

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 302**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/765** (2006.01)

**A61P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2008** E 13183738 (7)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016** EP 2719389

54 Título: **Composiciones y procedimientos de tratamiento y prevención de deficiencias de músculo esquelético**

30 Prioridad:

**17.12.2007 US 14304 P**

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

**19.12.2016**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (50.0%)  
1600 Huron Parkway, 2nd Floor  
Ann Arbor, MI 48109-2590, US y  
PHRIXUS PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NG, RAINER;  
METZGER, JOSEPH M.;  
REEVE, LORRAINE y  
MARKHAM, BRUCE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 594 302 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos de tratamiento y prevención de deficiencias de músculo esquelético

### **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas:**

5 La presente solicitud reclama la ventaja de prioridad con respecto a la solicitud provisional de patente de Estados Unidos N°. 61/014.304, en tramitación, presentada el 17 de diciembre de 2007.

### **Declaración con respecto a la investigación o desarrollo patrocinado con fondos federales**

La presente invención se realizó con apoyo del gobierno con la subvención n° AG015434, otorgada por el National Institutes of Health. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

### **Campo de la invención**

10 La presente invención se define en las reivindicaciones y refiere a composiciones y procedimientos para tratar y prevenir deficiencias de músculo esquelético. En particular, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden poloxámeros (p. ej., poloxámero 188 - P188) y a procedimientos de uso de las mismas para tratar y prevenir deficiencias y lesiones de músculo esquelético (p. ej., músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$  y

15 músculo esquelético que tiene microdesgarros).

### **Antecedentes de la invención**

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad genética ligada al cromosoma X causada por una mutación en el gen de la distrofina. Como resultado, los músculos de pacientes con DMD carecen de distrofina, una proteína de 427 kDa localizada en la superficie citoplasmática de la membrana plasmática, el sarcolema, de las

20 fibras musculares (véase, por ejemplo, Blake DJ, y col., (2002) *Physiol Rev* 82, 291-329). La distrofina es necesaria para el ensamblaje del complejo glicoproteico asociado a la distrofina que está incluido en el sarcolema (véase, por ejemplo, Ohlendieck K & Campbell KP (1991) *J Cell Biol* 115, 1685-1694). El complejo distrofina-glicoproteína une el citoesqueleto de la actina a la membrana basal y se piensa que proporciona estabilidad mecánica al sarcolema (véase, por ejemplo, Petrof BJ (2002) *Am J Phys Med Rehabil* 81, S162-S174). Aunque la función exacta de la

25 distrofina todavía se desconoce, la patología demostrada por los músculos esqueléticos de varones jóvenes que carecen de distrofina está clara. Los chicos jóvenes con DMD experimentan una debilidad muscular progresiva que comienza aproximadamente a los 2-5 años de edad, están en silla de ruedas a la edad de 12 años y mueren a mitad de los veinte años por insuficiencia respiratoria o cardíaca (véase, por ejemplo, Hoffman EP, y col., (1987) *Cell* 51, 919-928).

30 Existe la necesidad de nuevas composiciones y nuevos procedimientos para tratar trastornos de músculos esqueléticos en general, así como trastornos relacionados con células, tejidos y sujetos distróficos y para prevenir y/o corregir las bases subyacentes de la patogenia en sujetos con trastornos de músculo esquelético (p. ej., generalmente como en sujetos distróficos).

### **Sumario de la invención**

35 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para tratar y prevenir deficiencias de músculo esquelético. En particular, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden poloxámeros (p. ej., poloxámero 188 - P188) y a procedimientos de uso de las mismas para tratar y prevenir deficiencias y lesiones de músculo esquelético (p. ej., músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$ ; músculo esquelético que tiene

40 microdesgarros).

Los experimentos realizados durante el curso del desarrollo de las realizaciones de la presente invención demostraron que los poloxámeros eran eficaces en la reducción de deficiencias de músculo esquelético, incluidas, entre otras, músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de

45 contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$ , y/o músculo esquelético que tiene microdesgarros.

De acuerdo con lo anterior, en ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar a un sujeto con un déficit de la fuerza de contracción del músculo esquelético que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un poloxámero en condiciones tales que el déficit de la fuerza de contracción del

50 músculo esquelético mejora en el sujeto. La presente descripción proporciona procedimientos para prevenir el déficit de la fuerza de contracción del músculo esquelético en un sujeto deficiente en distrofina que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un poloxámero. La presente descripción proporciona procedimientos para reducir la concentración de calcio en músculo esquelético, que comprenden administrar en el músculo esquelético una composición que comprende un poloxámero.

Los procedimientos no están limitados a un tipo concreto de poloxámeros. En algunas realizaciones el poloxámero

puede ser un poloxámero purificado o fraccionado. En algunas realizaciones, el poloxámero es P188, P138, P237, P288, P124, P338, y/o P407. En algunas realizaciones se usan poloxaminas y/o poliglicidoles en lugar de, o junto con, poloxámeros. Los procedimientos no están limitados a un tipo concreto de sujeto. En algunas realizaciones el sujeto es un sujeto humano. En algunas realizaciones el sujeto es un sujeto no humano (p. ej., un ratón). En algunas muertes a mitad de los veinte años por insuficiencia respiratoria o cardíaca (véase, por ejemplo, Hoffman EP, y col., (1987) Cell 51, 919-928).

Existe una necesidad de nuevas composiciones y nuevos procedimientos para tratar trastornos de músculos esqueléticos en general, así como trastornos relacionados con células, tejidos y sujetos distróficos y para prevenir y/o corregir las bases subyacentes de la patogenia en sujetos con trastornos de músculo esquelético (p. ej., generalmente como en sujetos distróficos). Collins y col., 2007 [Collins y col., "Structural and functional recovery of electroporabilized skeletal muscle in-vivo after treatment with surfactant poloxamer 188", Biochemica et Biophysica Acta (Biomembranes), vol. 1768(5), Abril 11, 2007, pág. 1238-1246] divulgan los efectos de la administración de P188 en un modelo de animal con daños eléctricos y demuestran que la inyección intravenosa de P188 mejora la recuperación funcional de los músculos dañados eléctricamente. Scheuerbrandt, 2006 [Scheuerbrandt G: "Approