulación de fluidos se puede medir al examinar al paciente con respecto al alivio de síntomas apropiados o empleando un aparato de barrido que sea adecuado para la condición subyacente al edema, tal como un aparato de tomografía computarizada o un aparato de ultrasonido (que muestra una reducción del perímetro abdominal y de la distensión) un aparato de IRM (que muestra una reducción en el contenido de agua de un órgano específico), una radiografía de tórax (que muestra una reducción en el fluido pulmonar) y un ecocardiograma (que muestra el tamaño de las cámaras del corazón y otros cambios en y alrededor del corazón).

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para tratar el edema sistémico, que comprende administrarle a un sujeto humano una relaxina farmacéuticamente activa, en una cantidad efectiva para modificar la expresión de acuaporina en un tejido del sujeto humano. En una opción, el tejido es pulmonar, cardíaco, renal y hepático.

Todavía otro aspecto de la descripción proporciona un método para tratar el edema, que comprende administrarle a un animal una relaxina farmacéuticamente activa, en una cantidad efectiva para reducir la acumulación de fluido asociada con el edema, en un tejido del animal. En una opción preferida, el animal es un perro, un gato o un caballo.

Además, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de la diabetes insípida nefrogénica (DIN), incluyendo la administración a un sujeto humano de una relaxina farmacéuticamente activa, en una cantidad efectiva para reducir la excreción crónica de orina diluida en el sujeto humano. Como los pacientes con DIN sufren de micción frecuente y abundante, sed excesiva y un sentimiento general de debilidad, la reducción de uno o más de estos síntomas como resultado del tratamiento con relaxina, indicaría una mejoría en este trastorno. Por ejemplo, una reducción en la frecuencia de la micción, una disminución en el volumen de orina de 24 horas, una medición de seguimiento de la osmolaridad de la orina y/o el alivio del paciente de la sed intensa, podrían estar directamente relacionados con una mejoría de la DIN causada por la relaxina. Como tal, la relaxina se administra para mantener una concentración sérica de aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 100 ng/mL en el sujeto humano. En otra opción, la relaxina se administra con el fin de mantener una concentración sérica de aproximadamente 10 ng/mL en el sujeto humano. En otra opción, la relaxina se administra a una tasa de infusión subcutánea en el rango de aproximadamente 3 µg/kg/día a aproximadamente 150 µg/kg/día. En otra opción más, la relaxina se administra a una tasa de infusión subcutánea en el rango de aproximadamente 30 µg/kg/día. Además, la relaxina se puede administrar crónicamente por varias vías de administración diferentes, incluyendo la inyección subcutánea intermitente o una bomba subcutánea. Particularmente, la relaxina se puede administrar de manera continua durante al menos 24 horas. En un paciente con DIN, una reducción en la excreción de orina asociada con la DIN, se puede medir dentro de un periodo de aproximadamente 24 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo. Alternativamente, una reducción en la excreción de orina diluida asociada con la DIN en el sujeto humano, se puede medir de manera tan temprana como dentro de un periodo de 4 a 6 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con un placebo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para el tratamiento de la diabetes insípida nefrogénica (DIN), que incluye administrarle a un sujeto humano una relaxina farmacéuticamente activa, en una cantidad efectiva para modificar la expresión de acuaporina y la localización celular en tejido renal, en el sujeto humano. En una opción, la acuaporina es la acuaporina-2 (AQP2), acuaporina-3 (AQP3), y/o acuaporina-4 (AQP4).

Breve descripción de las figuras

La presente invención se entiende mejor cuando se lee en conjunto con las figuras que la acompañan, las cuales sirven para ilustrar las modalidades preferidas. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción no se limita a las modalidades específicas descritas en las figuras.

La Figura 1 muestra la reducción en la expresión del gen *aqp3* en el cuello uterino de ratonas preñadas en la última fase de la gestación, deficientes de relaxina (Rln^{-/-}).

La Figura 2 muestra que la proteína AQP3 está localizada predominantemente en la capa basal de las células epiteliales (véanse las flechas) del cuello uterino murino. Hay un nivel inferior de expresión de proteína AQP3 en ratones Rln^{-/-}, en comparación con ratones de tipo silvestre (Rln^{+/+}).

La Figura 3 muestra que el tratamiento con relaxina incrementa la expresión del gen *aqp3* (Figura 3A) y disminuye la expresión del gen *aqp5* (Figura 3B) en el cuello uterino de ratonas preñadas Rln^{-/-}.

La Figura 4 muestra que el tratamiento con relaxina incrementa la expresión de la proteína AQP3 (véanse las flechas) y disminuye la expresión de la proteína AQP5 (asteriscos) en células epiteliales basales del cuello uterino de ratonas preñadas Rln^{-/-}.

La Figura 5 muestra los efectos del tratamiento con relaxina, sobre la osmolaridad plasmática en ratones macho Rln^{-/-}.

La Figura 6 muestra la expresión del receptor de relaxina Rxfp1, por una Reacción en Cadena catalizada por Polimerasa (RCP) cuantitativa, en el riñón de ratones macho (Figura 6A) y ratones hembra (Figura 6B).

La Figura 7 muestra la expresión del receptor de relaxina Rxfp1 en el riñón de ratas macho y hembra. La Figura 7A muestra la proteína RXFP1 en secciones transversales de los túbulos renales en la corteza, de la médula exterior y de la médula interior, por inmunohistoquímica. Las Figuras 7B y 7C muestran la expresión del gen Rxfp1 en las regiones de la corteza y la médula de ratas hembra y macho, por RCP cuantitativa. La Figura 7D muestra la expresión cuantitativa de la proteína en las regiones de corteza y médula, por análisis de inmunoelectrotransferencia tipo Western (Western blot).

La Figura 8A muestra un incremento en la expresión del gen *aqp2* en el riñón de ratones macho Rln^{+/+} tratados con relaxina, en comparación con controles tratados con solución salina (VEH). La β-actina es el control de normalización.

La Figura 8B muestra un incremento moderado en la expresión del gen *aqp2* en las papilas de ratones macho Rln^{-/-}.

tratados con relaxina durante cinco días. La Figura 8C muestra un pequeño incremento en la expresión del gen aqp2, en la médula de ratas macho tratadas con relaxina durante cinco días.

La Figura 9 muestra que el tratamiento con un anticuerpo monoclonal contra la relaxina de rata (MCA1), en ratas preñadas en la última fase de gestación, disminuye la expresión del gen aqp2 en la región de la médula del riñón.

5 La Figura 10A muestra la reducción en la expresión del gen aqp4 en el riñón de ratones macho Rln^{-/-}. Las Figuras 10B y 10C muestran que el tratamiento con relaxina en ratones macho Rln^{-/-} durante cinco ó 14 días, incrementa la expresión del gen aqp4 en la región de papilas del riñón. La Figura 10D muestra un incremento en la expresión del gen aqp4 en la médula de ratas macho tratadas con relaxina por cinco días.

10 La Figura 11 muestra un incremento en la expresión del gen aqp4 en la médula de ratas macho tratadas con relaxina por cinco días.

Descripción detallada de las modalidades preferidas

Revisión General

15 La presente invención se refiere a métodos para modular los canales de acuaporina, mediante la administración de relaxina. Las acuaporinas son proteínas que están incrustadas en la membrana celular de la mayoría de las células, con el fin de regular el flujo del agua y glicerol en varios tejidos del cuerpo. Los inventores han demostrado que la relaxina es capaz de modular estos canales de agua; es decir, la relaxina puede regular por incremento y/o regular por disminución la expresión de acuaporinas específicas, en tejido específicos y/u órganos específicos. Esto, a su vez, afecta el flujo de agua a través de acuaporinas específicas en tejidos y/u órganos específicos, y de esta manera cambia la permeabilidad de las membranas biológicas al agua, y además altera el contenido de líquido de los tejidos y/u órganos corporales. En el caso de acuaporinas específicas, los presentes inventores han demostrado que el efecto de modificar su expresión génica, es consistente de un tejido a otro. Como las acuaporinas se expresan en la mayoría de los tejidos de mamíferos y son altamente conservadas en todo el sistema de los mamíferos, la capacidad de regular su expresión por incremento y por disminución, proporciona una base fundamental para entender muchos procesos de enfermedad. Por ejemplo, el edema es un trastorno que es el resultado de una acumulación excesiva de agua en tejidos y/u órganos; de modo que, el tratamiento con relaxina puede beneficiar a sujetos afectados con edema y/o síntomas del mismo.

30 Más específicamente, el tratamiento con relaxina recombinante humana (H2) en ratones, incrementa la expresión del gen AQP3 y la cantidad de proteína AQP3 en las células epiteliales del cuello uterino en el embarazo en la etapa final de la gestación. Esto promueve el flujo de entrada de agua desde el lumen del cuello uterino, a través de las células epiteliales, e incrementa el contenido de agua en el estroma, para facilitar la remodelación de la matriz extracelular. El tratamiento con relaxina también puede disminuir las acuaporinas en el mismo tejido. Por ejemplo, la relaxina disminuye la expresión del gen aqp5 y la cantidad de proteína AQP5 en la capa basal de las células epiteliales cervicales, en la etapa final de la gestación. En otro estudio, se ha demostrado que el tratamiento con relaxina incrementa la expresión de los genes aqp2 y aqp4 en las regiones medular y papilar del riñón, en dos especies de mamíferos. Esta acción sobre el riñón promueve el movimiento de agua fuera del filtrado de las nefronas, a través de las células de las nefronas y de regreso hacia la sangre, lo cual es necesario para concentrar la orina y reducir la osmolaridad plasmática.

40 En consecuencia, la presente invención se refiere además a métodos para reducir el edema, mediante la administración de relaxina a sujetos afligidos. Particularmente, estos métodos incluyen la administración de relaxina farmacéuticamente activa, en una cantidad efectiva para reducir la acumulación de fluido que generalmente está asociada con el edema. Como el edema es un efecto secundario común o es un síntoma de muchas enfermedades y además un trastorno que afecta a los ancianos, está asociado con un constante incremento en los costos para el sistema de atención a la salud. Por ejemplo, existen numerosas formas de edema, incluyendo, pero no limitándose al edema cerebral, edema ocular, edema pulmonar, ascitis, angioedema hereditario, edema periférico y edema sistémico, todos los cuales son el resultado de acumulación de fluido en tejidos y órganos corporales. Además, el edema es un trastorno común asociado con lesiones traumáticas en el cerebro y la médula espinal, tal como el edema cerebral. Además, el edema a menudo acompaña al accidente cerebrovascular y puede complicar drásticamente el curso clínico de los tumores cerebrales. Los tratamientos actuales para el edema cerebral, por ejemplo, están limitados e incluyen la osmoterapia y la administración de glucocorticoides. El uso de osmoterapia incluye la administración de manitol hipertónico, con el fin de ayudar a revertir la inflamación en el cerebro. Sin embargo, este tratamiento está limitado y a menudo no tiene éxito, debido a que la osmoterapia encoge el tejido cerebral sano junto con el área dañada. En el mismo tenor, los glucocorticoides no han tenido mucho éxito en el tratamiento de la mayoría de las formas de edema cerebral y han fallado por completo en el edema asociado con accidente cerebrovascular. De manera similar, la descompresión quirúrgica es un procedimiento invasivo que a menudo pone en riesgo al paciente. Tristemente, estos tratamientos se han utilizado durante los últimos 70 años con muy poco éxito. El costo del tratamiento solamente de la lesión cerebral y el edema asociado, excede los 14,000 millones de dólares anuales en Estados Unidos y sigue incrementándose. De aquí que las poblaciones de pacientes afectados con edema se encuentran en necesidad de nuevos métodos terapéuticos que mejoren la condición y

estabilicen a los pacientes, sin causar efectos secundarios graves. La relaxina es una sustancia de origen natural que, cuando se administra a sujetos con edema, puede reducir la acumulación de fluido en el tejido que está asociado con el edema, sin afectar los tejidos circundantes. Como tal, la relaxina ofrece una nueva forma de tratamiento que mejora el bienestar del paciente, y además ofrece un nuevo camino para reducir los costos de la atención médica en sujetos afligidos con edema. La presente invención además comprende el tratamiento de la diabetes insípida nefrogénica (DIN), mediante la administración de relaxina farmacéuticamente activa, a los individuos afectados.

Definiciones

El término "modular" se refiere a la capacidad de regular o ajustar la actividad y/o presencia y/o efecto de una entidad biológica, incluyendo, pero no limitándose a un gen y una proteína.

El término "tejido" se refiere a un conjunto de células provenientes del mismo origen. Por ejemplo, un tejido de mamífero es un conjunto de células proveniente de una especie de mamífero. Las células que conforman el tejido no necesariamente son idénticas, pero en conjunto pueden realizar una función específica. El término "edema" significa una acumulación de fluido en un tejido y/u órgano del cuerpo de un mamífero. El término "administrar" se refiere a darle o aplicarle a un sujeto un remedio farmacéutico o una formulación farmacéutica, a través de una vía de administración específica, incluyendo, pero no limitándose a la vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, sublingual, intranasal, intracerebral, intracerebroventricular, tópica, intravítrea y por inhalación. El término "efectiva" tal como en la frase "efectiva para reducir la acumulación de fluido asociada con el edema", se refiere a la cantidad de relaxina farmacéuticamente activa que dará como resultado un beneficio médico o clínico medible y deseado para el paciente, en comparación con el estado de línea basal de dicho paciente, o con el estado de un sujeto no tratado o tratado con un placebo (por ejemplo, no tratado con relaxina).

El término "relaxina" se refiere a un péptido hormonal que es bien conocido en la técnica. El término "relaxina" tal como se utiliza en la presente, incluye la relaxina humana, incluyendo la relaxina humana intacta de longitud completa, o una porción de la molécula de relaxina que retenga la actividad biológica. El término "relaxina" abarca la preprorelaxina, prorelaxina, y relaxina H1; preprorelaxina, prorelaxina, y relaxina H2; y preprorelaxina, prorelaxina, y relaxina H3 humanas. El término "relaxina" además incluye la relaxina biológicamente activa (también referida en la presente como "farmacéuticamente activa") proveniente de fuentes recombinantes, sintéticas o naturales, así como variantes de relaxina, tales como variantes en la secuencia de aminoácidos. Como tal, el término contempla la relaxina humana sintética y la relaxina humana recombinante, incluyendo la relaxina humana H1, H2 y H3 sintética y la relaxina humana H1, H2 y H3 recombinante. El término además abarca los agentes activos con actividad similar a la relaxina, tales como agonistas de la relaxina y/o análogos de la relaxina, y porciones de los mismos que retengan la actividad biológica, incluyendo todos los agentes que desplacen competitivamente el enlace de la relaxina con un receptor de relaxina (por ejemplo, el receptor RXFP1, receptor RXFP2, receptor RXFP3, receptor RXFP4, los cuales previamente eran conocidos como LGR7, LGR8, GPCR135, GPCR142, respectivamente). Por lo tanto, una relaxina farmacéuticamente efectiva o un agonista de relaxina, es cualquier agente con actividad similar a la relaxina que sea capaz de unirse al receptor de relaxina para inducir una respuesta similar a la relaxina. Además, una relaxina o agonista de relaxina farmacéuticamente efectivo, es cualquier agente con actividad similar a la relaxina que sea capaz de regular por incremento y/o por disminución, y/o modificar la expresión de una molécula de acuaporina (AQP), de esta manera modulando y/o cambiando la permeabilidad de membranas biológicas al agua, lo cual, a su vez, puede alterar el contenido de fluido de tejidos y/o órganos corporales. Además, la secuencia de ácido nucleico de la relaxina humana tal como se utiliza en la presente, no debe ser 100% idéntica a la secuencia de ácido nucleico de la relaxina humana (por ejemplo, las relaxinas H1, H2 y/o H3), pero puede tener cuando menos aproximadamente 40%, 50%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad con la secuencia de ácido nucleico de la relaxina humana. La relaxina tal como se utiliza en la presente, se puede preparar por cualquier método conocido por los técnicos en la materia. Ejemplo de tales métodos se ilustran, por ejemplo, en la Patente Norteamericana No. U.S. 5,759,807, así como en Bullesbach et al. (1991) The Journal of Biological Chemistry 266:10754-10761. Ejemplos de moléculas de relaxina y análogos se ilustran, por ejemplo, en la Patente Norteamericana No. U.S. 5,166,191. La relaxina biológicamente activa de origen natural, se puede derivar de fuentes humanas, murinas (es decir, ratas o ratones), porcinas u otras fuentes de mamíferos. Asimismo está abarcada la relaxina modificada para incrementar la vida media in vivo; por ejemplo, la relaxina PEGilada (es decir, relaxina conjugada con un polietilenglicol), modificaciones de aminoácidos en la relaxina que sean sujetas a rompimiento por enzimas de degradación, y similares. El término también abarca la relaxina que comprende las cadenas A y B, teniendo porciones truncadas en los extremos N-terminal y C-terminal. En general, en la relaxina H2, la cadena A puede variar desde A(1-24) hasta A(10-24) y la cadena B desde B(1-33) hasta B(10-22); y en la relaxina H1, la cadena A puede variar desde A(1-24) hasta A(10-24) y la relaxina B desde B(1-32) hasta B(10-22). Dentro de los alcances del término "relaxina" también se incluyen otras inserciones, sustituciones o deleciones, de uno o más residuos de aminoácido, variantes de glucosilación, relaxina no glucosilada, sales orgánicas e inorgánicas de la misma, derivados covalentemente modificados de relaxina, preprorelaxina y prorelaxina. En el término también está abarcado un análogo de relaxina que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de tipo silvestre (por ejemplo, de origen natural), incluyendo, pero no limitándose a análogos de relaxina descritos en la Patente Norteamericana No. U.S. 5,811,395. Las posibles modificaciones a los residuos de aminoácido de la relaxina incluyen la acetilación, formilación o protección de similares de grupos amino

libres, incluyendo el N-terminal, amidación de grupos C-terminales, o la formación de ésteres de hidroxilo o grupos carboxílicos, por ejemplo la modificación del residuo triptofano (Trp) en B2, mediante la adición de un grupo formilo. El grupo formilo es un ejemplo típico de un grupo protector fácilmente removible. Otras posibles modificaciones incluyen el reemplazo de uno o más de los aminoácidos naturales en las cadenas B y/o A, por diferentes aminoácidos (incluyendo la forma D de un aminoácido natural), incluyendo, pero no limitándose al reemplazo de la porción Met en B24 por norleucina (Nle), valina (Val), alanina (Ala), glicina (Gly), serina (Ser), u homoserina (HomoSer). Otras posibles modificaciones incluyen la delección de un aminoácido natural de la cadena, o la adición de uno o más aminoácidos extra a la cadena. Las modificaciones adicionales incluyen sustituciones de aminoácidos en las uniones B/C y C/A de la prorelaxina, que facilitan el rompimiento de la cadena C de la prorelaxina; y variantes de relaxina que comprenden un péptido C de origen no natural, por ejemplo como se describe en la Patente Norteamericana No. U.S. 5,759,807. El término "relaxina" también abarca polipéptidos de fusión que comprenden relaxina y un polipéptido heterólogo. Un polipéptido heterólogo de fusión (por ejemplo, un polipéptido que no es relaxina) puede ser C-terminal o N-terminal a la porción relaxina de la proteína de fusión. Los polipéptidos heterólogos incluyen polipéptidos inmunológicamente detectables (por ejemplo, "marcas epitópicas"); polipéptidos capaces de generar una señal detectable (por ejemplo, proteína fluorescente verde, enzimas tales como la fosfatasa alcalina, y otras conocidas en la técnica); polipéptidos terapéuticos, incluyendo, pero no limitándose a citocinas, quimiocinas, y factores de crecimiento. Todas las variaciones o alteraciones en la estructura de la molécula relaxina, que den como resultado variantes, están incluidas dentro de los alcances de la presente invención, en tanto que la actividad funcional (biológica) de la relaxina, se mantenga. De preferencia, cualquier modificación de la secuencia de aminoácidos de la relaxina o su estructura es aquella que no incrementa su inmunogenicidad en el individuo que está siendo tratado con la variante de relaxina. Aquellas variantes de relaxina que tienen la actividad funcional descrita pueden ser fácilmente identificadas mediante ensayos in vitro e in vivo conocidos en la técnica.

Relaxina

La relaxina es una hormona polipeptídica que tiene un tamaño y forma similares a la insulina. Es una hormona endócrina y autocrina/paracrina que pertenece a la superfamilia del gen de la insulina. La forma activa de la proteína codificada, consiste de una cadena A y una cadena B, mantenidas juntas por puentes de disulfuro, dos intercadenas y uno intracadena. Así pues, la estructura se parece mucho en la insulina en la disposición de los puentes de disulfuro. En seres humanos, existen tres genes de relaxina no alélicos conocidos, los genes de relaxina-1 (RLN-1 ó H1), relaxina-2 (RLN-2 ó H2) y relaxina-3 (RLN-3 ó H3). Las H1 y H2 comparten una alta homología de secuencia. Existen dos variantes de transcripción empalmadas alternativamente, que codifican para diferentes isoformas descritas para este gen. H1 y H2 se expresan diferencialmente en los órganos reproductivos (Patente Norteamericana No. U.S. 5,023,321 y Garibay-Tupas et al. (2004) *Molecular and Cellular Endocrinology* 219:115-125), mientras que H3 se encuentra principalmente en el cerebro. La evolución de la familia de péptidos relaxina en sus receptores, generalmente es bien conocida en la técnica (Wilkinson et al. (2005) *BMC Evolutionary Biology* 5:1-17; y Wilkinson & Bathgate (2007); Capítulo 1, *Relaxin and Related Peptides*, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media). La relaxina, los receptores de relaxina y los agonistas de relaxina se describen en mayor detalle en la Publicación de Solicitud de patente No. 20100048475.

Fisiología y Trastornos Relacionados con las Acuaporinas

No es sorprendente que las acuaporinas (AQPs) estén implicadas en numerosos procesos fisiológicos. Por ejemplo, en el riñón, la AQP1 es abundante tanto en la membrana apical como en la basolateral de los túbulos proximales renales y en el endotelio capilar. La AQP1 contribuye con el mecanismo contracorriente para la concentración e intercambio de orina. En las glándulas salivales, la AQP3 se encuentra en las membranas basolaterales, en donde se recoge agua de los intersticios, y la AQP5 se encuentra en la membrana apical, en donde se libera agua. Una variedad de trastornos clínicos están ligados a la pérdida o a la disfunción de acuaporinas, incluyendo anomalías de la función renal, pérdida de la visión, edema cerebral y emaciación. Además, se piensa que la AQP1 está involucrada en la angiogénesis, en la curación de heridas, en la regeneración de órganos y en la carcinogénesis (Kruse et al. (supra)).

La AQP4, que es un canal de agua de la membrana celular de la glía, está vinculada con el edema cerebral, el cual desempeña una importante función en la morbilidad de los trastornos del sistema nervioso, tales como traumas en la cabeza, tumores, accidente cerebrovascular, infecciones y trastornos metabólicos. Las opciones actuales de tratamiento del edema cerebral se limitan a agentes hiperosmolares y a la descompresión quirúrgica, las cuales son terapias que fueron introducidas hace más de 70 años. Algunos estudios han demostrado que los ratones que son deficientes de AQP4, tienen una mejor supervivencia que los ratones silvestres, en un modelo de edema cerebral causado por intoxicación aguda con agua. Aquí, se puede reducir el contenido de agua del tejido cerebral y la inflamación de los procesos pediculares astrocíticos pericapilares en ratones deficientes de AQP4. La inflamación característica de los procesos pediculares astrocíticos, también se encuentra en el tejido cerebral de pacientes con lesiones en la cabeza. En otro modelo de edema cerebral, tal como el accidente cerebrovascular isquémico producido por una oclusión de la arteria cerebral media, los ratones deficientes en AQP4 tienen mejores resultados neurológicos también. La condición de edema cerebral se mide a través del porcentaje de agrandamiento hemisférico a las 24 horas, y se encontró disminuido en un 335% en los ratones deficientes de AQP4. Tales hallazgos sugieren una función clave de la AQP4 en la modulación del transporte de agua en el cerebro, y además sugieren que la inhibición de la AQP4 podría proporcionar una nueva opción terapéutica para reducir el edema

cerebral en una amplia variedad de trastornos cerebrales (Manley et al. (2000) *Nature Medicine* 6:159-163). Sin embargo, en otro estudio, la activación directa del receptor ETB astrocítico se sugiere que disminuye la expresión de AQP4, dando como resultado una reducción en la excreción de fluido del edema y causando un agravamiento del edema cerebral vasogénico (Koyama et al. (2010) *Neuroscience Letters* 469:343-347). Este estudio además sugiere que el edema citotóxico puede mejorar mediante una disminución en la expresión de AQP4, debido a que se evita que el agua entre, mientras que el edema vasogénico se puede mejorar mediante un incremento en la expresión de AQP4, debido a que se aumenta el flujo de salida del fluido del edema.

La expresión de AQP1, AQP4 y AQP9 está siendo estudiada en el cerebro durante el embarazo. Aquí, se utilizó una Reacción en Cadena catalizada por Polimerasa (RCP) cuantitativa en tiempo real en diferentes regiones del cerebro durante el embarazo y durante el estado de posparto, para examinar la expresión de los genes *aqp1*, *aqp4* y *aqp9*. Existen trastornos patológicos durante el embarazo, los cuales involucran la formación de un edema cerebral, incluyendo el síndrome de encefalopatía reversible posterior, eclampsia y preeclampsia. La eclampsia y la preeclampsia son complicaciones graves del embarazo, en las cuales surgen síntomas neurológicos. Estos síntomas se desarrollan por el edema cerebral vasogénico, debido a una elevación aguda de la presión arterial. La formación del edema en la eclampsia se encuentra principalmente en las regiones del cerebro posterior. Notablemente, se observa una mayor expresión de AQP4 en el cerebro posterior con respecto al cerebro anterior, tanto en animales en la última fase de la gestación como en animales en el posparto, que constituyen dos estados durante los cuales normalmente se desarrolla la eclampsia (Wiegman et al. (2008) *Reproductive Sciences* 15:506-516).

Las proteínas AQP1 y AQP5 están ligadas a la inflamación y edema corneal. Las córneas con enfermedades relacionadas con edema, pierden transparencia, dando como resultado una significativa pérdida de la visión. Las proteínas AQP1 y AQP5 se expresan en células endoteliales corneales y células epiteliales, respectivamente, y funcionan para facilitar el transporte de agua regido por la osmolaridad. Con el fin de probar si estas acuaporinas están involucradas en el transporte de fluido corneal y en la transparencia, se crearon ratones transgénicos. Por ejemplo, el espesor de la córnea, la permeabilidad al agua y la respuesta a la inflamación experimental, se compararon en ratones silvestres y en ratones nulos transgénicos que carecían de los genes *aqp1* y *aqp5*. Se encontró que la delección del *aqp5* en ratones, incrementa el espesor corneal y reduce la permeabilidad osmótica al agua a través del epitelio corneal. Además, se encontró que la delección de *aqp1* reduce el espesor corneal y la permeabilidad osmótica al agua a través del endotelio corneal y altera la restauración de la transparencia corneal después de una inflamación experimental. De aquí que la inhibición de AQP5 ó AQP1 por bloqueadores no tóxicos, podría alterar la estructura corneal y el contenido de agua. Además, la regulación por incremento de AQP1 en el epitelio corneal puede ser particularmente útil para reducir el edema corneal y mejorar la transparencia después de una lesión (Thiagarajah et al. (2002) *The Journal of Biological Chemistry* 277:19139-19144). De manera similar, las proteínas AQP1, AQP3 y AQP4 se han ligado a Queratopatía Bulosa Pseudofáquica (QBP), Queratopatía Bulosa Afáquica (QBA) y Distrofia de Fuch. Estos trastornos son enfermedades corneales que presentan disfunción de células endoteliales y edema crónico como los componentes principales de la fisiopatología. Cuando estas condiciones están presentes, se acumula fluido dentro de las células epiteliales y el espesor corneal se puede incrementar sustancialmente, causando pérdida de transparencia y disminución en la visión. Se ha encontrado que en la QBP y la QBA las córneas tienen una distribución alterada de AQP1, AQP3 y AQP4, mientras que las córneas con distrofia de Fuch tienen cambios en la AQP1 (Kennedy et al. (2004) *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 52:1341-1350).

Las acuaporinas también están implicadas en trastornos clínicos de dilución y concentración urinaria. La AQP1, y particularmente las AQP2, AQP3 y AQP4, junto con la urea y transportadores de iones, han permitido un mejor entendimiento de la dilución y concentración urinaria a nivel celular y molecular. Por ejemplo, la AQP1 se expresa constitutivamente tanto en la membrana apical como en la basolateral de los túbulos proximales y en el asa de Henle descendente. Los ratones carentes de *aqp1* sufren de una disminución en la osmolaridad urinaria máxima. Esto mismo es aplicable en seres humanos que carecen del gen *aqp1*. Las proteínas AQP3 y AQP4 están localizadas en la membrana basolateral de las células principales en el ducto colector. La AQP3 es regulada por la arginina vasopresina (AVP). Los ratones carentes de *aqp3* exhiben poliuria sustancial secundaria a diabetes insípida nefrogénica (DIN) resistente a vasopresina. La AQP4 predomina en la membrana basolateral de la médula interna y no es regulada por AVP. Los ratones carentes de *aqp4* también exhiben DIN, pero ésta es menos grave que la observada en ratones carentes de *aqp3*. Las proteínas AQP3 y AQP4 constituyen los canales de salida para el movimiento de agua a través de la membrana basolateral del conducto colector, mientras que la AQP2 es el canal de agua para la reabsorción de agua a través de la membrana apical de las células principales del conducto colector. De hecho, la AQP2 se encuentran exclusivamente en las células principales del túbulo colector y del conducto colector regulado por arginina vasopresina (AVP). Sin embargo, algunos hallazgos sugieren una regulación de AQP2 por hiperosmolaridad, que es independiente de AVP. Entre muchos otros trastornos, un desbalance del agua puede causar hiponatremia o hipernatremia de importancia clínica. La hiponatremia es más común y es la alteración de fluido y electrolitos más frecuente en pacientes hospitalizados; es decir, la prevalencia de la hiponatremia en pacientes hospitalizados es tan alta como 15 a 30% (Schrier (2006) *Journal of the American Society of Nephrology* 17:1820-1832).

La Relaxina Modula las Acuaporinas para Afectar la Fisiología Reproductiva

En la fase final del embarazo, la matriz extracelular (MEC) del cuello uterino cambia extensamente durante la

maduración cervical, para permitirle al feto pasar a través del canal durante el parto. La maduración cervical se lleva a cabo mediante una compleja serie de eventos que conducen a la degradación y dispersión de colágeno. La relaxina peptídica ovárica es un factor involucrado en estos procesos, pero las teorías actuales sobre los mecanismos de acción de la relaxina tienen todavía muchas preguntas que responder. Los solicitantes probaron la nueva hipótesis de que la relaxina incrementa el contenido de agua cervical y la dispersión de fibra colágena, al regular las acuaporinas (AQPs) (véase el Ejemplo 1). Demostraron que la expresión del gen *aqp3* se encontró significativamente reducida en el cuello uterino de ratones carentes de relaxina (Rln^{-/-}) al final de la gestación (Figura 1). La proteína AQP3 se localizó predominantemente en células epiteliales basales en el cuello uterino murino y hubo una reducción de AQP3 inmunorreactiva en esta región, en ratones Rln^{-/-} (Figura 1). En un estudio secundario, los ratones Rln^{-/-} en gestación fueron tratadas con relaxina, lo cual dio como resultado un significativo incremento en la expresión del gen *aqp3* y una disminución en la expresión del gen *aqp5*, en comparación con controles tratados con placebo (Figura 3). Los ratones Rln^{-/-} preñadas tratadas con relaxina, presentaron más AQP3 inmunorreactiva en el epitelio basolateral y menos AQP5 inmunorreactiva en las células basales del epitelio, en comparación con controles tratados con placebo (Figura 4). Además, el tratamiento con relaxina incrementó significativamente el peso húmedo cervical y la dispersión de colágena en la MEC estromal. Estos hallazgos demostraron que la relaxina modula la expresión de genes y proteínas acuaporina y podría modular el balance de agua en tejidos reproductivos.

Es probable que la AQP5 sea regulada por cAMP. Se piensa que esto ocurre a través de la activación de la proteína cinasa A (PKA), ya que la inhibición de la PKA bloquea la translocación de AQP5 mediada por cAMP en MLE-12 epitelial pulmonar (Sidhaye et al. (2005) *The Journal of Biological Chemistry* 280:3590-3596). Como se anotó anteriormente, el tratamiento con relaxina de ratones preñadas Rln^{-/-} disminuyó la expresión de AQP5, en comparación con controles tratados con solución salina. Aquí, los datos recabados por ELISA demostraron que las concentraciones de relaxina fueron más bajas en el sexto día de infusión, pero la menor concentración de relaxina no reduce los efectos inhibitorios de la relaxina sobre la expresión de AQP5. Los solicitantes postulan que la relaxina podría regular la expresión de AQP5 o la translocación, a través de la ruta del cAMP, lo cual involucra la activación de PKA. La relaxina también activa el cAMP de una manera bifásica, mediante la activación de la fosfoinositida-3-cinasa (PI3K), la cual es requerida para la segunda oleada (Dessauer & Nguyuen (2005) *Annals of the New York Academy of Sciences* 1041:272-279). En el cuello uterino, la importancia funcional de la AQP5 en las primeras fases de la gestación, es que permite el flujo de entrada de agua al estroma, y también incrementa la secreción mucosal en las células epiteliales (Anderson et al. (2006) *Endocrinology* 147:130-140). Los inventores contemplan que la disminución en la expresión de AQP5 en ratones Rln^{+/-} en la fase final de la gestación, sugiere un efecto inhibitorio causado por la relaxina presente de manera natural.

Otro posible mecanismo para la AQP5 involucra un agente inflamatorio. Se ha sugerido que la maduración cervical es una respuesta inflamatoria causada por los altos niveles de agentes inflamatorios encontrados en el cuello uterino en gestación. La regulación precisa y las interrelaciones de los agentes inflamatorios tales como las citocinas, notablemente la IL-8, o el factor activador plaquetario (PAF), la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y los macrófagos en el cuello uterino, todavía está por determinarse, pero el nivel más alto de factores inflamatorios coincide con la fase activa de la maduración cervical. En términos de la regulación de la AQP5, una posible ruta es la activación de la ruta NF- κ B canónica a través del TNF- α , que es un factor inflamatorio que se une al TNFR1 para inhibir y/o regular por disminución el ARNm de la AQP5 (en un factor de 2) y la proteína (en un factor de 10) (Towne et al. (2001) *The Journal of Biological Chemistry* 276:18657-18664). La AQP5 también es regulada por incremento a través de una ruta independiente de ERK, pero sólo durante condiciones hiperosmóticas en células MLE-15 (Hoffert et al. (2000) *The Journal of Biological Chemistry* 275:9070-9077). Aunque la NF- κ B activa múltiples rutas de señalización, tales como la ERK y MEK, el efecto primario sobre la regulación de la AQP5 proviene directamente de las transcripciones de NF- κ B. El vínculo aquí es que investigaciones recientes reportaron que en células THP-1 humanas, la relaxina incrementa dos subunidades NF- κ B, p50 y p65 (activadores de transcripción) y disminuye la I κ B- α , que inhibe la translocación de NF- κ B en el núcleo (HO et al. (2007) *Journal of Leukocyte Biology* 81:1303-1310). Sin embargo, este estudio se llevó a cabo para demostrar la inducción de MMP-9 por la relaxina, a través de la ruta NF- κ B y, por lo tanto, no es más que un posible mecanismo.

50 La Relaxina Modula las Acuaporinas para Afectar la Homeostasis de Fluidos

La mayoría de las investigaciones sobre la hormona peptídica relaxina se enfocan en la reproducción en mamíferos, debido a que la hormona es secretada en el ovario en altas concentraciones durante la gestación. Sus funciones clásicas están asociadas con procesos de remodelación tisular que ocurren en la matriz extracelular del cuello uterino y la vagina antes del inicio de la labor en animales. Sin embargo, en la actualidad se ha vuelto evidente que la relaxina desempeña una función importante en el riñón.

Se sabe que ciertos animales desérticos lidian con el problema de la limitada disponibilidad de agua, mediante una variedad de adaptaciones morfológicas, conductuales y fisiológicas. En particular, son capaces de concentrar su orina para prevenir que se pierdan grandes cantidades de agua, cuando se excretan los desechos metabólicos. Se piensa que éste es el mecanismo de conservación de agua más importante del que disponen los vertebrados terrestres, especialmente en ambientes áridos. La conservación del agua ocurre en el conducto colector de la nefrona del riñón. Si la osmolaridad del plasma (es decir, una medición de la concentración de solutos definida como el número de osmoles (Osm) de soluto por litro (L) de solución) se incrementa, estos conductos se vuelven

altamente permeables al agua, y el agua sale de la nefrona hacia la médula circundante. Uno de los principales mecanismos de concentración de orina asociados con la reabsorción del agua, yace en la hormona vasopresina y sus interacciones con moléculas específicas del canal de agua (es decir, las acuaporinas), especialmente la AQP2 en los conductos colectores que se extienden en la papila renal. Sin embargo, se sabe poco acerca de la función específica de la papila renal. De manera interesante, los ratones espinosos toleran un gran incremento en la osmolaridad del plasma después de la ingesta de sal, sin tener que beber grandes cantidades de agua, mientras que los ratones de laboratorio tienen que beber. Por ejemplo, los ratones saltarines spinifex responden a la privación de agua disminuyendo el volumen de orina e incrementando muy rápidamente la osmolaridad de la misma, no ocurre lo mismo en los ratones de laboratorio. De aquí que los inventores decidieron investigar el mecanismo de concentración de orina en ratones y ratas de laboratorio, con el fin de correlacionar estos hallazgos con otros mamíferos, incluyendo los seres humanos. Esto probó ser un desafío, ya que el mecanismo de concentración de orina no se basa en el incremento de vasopresina o renina-angiotensina. Aquí, los inventores contemplan una función novedosa para la hormona peptídica relaxina y su receptor RXFP1, en la producción de orina concentrada en el riñón, especialmente en respuesta a la privación de agua y al aumento de salinidad. Los inventores contemplan que la relaxina es un factor regulador clave en la producción de orina concentrada en el riñón, y que la relaxina actúa directamente sobre las células del conducto colector de la médula interna, para estimular cAMP intracelular y mediar el tráfico de la AQP2 en la membrana apical (véase el Ejemplo 2). Los inventores encontraron una alta expresión de RXFP1 en las papilas renales de ratones de laboratorio (véase la Figura 6); es decir, una región específica del riñón que expresa AQP2 y AQP4 (véanse las Figuras 8 y 10). Los inventores también encontraron la expresión de RXFP1 en los túbulos renales, tanto en la región de la corteza como en la región de la médula, en riñones de ratas de laboratorio (Figura 7). Estos hallazgos en diferentes especies, proporcionan evidencia de receptores de relaxina en regiones del riñón que expresan AQP2 y AQP4, las cuales son las responsables de la permeabilidad al agua. Además, la relaxina podría actuar independientemente de la vasopresina y tener un efecto osmorregulador sobre el riñón mismo (véase el Ejemplo 2). Los inventores encontraron que el tratamiento con relaxina en ratones y ratas, incrementa la expresión de AQP2 y AQP4 en el riñón (véanse las Figuras 8, 10 y 11). Esto establece el primer vínculo entre la relaxina y las acuaporinas. El tratamiento con relaxina en ratas, también se sabe que estimula la liberación de vasopresina, al incrementar la actividad nerviosa en el cerebro (McKinley et al. (2004) Journal of Neuroendocrinology 16:340-347). Con base en estos hallazgos, los inventores proponen que los mecanismos de conservación de agua en el riñón, se basan en una acción reguladora directa de la relaxina con las acuaporinas, o una acción reguladora indirecta de las AQP, involucrando la liberación de vasopresina del cerebro.

Tratamiento del Edema con Relaxina

El edema es una forma de inflamación que es causada cuando queda atrapado líquido en los tejidos. Sucede más a menudo en las extremidades inferiores; es decir, en los pies, tobillos y piernas, pero también puede ocurrir en otras partes del cuerpo, tales como el rostro y las manos. El edema puede ocurrir por estar sentado o estar de pie en un lugar por algún tiempo prolongado, debido a que el agua se acumula en las piernas y pies por la gravedad. El edema también puede ser el resultado de un debilitamiento en las válvulas de las piernas de las piernas (es decir, insuficiencia venosa). Esta condición dificulta que las venas empujen la sangre de regreso hacia el corazón y, por lo tanto, produce venas varicosas y una acumulación de fluido en las piernas. Enfermedades o trastornos específicos (por ejemplo, la insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad pulmonar, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, enfermedad tiroidea, lesiones traumáticas en la cabeza) pueden causar edema o tornarlo más pronunciado. El embarazo puede causar edema en las piernas a medida que el útero pone presión sobre los vasos sanguíneos en la parte inferior del tronco. Además, la preeclampsia y eclampsia que son trastornos asociados con el embarazo, pueden causar edema. La preeclampsia causa cambios en los vasos sanguíneos que hacen que tengan "fugas" hacia los tejidos. Las fugas causan hinchazón de los tejidos, lo cual da como resultado el edema. Si la preeclampsia se vuelve más grave, puede ocurrir inflamación en el hígado, lo cual potencialmente puede causar la ruptura del hígado con una hemorragia. A veces puede haber hinchazón en el cerebro, causando convulsiones, lo cual se conoce como eclampsia.

El edema cerebral es un trastorno peligroso que puede causar la muerte si no se trata. Es el resultado de una acumulación excesiva de agua en los espacios intracelular y/o extracelular del cerebro. Hay diferentes de edema cerebral, incluyendo el edema cerebral vasogénico, el cual está clasificado además en edema cerebral hidrostático, que ocurre con la hipertensión aguda y maligna; el edema cerebral causado por cáncer de cerebro; y el edema cerebral por altitud (ECPA). Además del edema cerebral vasogénico, existe el edema cerebral citotóxico (es decir, causado por una alteración en el metabolismo celular, que causa un funcionamiento inadecuado de la bomba de sodio y potasio en la membrana de las células de la glía, lo cual conduce a la retención celular de sodio y agua, y a la hinchazón de los astrocitos de la materia gris y la blanca); edema cerebral osmótico (es decir, la osmolaridad de líquido cefalorraquídeo (LCR) y del líquido extracelular (LEC) del cerebro se alteran, creando de esta manera un gradiente de presión anormal, de modo que el agua fluye hacia el cerebro); y el edema cerebral intersticial (como en el hidrocefalo obstructivo, en donde el edema es causado por la ruptura de la barrera LCR-cerebro, dando como resultado un flujo transependimal de LCR, lo cual permite que dicho líquido penetre en el cerebro y se disemine en el espacio extracelular en la materia blanca).

El edema vasogénico es causado por un rompimiento de la barrera hematoencefálica. Esto permite que las proteínas intravasculares y el fluido que normalmente están secuestrados, penetren al espacio parenquimal extracelular del cerebro. Una vez que los componentes del plasma cruzan la barrera hematoencefálica, el edema se

disemina y a menudo con mucha rapidez. Cuando entra agua a la materia blanca, se mueve extracelularmente a lo largo de los tractos de las fibras y esto también afecta a la materia gris. Este tipo de edema se encuentra en respuesta a un trauma en la cabeza, tumores, inflamación focal, etapas tardías de isquemia cerebral y encefalopatía por hipertensión. Por ejemplo, en los Estados Unidos solamente, hay aproximadamente dos millones a la sala de urgencia por lesiones en la cabeza, aproximadamente 475,000 admisiones por trauma en la cabeza, aproximadamente 52,000 fallecimientos y aproximadamente 80,000 casos de discapacidad grave de largo plazo, cada año. Todavía no hay ningún fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de lesiones en la cabeza graves y el edema resultante. Los pacientes que se presentan con lesión traumática de la cabeza, a menudo tienen graves impedimentos y sufren de pérdida de la conciencia, pérdida de la memoria y déficits neurológicos focales, que podrían o no ser transitorios.

Se piensa que el edema cerebral involucra las proteínas AQP1, AQP4 y AQP9. Particularmente, la AQP4, que es la acuaproteína más abundante en el cerebro, parece desempeñar una función de la fisiología del agua en el cerebro, en el edema cerebral y en el hidrocéfalo (Brian et al. (2010) *Cerebrospinal Fluid Research* 7:15). En edema cerebral experimentalmente inducido, en modelos en ratas (por ejemplo mediante un tratamiento con la toxina episón), la expresión de AQP4 se incrementa, lo cual concuerda con hallazgos anteriores (véase Manley et al. (supra)). Sin embargo, en otro modelo experimental, la activación directa del receptor de endotelina B (ETC)(astrocítica sugiere una disminución en la expresión de AQP4, dando como resultado una reducida excreción de fluido del edema y causando un agravamiento del edema cerebral vasogénico (Koyama et al. (2010) *Neuroscience Letters* 469:343-347). De manera interesante, este estudio además sugiere que el edema citotóxico puede mejorar mediante una disminución en la expresión de AQP4, debido a que previene que entre agua, mientras que el edema vasogénico puede mejorar mediante un incremento en la expresión de AQP4, debido a que incrementa el flujo de salida de fluido del edema. Los inventores contemplan que el tratamiento con relaxina puede disminuir la expresión de AQP4 en el edema citotóxico, lo cual es consistente con que la relaxina es efectiva como agonista del receptor ETB y antagonista de la endotelina-1 (Dschietzig et al. (2003) *Circ Res.* 92:32-40). La relaxina puede incrementar adicionalmente la expresión de AQP4 en el edema vasogénico, lo cual puede ocurrir mediante un segundo mecanismo. Notablemente, los inventores han demostrado un incremento en la expresión de AQP4 en el tejido renal, después de un tratamiento con relaxina (además de un incremento en la AQP2). De aquí que puede ocurrir un efecto similar con respecto a la AQP4 en el tejido cerebral, en el edema vasogénico, lo cual es consistente con la AQP4 como un blanco para fármacos nuevos potenciales (véase Manley et al. y Koyama et al. (supra)).

Se piensa que el edema ocular involucra a la AQP1, AQP3, AQP4 y AQP5. El edema ocular relacionado con córneas con queratopatía pseudofáquica/afáquica (QBP/QBA) y córneas con distrofia de Fuch, demostró un aumento de la expresión de AQP3 y AQP4 en las córneas enfermas, lo cual podría contribuir a la inflamación. Los inventores contemplan que el tratamiento del edema ocular con relaxina, podría causar una modulación de la AQP3 y/o AQP4 en la córnea de un paciente.

Se piensa que en el edema pulmonar están involucradas las AQP1, AQP3, AQP4 y AQP5. En el edema pulmonar experimentalmente inducido en ratas y ratones, la expresión de la AQP1, AQP4 y AQP5 disminuye, y la expresión de la AQP3 se incrementa. Por ejemplo, el tratamiento con tiourea causa una disminución muy rápida de la expresión de estas acuaporinas, mientras que el tratamiento por hiperoxia causa una disminución en un periodo de 72 horas. Los inventores contemplan que el tratamiento del edema pulmonar con relaxina, podría ser capaz de modular la AQP1, AQP3, AQP4 y/o AQP5. Un posible escenario es un incremento en la expresión de AQP1, AQP4 y/o AQP5 y una disminución en la expresión de AQP3 en el pulmón de un paciente, como resultado del tratamiento con relaxina.

Se contempla que la relaxina mejora el edema sistémico a través de un mecanismo que regula y/o modula los canales de agua (es decir, las acuaporinas), tal como se describe en detalle en la presente descripción. Sin embargo, al menos uno de dos mecanismos adicionales podría contribuir, por lo menos parcialmente, con una reducción del edema. Así pues, el segundo mecanismo que también podría desempeñar una función, es la regulación del transporte iónico y de los gradientes osmóticos; por ejemplo en el edema pulmonar, la relaxina podría incrementar el transporte de iones y, de este modo, el gradiente osmótico a través de las células epiteliales alveolares, facilitando de esta manera la depuración del líquido de los espacios de aire de los pulmones (Zemans et al. (2004) *Critical Care* 8:469-477). El tercer mecanismo que podría estar involucrado, es la regulación de la hemodinámica, por ejemplo, como la ávida retención renal de sodio es una causa subyacente de todas las formas de edema sistémico, al mejorar la hemodinámica renal y/o GFR, la relaxina podría facilitar la excreción renal de sodio, mejorando de esta manera el edema sistémico. Además, la relaxina puede ser natriurética al menos en el corto plazo, lo cual podría facilitar la excreción renal de sodio en el marco del edema sistémico (Jeyabalan & Conrad (2010) *Renal Physiology and Pathophysiology in Pregnancy*. In: *Renal and Electrolyte Disorders*, 4ª. Edición, RW Schrier, ed. Little Brown and Company).

En resumen, los inventores han demostrado que la relaxina es capaz de modular la expresión de acuaporinas en diferentes tejidos. Por lo tanto, se esperaría que la relaxina sea efectiva en el tratamiento del edema vasogénico, debido a que incrementa la expresión de acuaporinas y promueve el movimiento de agua fuera de los tejidos u órganos edematosos, reduciendo de esta manera la acumulación de agua y la hinchazón. Alternativamente, la relaxina podría disminuir la expresión de acuaporinas y reducir el movimiento adicional de agua hacia los tejidos u órganos, evitando de esta manera la exacerbación del edema citotóxico. Además, la relaxina podría regular el transporte de solutos entre tejidos y la sangre, afectando de este modo el movimiento de agua hacia dentro y fuera

de tejidos y reduciendo el edema en tejidos y órganos. Además, esto podría involucrar una acción hemodinámica de la relaxina sobre la vasculatura en varios órganos, para mejorar el transporte de agua fuera de los órganos afectados.

5 Los inventores han ideado un método para el tratamiento del edema en pacientes, mediante la administración de relaxina. Los pacientes son tratados con una dosis diaria de relaxina farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, sintética, recombinante, análoga, agonista, etc.), en una cantidad en el rango de aproximadamente 1 a 1000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por día. El término "aproximadamente" cuando se utiliza en el contexto de un valor establecido, abarca un rango de hasta 10% por arriba o por abajo del valor establecido (por ejemplo, 90-110% del valor establecido). Por ejemplo, una tasa de infusión intravenosa (i.v.) de aproximadamente 30 µg/kg/día, abarca 10 tasas de infusión i.v. de 27 µg/kg/día a 33 µg/kg/día. En una modalidad, las dosis de relaxina son de 10, 30, 100 y 250 µg/kg/día. Estas dosis dan como resultado concentraciones séricas de relaxina de aproximadamente 1, 3, 10, 30, 75 ó 100 ng/mililitro. En una modalidad preferida, la relaxina farmacéuticamente efectiva o un agonista de la misma se administra a razón de aproximadamente 30 µg/kg/día. En otra modalidad preferida, la relaxina farmacéuticamente efectiva o un agonista de la misma, se administra a razón de aproximadamente 10 a 15 aproximadamente 250 µg/kg/día. En otra modalidad, la administración de la relaxina se continúa para mantener una concentración sérica de relaxina de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 500 ng/mL, de preferencia de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 300 ng/mL y más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 ng/mililitro. Más preferiblemente, la administración de la relaxina se continúa para mantener una concentración sérica de relaxina de 10 ng/mL o mayor. Estas concentraciones de relaxina pueden mejorar o 20 reducir la acumulación de fluido asociada con el edema, incluyendo pero no limitándose al edema cerebral, edema ocular, edema pulmonar, ascitis, angioedema hereditario, edema periférico y edema sistémico.

Tratamiento de Diabetes Insípida Nefrogénica (DIN) con Relaxina

25 La diabetes insípida nefrogénica (DIN), es un trastorno que ocurre cuando los túbulos del riñón no responden a la hormona antidiurética (ADH), también llamada vasopresina. Como resultado, el mecanismo de concentración de orina se altera, dando como resultado una producción excesiva de orina diluida en el sujeto afectado. Además del principal síntoma de excreción de grandes cantidades de orina diluida (es decir, poliuria), el sujeto afectado necesita tomar grandes cantidades de agua (es decir, polidipsia) para compensar la pérdida de agua en la orina. Algunas complicaciones adicionales incluyen la deshidratación rápida, sed excesiva, irritabilidad, letargia, fiebre, vómito, estreñimiento o diarrea, convulsiones y fracaso en aumentar de peso.

30 Se piensa que la DIN es causada por una mutación inactivante parcial de SNP en el receptor V2. Los inventores contemplan que la relaxina mejora la DIN mediante un mecanismo que incrementa el cAMP en las células principales. Dado que existe una superposición en las reservas de cAMP para relaxina y AVP, entonces la relaxina podría intensificar la inserción de AQP2 y AQP3 en las membranas apical y basolateral, respectivamente, así como incrementar su expresión en el marco de una mutación inactivante parcial o SNP en el receptor V2. Sin embargo, al 35 menos uno de dos mecanismos adicionales podría contribuir cuando menos parcialmente a mejorar la DIN. Así pues, el segundo mecanismo incluye incrementar el campo en las células principales del conducto colector terminal. La señalización de campo, como se señaló anteriormente, causa la inserción de UT-A1 y UT-A3 en la membrana, facilitando la deposición de urea en la médula interna, lo cual da cuenta de una cantidad tan alta como 60% del gradiente osmótico corticopapilar. El tercer mecanismo incluye aumentar la expresión del cotransportador Na/K/2Cl en la ALH gruesa medular, cuya actividad constituye el "efecto independiente" primordial para la formación del 40 gradiente osmótico C-P, la concentración y dilución urinaria (Hebert & Andreoli (1984) American Journal of Physiology 246:F745-756).

Los inventores han ideado un método para tratar la DIN en pacientes, mediante la administración de relaxina. Los 45 pacientes con DIN son tratados mediante una bomba subcutánea que suministra relaxina farmacéuticamente activa (es decir, sintética, recombinante, análoga, agonista, etc.), en una cantidad en el rango de aproximadamente 1 a 1000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por día. En una modalidad, las dosis de relaxina son de 10, 30, 100 y 250 µg/kg/día. Estas dosis dan como resultado concentraciones séricas de relaxina de aproximadamente 1, 3, 10, 30, 75 ó 100 ng/mililitro. En una modalidad específica, la relaxina farmacéuticamente efectiva o un agonista de la misma se 50 administra a razón de aproximadamente 30 µg/kg/día. En otra modalidad preferida, la relaxina farmacéuticamente efectiva o un agonista de la misma, se administra a razón de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 µg/kg/día. En otra modalidad, la administración de relaxina se continúa de tal manera que se mantenga una concentración sérica de relaxina de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 500 ng/mL, más preferiblemente de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 300 ng/mL y más preferiblemente de aproximadamente 1 a 55 aproximadamente 10 ng/mililitro. De preferencia, la administración de relaxina se continúa para mantener una concentración sérica de relaxina de 10 ng/mL o mayor. Estas concentraciones de relaxina pueden mejorar o reducir la producción excesiva de orina diluida y las complicaciones asociadas con la DIN.

Composiciones y Formulaciones de Relaxina

La relaxina, agonistas de relaxina y/o análogos de relaxina, se formulan como sustancias farmacéuticas por ser utilizadas en los métodos de la invención. Cualquier composición o compuesto que pueda estimular una respuesta

biológica asociada con la unión de relaxina biológica o farmacéuticamente activa (por ejemplo, relaxina sintética, relaxina recombinante) o un agonista de relaxina (por ejemplo, un análogo de relaxina o un modulador similar a la relaxina) a los receptores de relaxina, se puede utilizar como sustancia farmacéutica en la invención. Los detalles generales sobre las técnicas de formulación y administración, se describen en la literatura científica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co, Easton Pa). Las formulaciones farmacéuticas que contienen relaxina farmacéuticamente activa, se pueden preparar de conformidad con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de productos farmacéuticos. Las formulaciones que contienen relaxina farmacéuticamente activa o agonistas de la misma utilizadas en los métodos de la invención, se pueden formular para la administración por cualquier vía convencionalmente aceptable, incluyendo, pero no limitándose a la vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, sublingual, intranasal, intracerebral, intracerebrovascular, tópica, oral, intravítrea y por inhalación. Algunos ejemplos ilustrativos se presentan a continuación. En una modalidad preferida, la relaxina se administra por vía intravenosa o subcutánea.

Quando la relaxina se administra por inyección intravenosa o subcutánea (por ejemplo, infusión, bolo, bomba), las formulaciones que contienen relaxina farmacéuticamente activa o un agonista de relaxina farmacéuticamente efectivo, pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de conformidad con las técnicas conocidas, utilizando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes suspensoros que han sido mencionados anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico farmacéuticamente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear, están el agua y la solución de Ringer, que es cloruro de sodio isotónico. Además, convencionalmente se pueden emplear aceites no volátiles estériles como disolventes o medios de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite no volátil suave incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden utilizar ácidos grasos tales como el ácido oleico en la preparación de productos inyectables.

Las suspensiones acuosas de la invención contienen relaxina mezclada con excipientes adecuados para la manufactura de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen un agente suspensor, tal como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma acacia, y agentes dispersores o humectantes tales como fosfatida de origen natural (por ejemplo lecitina), un producto de condensación de un óxido de alqueno con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxietanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitol), o un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservadores tales como p-hidroxibenzoato de etilo o de n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa, aspartame o sacarina. Se puede ajustar la osmolaridad de las formulaciones.

Se pueden formular suspensiones oleosas al suspender relaxina en un aceite vegetal, tal como aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, tal como acera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden agregar agentes edulcorantes para proporcionar una preparación oral degustable. Estas formulaciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante, tal como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables de la invención adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua, se pueden formular a partir de relaxina en una mezcla con un agente dispersante, suspensor y/o humectante, y uno o más conservadores. Los agentes dispersantes o humectantes adecuados están ejemplificados por aquellos anteriormente descritos. Algunos excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes, también pueden estar presentes. Las formulaciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de tipo aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de cacahuete, un aceite mineral tal como parafina líquida, o una mezcla de los mismos. Los agentes emulsificantes adecuados incluyen gomas de origen natural, tales como la goma acacia y goma de tragacanto, fosfatidas de origen natural, tales como la lecitina de soya; ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitán; y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como monooleato de polioxietilensorbitán.

Régimen de Administración y Dosificación de Formulaciones de Relaxina

Las formulaciones que contienen relaxina farmacéuticamente activa o un agonista de relaxina farmacéuticamente efectivo en los métodos de la invención, se pueden administrar mediante cualquier vía de administración convencionalmente aceptable, incluyendo, pero no limitándose a la vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, sublingual, intranasal, intracerebral, intracerebroventricular, tópica, oral, intravítrea y por inhalación. La vía de administración variará dependiendo de la farmacocinética y otras propiedades de los fármacos y el estado de salud del paciente. A continuación se presentan lineamientos generales.

Los métodos de la presente invención reducen la acumulación de fluido asociada con el edema. Además, los métodos de la invención reducen la excreción crónica de orina diluida, en pacientes con diabetes insípida nefrogénica (DIN). La cantidad de relaxina, sola o en combinación con otro agente o fármaco, que es adecuada para lograr esto, se considera la dosis terapéuticamente efectiva. El programa de dosificación y las cantidades efectivas para su uso; es decir, el "régimen de dosificación", dependerá de una variedad de factores, incluyendo la etapa de la enfermedad o trastorno, la gravedad de la enfermedad, la gravedad de los efectos secundarios, el estado general de salud del paciente, el estado físico del paciente, la edad y similares. Al calcular el régimen de dosificación para un paciente, también se debe tomar en cuenta la vía de administración. El régimen de dosificación también deberá tomar en cuenta la farmacocinética; es decir, la velocidad de absorción, la biodisponibilidad, el metabolismo, depuración y similares. Con base en estos principios, la relaxina puede utilizarse para el tratamiento del edema y/o la DIN, en individuos afectados por estos trastornos.

La presente invención también proporciona el uso de relaxina en la manufactura de un medicamento para el tratamiento del edema y/o la DIN, en donde el medicamento se prepara específicamente para tratar a los individuos afectados. Además se contempla el uso de la relaxina en la manufactura de un medicamento para el tratamiento del edema y/o la DIN, en donde el paciente previamente ha sido tratado (por ejemplo, unas cuantas horas antes, uno o más días antes, etc.) con un fármaco diferente. En una modalidad, el otro fármaco todavía está activo in vivo en el paciente. En otra modalidad, el otro fármaco ya no es activo in vivo en el paciente.

El estado actual de la técnica le permite al clínico determinar el régimen de dosificación de relaxina para cada paciente individual. Como ejemplo ilustrativo, los lineamientos que se proporcionan a continuación para la relaxina, se pueden utilizar como guía para determinar el régimen de dosificación; es decir, el programa de dosis y los niveles de dosis de formulaciones que contienen relaxina farmacéuticamente activa, administradas cuando se practican los métodos de la presente invención. Como guía general, se espera que la dosis diaria de relaxina humana H1, H2 y/ H3 farmacéuticamente activa (por ejemplo, sintética, recombinante, análoga, agonista, etc.), típicamente sea una cantidad en el rango de aproximadamente 1 a 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del sujeto, por día. En una modalidad, las dosis de relaxina son de 10, 30, 100 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$. En otra modalidad, estas dosis dan como resultado concentraciones séricas de relaxina de aproximadamente 1, 3, 10, 30, 75 ó 100 ng/mililitro. En una modalidad preferida, la relaxina farmacéuticamente activa o un agonista de la misma se administra a razón de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$. En otra modalidad preferida, la relaxina farmacéuticamente efectiva o un agonista de la misma, se administra a razón de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$. En otra modalidad, la administración de relaxina se continúa de tal manera que se mantenga una concentración sérica de relaxina de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 500 ng/mL, más preferiblemente de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 30 ng/mL y más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 ng/mililitro. Más preferiblemente, la administración de relaxina se continúa para mantener una concentración sérica de relaxina de 10 ng/mL o mayor. Así pues, los métodos de la presente invención incluyen administraciones que dan como resultado estas concentraciones séricas de relaxina. Estas concentraciones de relaxina pueden mejorar o reducir la acumulación de fluido asociada con el edema, incluyendo, pero no limitándose al edema cerebral, edema ocular, edema pulmonar, ascitis, angioedema hereditario, edema periférico y edema sistémico. Además, estas concentraciones de relaxina pueden mejorar o reducir la excreción crónica de orina diluida en la DIN. Dependiendo del sujeto, la administración de relaxina se mantiene por un periodo de tiempo específico o por cuando tiempo sea necesario para alcanzar la estabilidad en el sujeto. Por ejemplo, la duración del tratamiento con relaxina de preferencia se mantiene en un rango de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 96 horas, de preferencia de 8 horas a aproximadamente 72 horas, dependiendo del paciente, y una o más repeticiones opcionales del tratamiento, según sea necesario.

Se pueden administrar dosis únicas o múltiples de formulaciones de relaxina, dependiendo de la dosis y la frecuencia, según sea requerido y tolerado por el paciente que sufre de edema y/o DIN. Las formulaciones deben proporcionar una cantidad suficiente de relaxina para mejorar de manera efectiva la condición. Una formulación farmacéutica típica para administración intravenosa o subcutánea de relaxina, dependerá de la terapia específica. Por ejemplo, la relaxina se puede administrar a un paciente mediante una monoterapia (es decir, sin ningún otro medicamento concomitante) o en una terapia de combinación con otro medicamento. En una modalidad, la relaxina se administra a un paciente diariamente como monoterapia. En otra modalidad, la relaxina se administra a un paciente diariamente como terapia de combinación con otro fármaco. De manera notable, las dosificaciones y frecuencias de relaxina administradas a un paciente, pueden variar dependiendo de la edad, grado de enfermedad, tolerancia al fármaco y medicamentos y trastornos concomitantes.

En algunas modalidades, la relaxina se proporciona en forma de una solución de 1 mg/mL (3.5 mL en frascos de vidrio de 5 mL). El placebo, que es idéntico al diluyente para la relaxina, se proporciona en frascos idénticos. La relaxina o el placebo se pueden administrar por vía intravenosa o subcutánea al paciente, en volúmenes pequeños, utilizando una bomba de jeringa en combinación con solución salina normal, en una configuración en sucesión. Se utilizan tubos y una llave de paso de 3 vías, compatibles y que han sido probados y calificados para su uso con relaxina, para administrar la formulación de relaxina. Las dosis se administran con base en el peso y se ajustan para cada paciente, ajustando la tasa de relaxina administrada, por ejemplo, por la bomba de infusión.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos pretenden ilustrar la invención y no se deben considerar como limitantes de los

alcances de las reivindicaciones.

Ejemplo 1 (comparativo)

La Relaxina Modula la Acuaporina-3 y Acuaporina-5 en el Cuello uterino

5 La relaxina incrementa el contenido de agua cervical y la dispersión de fibra colágena, al regular las acuaporinas (AQPs). La expresión del gen *aqp3* se redujo significativamente en el cuello uterino de ratones carentes de relaxina (Rln^{-/-}) al final de la gestación (Figura 1A). La proteína AQP3 se localizó en el epitelio basolateral del cuello uterino murino y hubo una reducción de la AQP3 inmunorreactiva en esta región, en ratones Rln^{-/-} (Figura 1B). En un
10 segundo estudio, ratones Rln^{-/-} preñadas fueron tratadas con relaxina. Esto dio como resultado un significativo incremento en la expresión del gen AQP3 cervical y una disminución en la expresión del gen *aqp5*, en comparación con controles tratados con placebo (Figura 3). Ratones Rln^{-/-} preñadas tratadas con relaxina, presentaron una mayor concentración de AQP3 inmunorreactiva en el epitelio basolateral y una menor concentración de AQP5
15 inmunorreactiva en las capas apicales del epitelio, en comparación con controles tratados con placebo (Figura 4). Además, el tratamiento con relaxina incrementó significativamente el peso húmedo cervical y la dispersión de colágena en la MEC estromal. Estos hallazgos demostraron que la relaxina modula genes de acuaporinas y la expresión de las proteínas, y podría modular el balance de agua en tejidos reproductivos.

Tabla 1

EXPRESIÓN DEL GEN y PROTEÍNA	TRATAMIENTO CON RELAXINA	TRATAMIENTO CON SOLUCIÓN SALINA	IMPORTANCIA FUNCIONAL
<i>aqp3</i> y AQP3	superior	sin efecto	Permite el <i>flujo de salida</i> de agua de las células epiteliales cervicales hacia el estroma.
<i>aqp5</i> y AQP5	inferior	sin efecto	Permite el <i>flujo de entrada</i> de agua desde el lumen hacia las células epiteliales cervicales.

20 Más específicamente, ratones carentes del gen de relaxina tuvieron densidades de colágena cervical más altas al final de la gestación, pero esto no se debió a la disminución de MMPs. Aquí, los inventores proponen un mecanismo alternativo de acción de la relaxina, que involucra la acumulación de agua en el estroma cervical para incrementar la hidratación cervical y causar la dispersión de la fibra colágena. El estudio se refería a la hipótesis anteriormente probada de que la relaxina regula las acuaporinas (AQPs). En más detalle, se colectaron cérvices de ratones competentes para relaxina tipo silvestre y ratones carentes de relaxina, en los días 14.5, 16.5, 18.5 y 19 de sus
25 gestación (pc), y en el día 1 posparto, para comparar la expresión de los genes *aqp3* y *aqp5* entre los genotipos, mediante análisis por RCP cuantitativa; y la expresión de las proteínas por inmunohistoquímica. En el segundo estudio anteriormente referido, ratones carentes de relaxina fueron implantados con minobombas osmóticas Alzet en el día 12.5 pc, para infundir ya sea relaxina humana H2 recombinante (0.05 µg/h; Corthera, Inc.), o bien, solución salina al 0.9%. Se colectaron los cérvices 4 ó 6 días después de la infusión. El tratamiento de relaxina causó un
30 incremento significativo en la expresión del gen *aqp3* cervical y una disminución de la expresión del gen *aqp5*, en comparación con los controles tratados con placebo. Adicionalmente, el tratamiento con relaxina causó un incremento en un factor de 6 del peso húmedo del cuello uterino y una disminución en la expresión del receptor de relaxina RXFP1. Estos nuevos hallazgos sugieren que la relaxina regula por incremento la AQP3 en la región basolateral del epitelio, para mantener el flujo de entrada de agua desde el lumen hacia el estroma (Figura 4). La relaxina también puede regular por disminución la AQP5, para prevenir la pérdida de agua de la región apical hacia
35 el lumen (Figura 4). Estos datos sugieren que la relaxina promueve la hidratación cervical al modular las AQPs. Esto podría facilitar la maduración cervical, causando la dispersión de fibrillas de colágena en la MEC.

Ejemplo 2

La Relaxina Modula la Acuaporina-2 y Acuaporina-4 en el Riñón

40 Ratones deficientes de relaxina reportan una osmolaridad anormalmente alta del plasma, lo cual es una medida de la concentración de electrolitos, urea y otros iones en la sangre. La alta osmolaridad del plasma en estos animales, sugiere que los mecanismos de concentración de orina en los túbulos renales, podrían estar alterados. Sin embargo, cuando los animales son tratados con relaxina, ocurre lo contrario y la osmolaridad del plasma disminuye. Los inventores contemplan que la relaxina altera el centro de "reconocimiento de sed" en el cerebro, para estimular la liberación de arginina vasopresina (AVP), la cual entonces actúa sobre los receptores V2 de los conductos
45 colectores, para incrementar la permeabilidad del agua a través de la AQP2. Los inventores encontraron que el receptor de relaxina RXFP1, de hecho, se expresa en los riñones de ratas y ratones (Figura 7). Esta expresión del RXFP1 se observó en las regiones del riñón responsables de la permeabilidad del agua; es decir, las papilas en

ratones y la médula interna en ratas (Figura 7). Estos datos sugieren que la relaxina podría actuar independientemente de la AVP y tener un efecto osmorregulador directo sobre el riñón mismo. La otra posibilidad es que la relaxina actúe en sinergia con la AVP para intensificar sus capacidades de conservación de agua.

Tabla 2

EXPRESIÓN GÉNICA	TRATAMIENTO CON RELAXINA	TRATAMIENTO CON SOLUCIÓN SALINA	IMPORTANCIA FUNCIONAL
<i>aqp2</i>	superior	sin efecto	Facilita el movimiento de agua desde los túbulos renales filtrando hacia las células del conducto colector.
<i>aqp4</i>	superior	sin efecto	Facilita el movimiento de agua desde las células del conducto colector hacia la sangre para disminuir la osmolaridad del plasma.

5

El tratamiento con relaxina en ratas y ratones incrementó la expresión de AQP2 en los riñones (Figura 8). La Figura 8A ilustra un incremento en la expresión del gen *aqp2* en los riñones de ratas macho RIn+/+ tratadas con relaxina durante 14 días, en comparación con controles tratados con solución salina (VEH), en donde la β -actina es el control de normalización. La Figura 8B ilustra un incremento en la expresión del gen *aqp2* en ratones macho RIn-/- tratados con relaxina por cinco días. Este hallazgo proporcionó un vínculo regulatorio entre la relaxina y las acuaporinas en los riñones. Como resultado, los inventores proponen que los mecanismos de conservación de agua en los riñones, podrían yacer en una relación directa de la relaxina para mediar las acuaporinas (AQPs), así como una acción indirecta sobre la liberación de AVP del cerebro.

10

El tratamiento con relaxina por cinco días en ratas incrementó la expresión del gen *aqp2* en la región medular (que incluye la papila) de riñones de ratas macho (Figura 8C). Este hallazgo respalda la especulación de que la relaxina podría actuar en los riñones para incrementar la expresión de AQP2 y regular el movimiento de moléculas de agua desde el filtrado de los túbulos renales de regreso hacia la sangre, en mamíferos.

15

El tratamiento con un anticuerpo monoclonal contra la relaxina de rata (MCA1) en ratas preñadas, redujo la expresión del gen *aqp2* en la región medular del riñón (Figura 9). Este hallazgo respalda la idea de que la relaxina endógena desempeña una función en la regulación de acuaporinas en el riñón. Como resultado, los inventores proponen que los mecanismos de conservación de agua relacionados con la gestación, en los riñones, podrían yacer en una acción directa de la relaxina para regular las acuaporinas.

20

La relaxina incrementa la AQP4 en el riñón. Los inventores primero demostraron que la expresión del gen *aqp4* se reducía significativamente en la región papilar del riñón, en ratones RIn-/-, tal como se ilustra en la Figura 10A. Las Figuras 10B y 10C muestran que el tratamiento con relaxina durante cinco días ó 14 días en ratones macho RIn-/-, incrementó la expresión del gen *aqp4* en la papila. Este hallazgo respalda la nueva especulación de que la relaxina actúa en el riñón para incrementar la expresión de AQP4 y regular el movimiento de moléculas de agua desde el filtrado de los túbulos renales de regreso hacia la sangre, en mamíferos.

25

El tratamiento con relaxina por cinco días en ratas macho, incrementó la expresión del gen AQP4 en la región medular (que incluye la papila) del riñón (Figura 11). Este resultado respalda la nueva idea de que la relaxina actúa en el riñón para incrementar la expresión de AQP4 en diferentes mamíferos.

30

Ejemplo 3

Acción de la Relaxina sobre las Células del Conducto Colector del Riñón

Los mecanismos de conservación de agua en el riñón pueden basarse en una interacción mediada por relaxina con acuaporinas (AQPs) así como con AVP. Se puede utilizar el modelo de ratas Brattleboro deficientes de AVP para evaluar la contribución de la relaxina versus AVP, en la regulación de la función de AQP2 en el conducto colector renal.

35

En este modelo, la masa corporal, el consumo de agua y alimentos, el desecho de heces y orina, se registran

diariamente. Se analizaron muestras de orina con respecto a los electrolitos y urea, por espectrofotometría (Synchron CX5CE Delta; Beckman Coulter). La osmolaridad se midió mediante la depresión del punto de congelamiento (osmómetro).

5 Nueve pares de riñones fueron disecados en la corteza y la médula interna para análisis de genes y proteínas. Tres pares de riñones fueron seccionados a la mitad y fijados en PLP (Paraformaldehído/Lisina/Peryodato), para montarlos con cera de poliéster para la inmunohistoquímica. Se utilizó la técnica de RCP cuantitativa (q-RCP) para medir la expresión génica y se hicieron comparaciones entre las diferentes regiones del riñón y las dos especies de ratones. La expresión de proteína se midió por análisis de inmunoelectrotransferencia tipo Western (Western blot) e inmunohistoquímica. La osmolaridad del plasma y las concentraciones de AVP también se midieron en el
10 osmómetro, y por RIA, respectivamente.

Se predice que la relaxina incrementa la permeabilidad al agua en el conducto colector y hace posible que estas ratas concentren su orina y, por lo tanto, reduzcan la pérdida excesiva de agua. El descubrimiento de los inventores de que el tratamiento con relaxina incrementaba la expresión de AQP2 en el riñón (supra) sugiere que la osmolaridad anormalmente alta del plasma en los animales deficientes de relaxina, podría estar relacionada con
15 déficits en la expresión de AQP2 o en la translocación vesicular de AQP2 dentro del conducto colector.

Las células del conducto colector de la médula interna (CCMI) proporcionan un modelo para demostrar la función de la relaxina en la modulación de AQP2 independiente de AVP. Las células del CCMI se inocularon en cajas de Petri recubiertas con colágeno tipo IV con medio DMEM/F12 conteniendo 10% de ASB. Las células se cultivaron hasta la confluencia durante cuatro días y se trataron en el día cinco después de la siembra. Para medir los niveles de cAMP y la actividad de la PKA en respuesta al tratamiento con relaxina, las células del CCMI se incubaron en un medio que contenía relaxina humana H1 (concentraciones de 0.1 pM - 1 μ M) durante 45 min. Las células sometidas a inhibición de la PKA, fueron preincubadas con H-89 10 μ M (inhibidor de PKA) durante 60 min antes de la incubación con relaxina H2. Esta concentración de H-89 se sabe que inhibe la fosforilación de la AQP2 en células del CCMI. Después del tratamiento, las células se congelaron en solución reguladora de lisis. El contenido de cAMP y la actividad de la PKA se midieron con paquetes comerciales (Cayman Chemical, EUA). Se pueden utilizar
20 procedimientos de biología molecular estándar para medir la expresión de los genes Rxfp1 y aqp2 en células del CCMI. Con el fin de evaluar la localización intracelular de la AQP2, las células del CCMI se fijaron en PFA al 4% después del tratamiento y se incubaron con un anticuerpo anti-AQP2 y un suero de cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 488, que es un anticuerpo secundario, para visualizar la proteína AQP2. Cada experimento se repitió tres veces, con triplicados por cada muestra individual (n = 9). La translocación de las vesículas que contienen AQP2 a sus sitios de acción en la membrana celular apical, se pueden detectar porque hay una mayor fluorescencia en la periferia de la célula.

Ejemplo 4

Relaxina, Vasopresina y Regulación de AQP2 en el Riñón

35 La relaxina puede actuar en el riñón independientemente de la vasopresina, para regular la AQP2 y la producción de orina concentrada. Para los métodos de análisis, véase el Ejemplo 2 (supra). Las ratas Brattleboro homocigotas (di/di) presentan diabetes insípida nefrogénica (DIN) grave causada por su incapacidad de producir AVP. Estas excretan grandes cantidades de orina diluida y beben copiosamente para reemplazar esta pérdida de agua. Debido a que no tienen AVP, existe una reducción significativa de la AQP2 en el conducto colector. El tratamiento de estos
40 animales con AVP les hace posible concentrar su orina al incrementar la translocación de la AQP2 hacia la membrana apical. Sin embargo, los reportes en la literatura técnica sugieren que las ratas Brattleboro pueden concentrar su orina sin AVP, especialmente después de la privación de alimentos. Si la relaxina puede regular la AQP2 independientemente de la AVP, entonces el tratamiento con relaxina en ratas Brattleboro se esperaría que incrementara la expresión de AQP2 y podría hacerlas capaces de concentrar su orina. Para contrastar esta hipótesis, los inventores utilizaron el protocolo experimental señalado en la Figura 5, la cual muestra el período de
45 infusión de relaxina y de control (solución salina). Específicamente, las ratas Brattleboro (6 F y 6 M de 3-4 meses de edad) fueron preparadas en jaulas metabólicas específicas para ratas durante dos períodos de 24h, con alimentos y agua. A estos animales se les implantaron minibombas osmóticas Azlet para administrar ya sea 4 μ g/h de relaxina H2 humana, o bien, solución salina durante 72h. Esta tasa de infusión incrementa GFR y ERPF y disminuye la osmolaridad del plasma en ratas Long Evans. Los controles para este estudio fueron ratas Long Evans de igual edad. La masa corporal, el consumo de agua y alimento, el desecho de heces y orina, se midieron en los puntos de tiempo que se muestran en la Figura 5. Las muestras de orina se analizaron con respecto a electrolitos y urea, por espectrofotometría. La osmolaridad se midió mediante la depresión del punto de congelamiento. Una reducción en la excreción de orina y la osmolaridad plasmática en respuesta a la relaxina, indicarían una mejoría en los mecanismos
50 de concentración de orina del riñón. El aumento de expresión de AQP2 sugeriría que la acción de la relaxina sobre las acuaporinas es independiente de la vasopresina.

Ejemplo 5 (comparativo)

La Relaxina Reduce el Edema Cerebral en Ratones

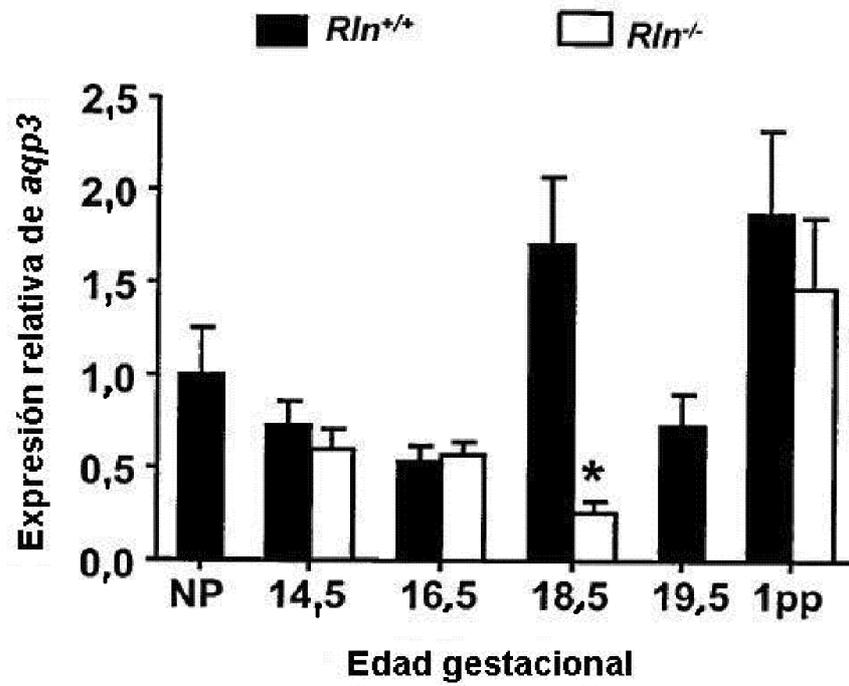
Se presenta edema cerebral vasogénico cuando hay un rompimiento de las uniones en las células endoteliales vasculares de la barrera hematoencefálica. Esto conduce a la entrada de grandes cantidades de proteína y fluidos plasmáticos hacia los espacios extracelulares del tejido nervioso y una acumulación excesiva de agua en el cerebro. El movimiento de agua transcelular mediado por AQP4 es crucial para la depuración de fluidos en el edema cerebral vasogénico (Papadopoulos et al. (2004) FASEB Journal 18: 1291-1293). Por lo tanto, el incremento en la regulación por incremento de la AQP4 en el cerebro podría ser una opción terapéutica novedosa en el edema cerebral vasogénico. Con base en el incremento de la expresión de AQP4 en mamíferos tratados con relaxina, en el riñón (véase el Ejemplo 2, (supra)), los inventores contemplan que el tratamiento con relaxina también podría incrementar la expresión de AQP4 en el cerebro. Para contrastar esta hipótesis, ratas macho recibieron implantes de minibombas osmóticas Azlet y una cánula de infusión cerebral para administrar de 50 a 500 ng de relaxina H2 humana o solución salina, durante 24 ó 72 horas. Estas dosis de relaxina y esta tasa de infusión incrementan la conducta de beber agua y la vasopresina plasmática en ratas. Se obtuvo tejido cerebral de la corteza, del tallo y del cerebelo, y se analizaron la expresión del gen *aqp4* y de la proteína AQP4 por RCP cuantitativa, inmunohistoquímica y análisis de inmunoelectrotransferencia tipo Western (Western blot).

El tratamiento con relaxina en ratones y ratas incrementó la expresión de AQP4 en la región medular (la cual incluye la papila) del riñón (Figuras 10 y 11). Aquí, los inventores proponen que la relaxina actúa en el cerebro para incrementar la expresión de AQP4 y de esta manera reducir el edema cerebral. En ratones carentes de AQP4 (*Aqp4*^{-/-}), la inflamación cerebral se redujo después de la intoxicación con agua y de la isquemia cerebral focal, en comparación con ratones normales (Manley et al., (2000) Nature Medicine 6: 159-163). Si la relaxina regula por incremento la AQP4 de manera similar a la demostrada en el riñón, los inventores predicen que el tratamiento con relaxina en modelos animales de edema vasogénico, incrementaría la expresión de AQP4 en el cerebro y aceleraría la eliminación del fluido del edema del parénquima cerebral (Papadopoulos et al., (supra)). Para contrastar esta hipótesis, los inventores pueden infundir fluido isotónico en el parénquima cerebral para producir edema vasogénico. Específicamente, se colocaron ratas anestesiadas en un marco estereotáxico y se insertó una microaguja de vidrio de borosilicato (diámetro de la punta ~100 μm) unida a una jeringa de 250 μL , en el parénquima cerebral. Se infundió fluido isotónico conteniendo solución salina al 0,9% o relaxina, a una tasa de 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 1-6 horas. En ratones *Aqp4*^{-/-}, hubo un significativo incremento en el contenido de agua del parénquima cerebral, dentro de un período de 1 hora (Papadopoulos et al., (supra)). Al final del período de infusión, las ratas fueron sacrificadas y se extirparon los cerebros para el análisis del contenido de agua y la expresión de AQP4 en la corteza cerebral, tallo cerebral y cerebelo. Si se encuentra que la relaxina incrementa la expresión de AQP4 en las ratas tratadas, sería probable que también previniera la acumulación de agua en el parénquima cerebral y redujera el edema vasogénico.

Varias modificaciones y variaciones de la presente invención serán evidentes para los técnicos en la materia, sin apartarse del espíritu y los alcances de la misma. Aunque la invención fue descrita en relación con modalidades específicas preferidas, debe entenderse que las reivindicaciones no se limitan únicamente a tales modalidades específicas.

REIVINDICACIONES

1. Una relaxina farmacéuticamente activa para su uso como un medicamento para el tratamiento de diabetes nefrogénica insípida en un sujeto que lo necesite.
- 5 2. Relaxina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la relaxina se administra a un sujeto humano en una cantidad efectiva para reducir la excreción crónica de orina diluida en el sujeto humano.
3. Relaxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la administración de relaxina conduce a una reducción en la frecuencia de la micción, una disminución en el volumen de orina de 24 horas, una medición de seguimiento de la osmolaridad de la orina y/o el alivio del paciente de la sed intensa.
- 10 4. La relaxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha relaxina se administra para mantener una concentración sérica de 1ng/ml a 100ng/ml en el sujeto mamífero.
5. Relaxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relaxina se administra para mantener una concentración sérica de 10 ng/ml en el sujeto humano.
6. Relaxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relaxina se administra a una tasa de infusión subcutánea en el rango de 3 mg/kg/día a 150 mg/kg/día.
- 15 7. Relaxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relaxina se administra a una tasa de infusión subcutánea en el rango de 30 mg/kg/día.
8. Relaxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relaxina pueda administrarse crónicamente por inyección subcutánea intermitente o una bomba subcutánea.
- 20 9. Relaxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que a relaxina se puede administrar de manera continua durante al menos 24 horas.
10. Relaxina para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que una reducción en la excreción de orina diluida asociada con la DIN, se puede medir dentro de un periodo de 24 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con placebo.
- 25 11. Relaxina para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que una reducción en la excreción de orina diluida asociada con la DIN en el sujeto humano, se puede medir dentro de un periodo de 4 a 6 horas después de establecido el tratamiento con relaxina, en comparación con un tratamiento con placebo.
12. Relaxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que relaxina se administra a un sujeto humano en una cantidad efectiva para modificar la expresión de acuaporina y la localización celular en el tejido renal en el sujeto humano.
- 30 13. Relaxina para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la acuaporina es acuaporina 2 (AQP2), acuaporina 3 (AQP3) y/o acuaporina 4 (AQP4).
14. Relaxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha relaxina es relaxina H2.



* significativamente menor ($P < 0,05$) frente a *Rln*^{+/+}

Fig. 1

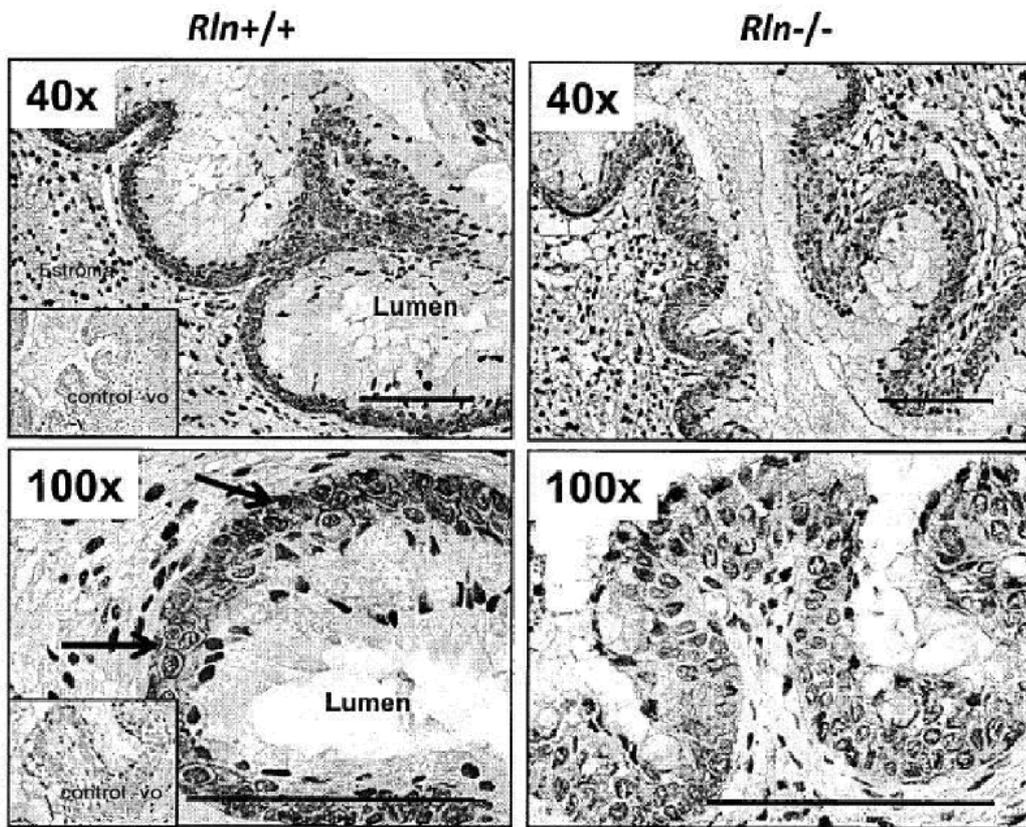
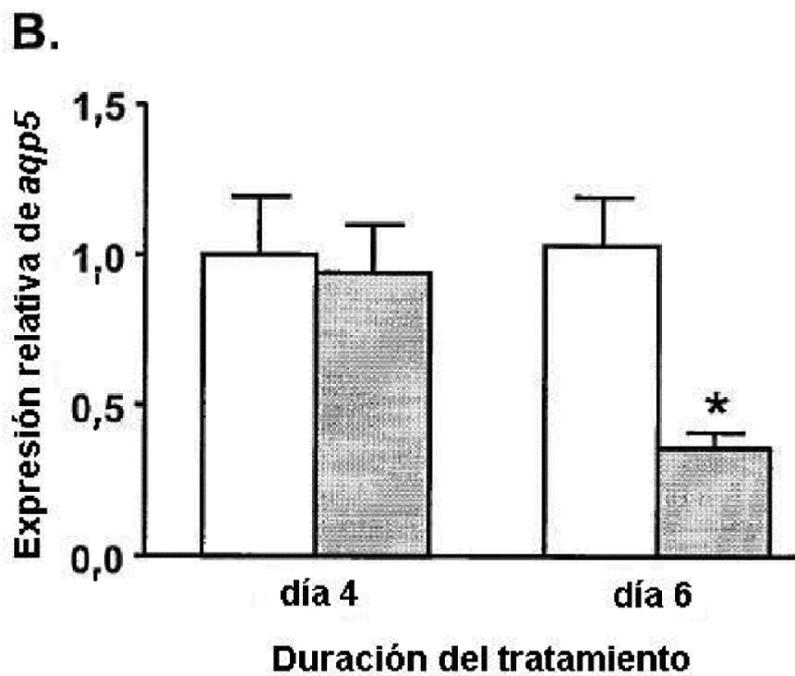
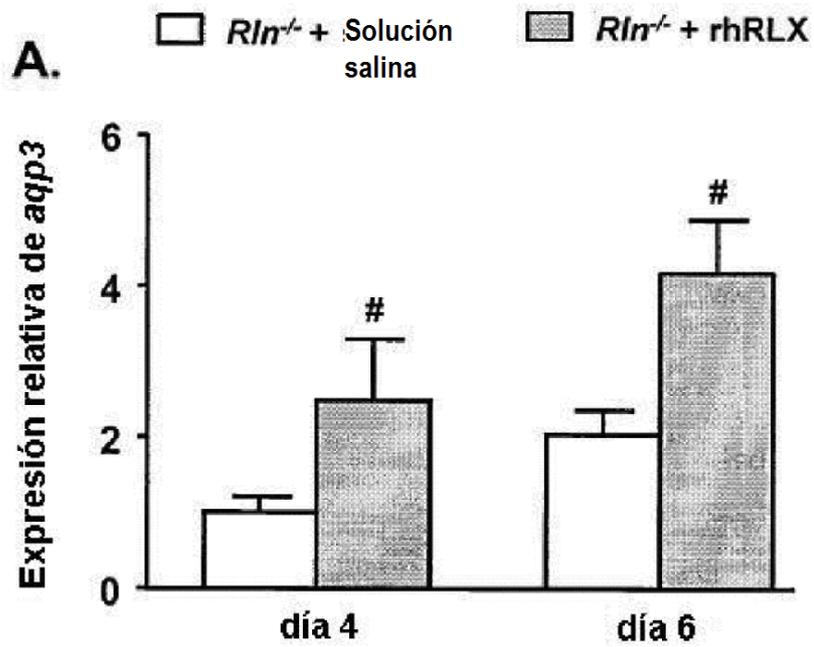


Fig. 2



significativamente mayor ($P < 0,05$) frente a soln. salina

* significativamente menor ($P < 0,05$) frente a soln. salina

Fig. 3

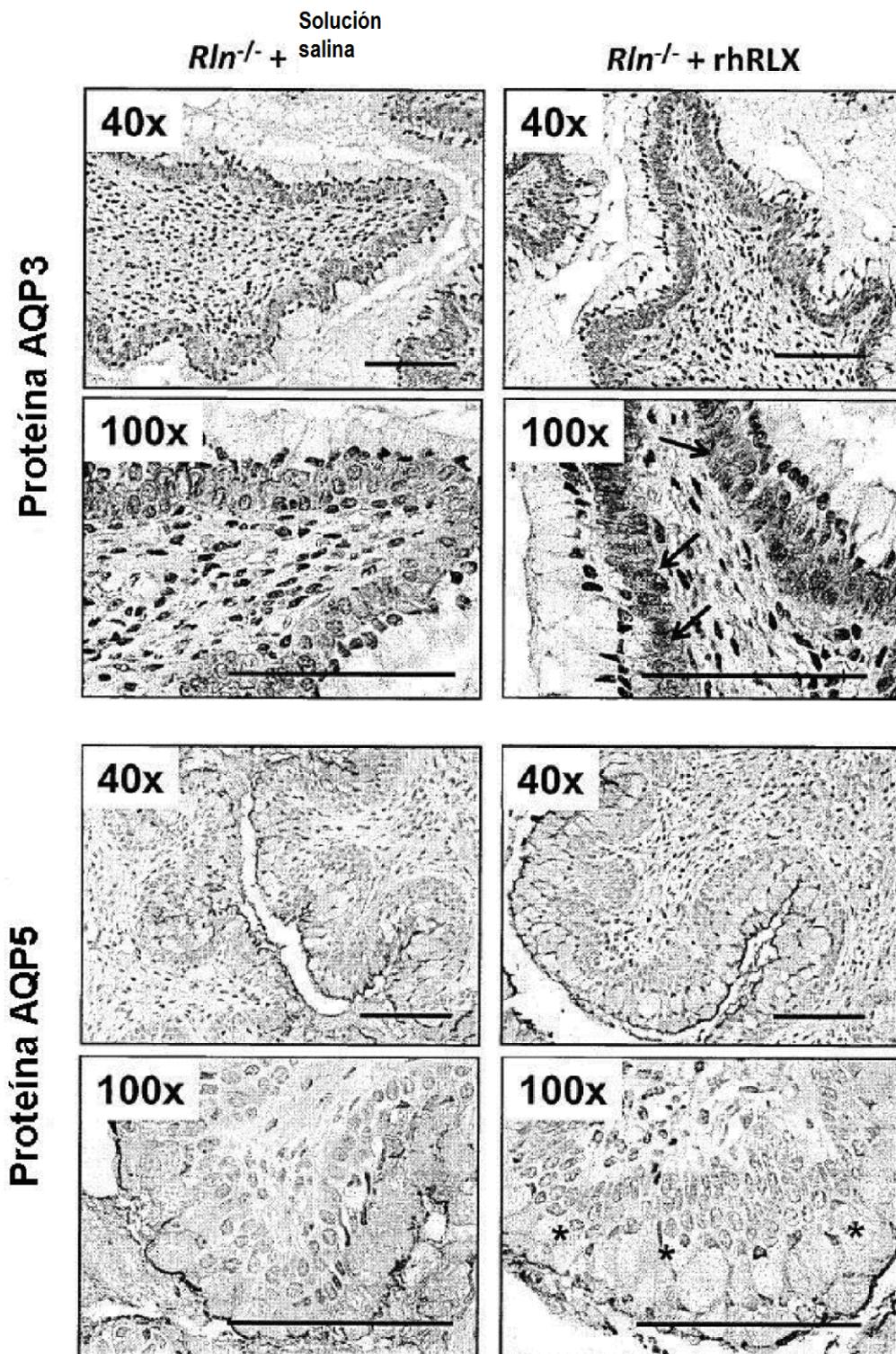


Fig. 4

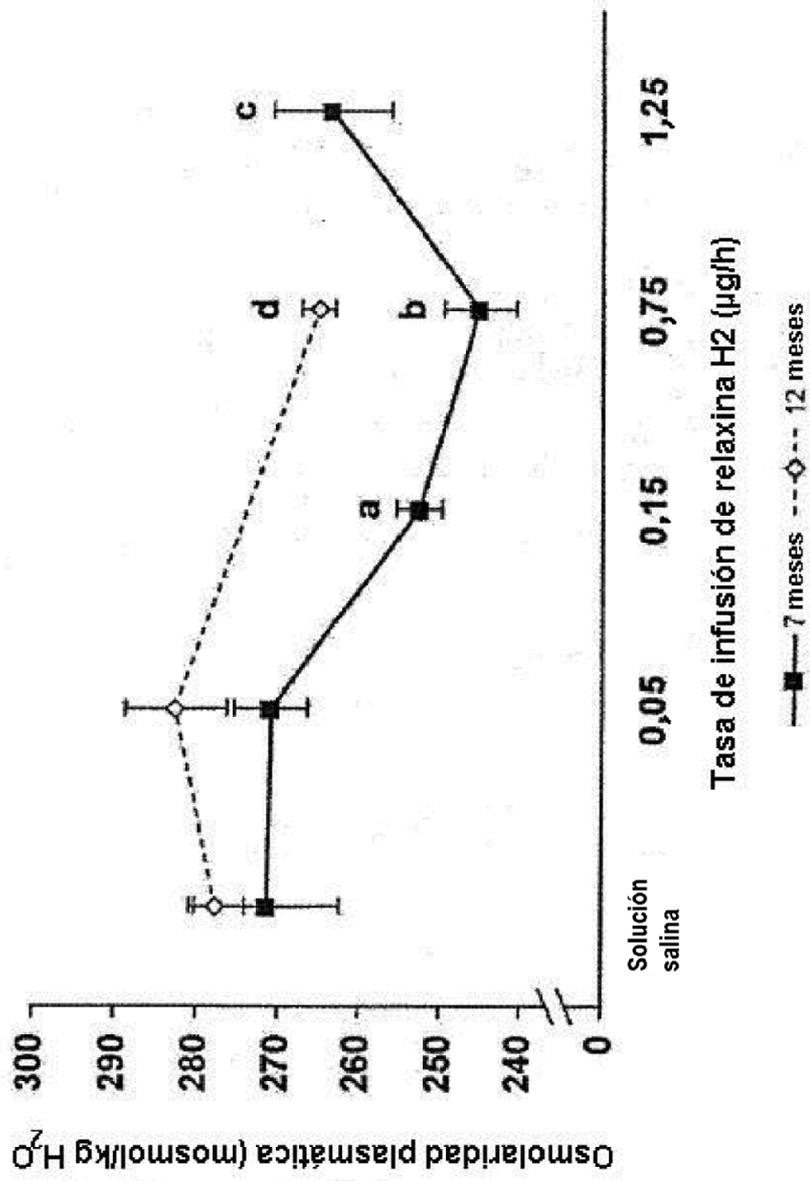
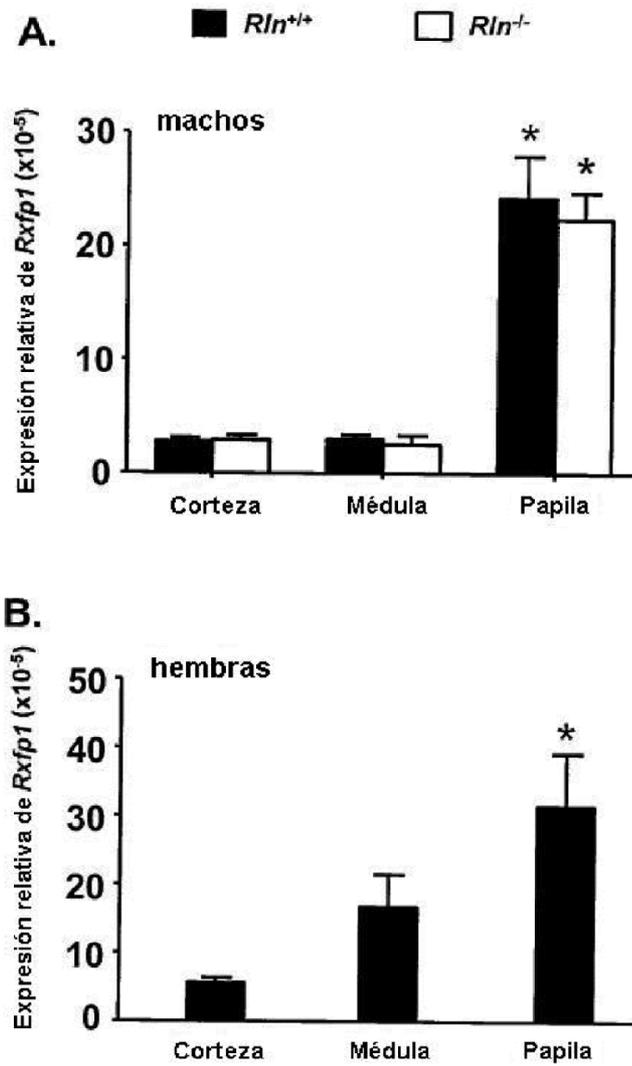


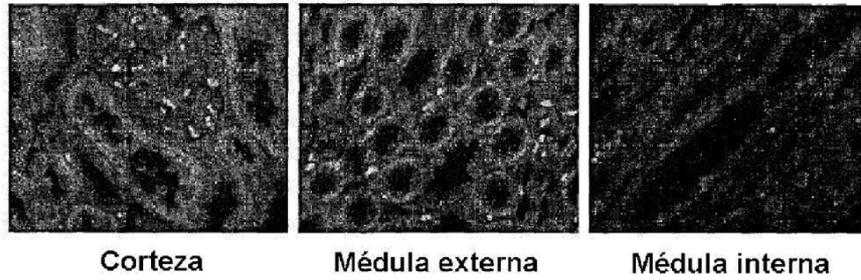
Fig. 5



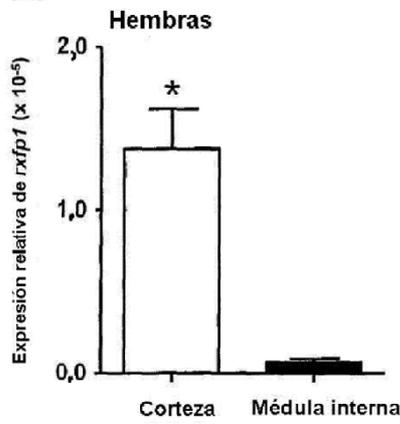
* significativamente mayor ($P < 0,05$) frente a corteza y médula

Fig. 6

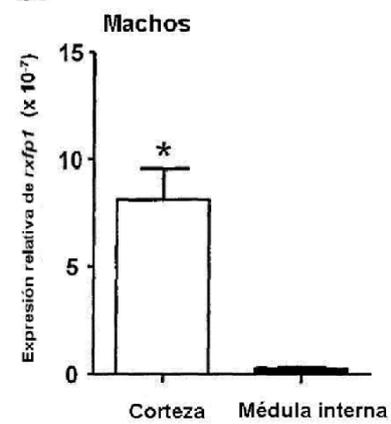
A.



B.

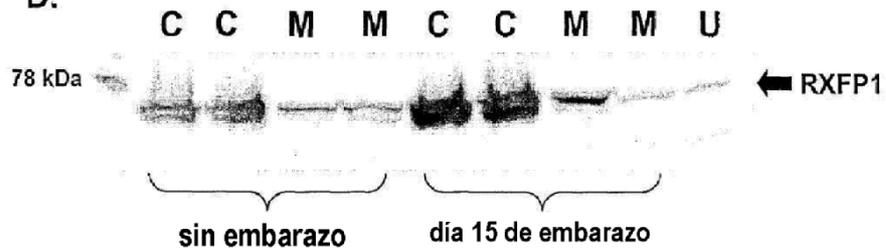


C.



* significativamente mayor ($P < 0,05$) frente a médula interna

D.



C = corteza, M = médula interna, U = útero (control positivo)

Fig. 7

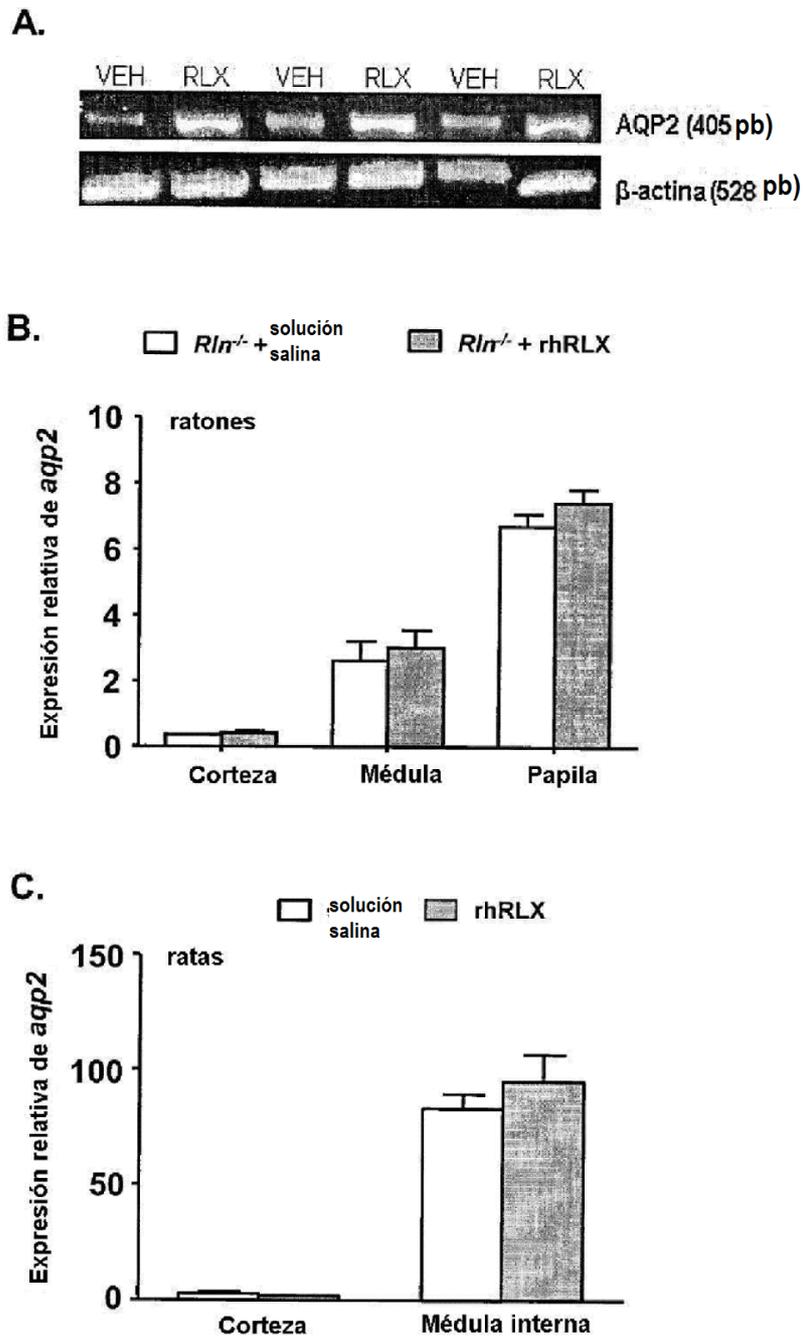
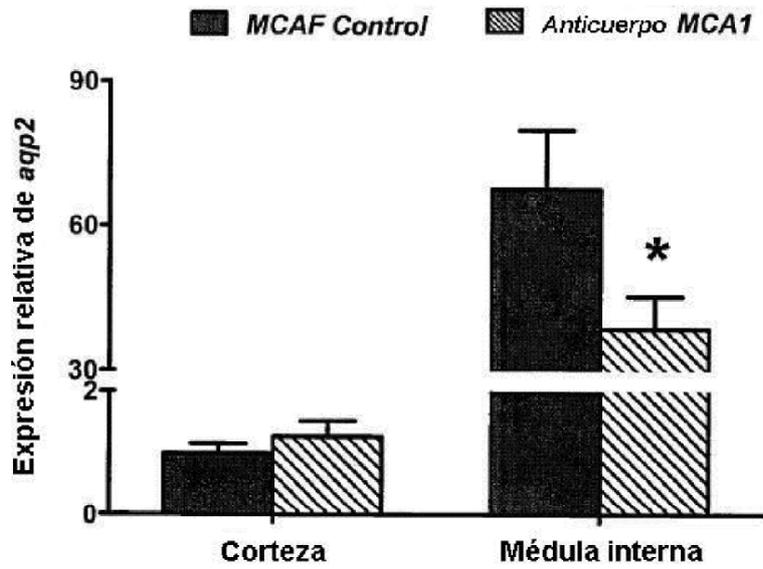
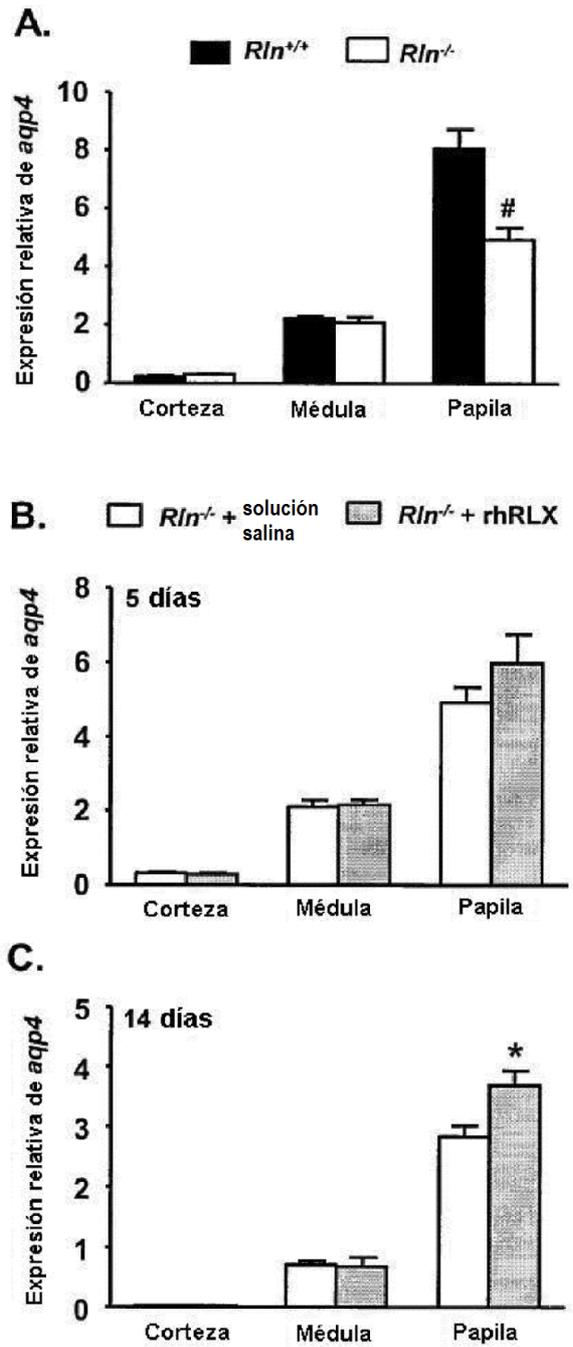


Fig. 8



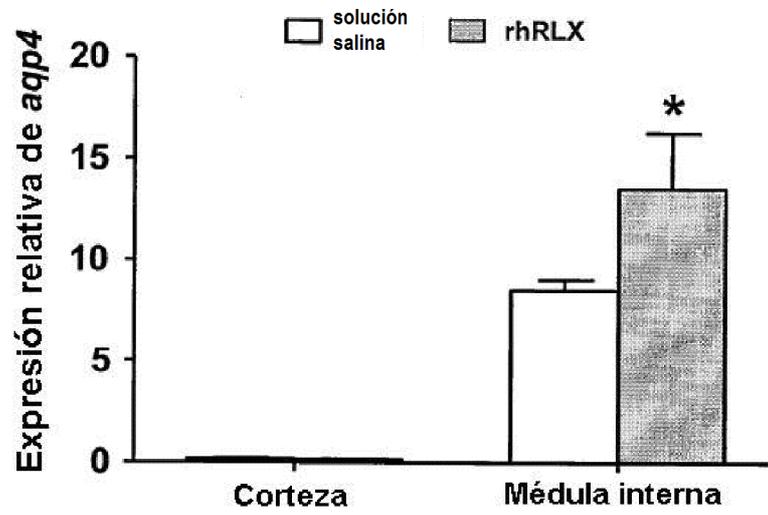
* significativamente menor ($P < 0,05$) frente a MCAF control

Fig. 9



significativamente menor ($P < 0,05$) frente a *Rln*^{-/-}
 * significativamente mayor ($P < 0,05$) frente a soln. salina

Fig. 10



* significativamente mayor ($P < 0,05$) frente a soln. salina

Fig. 11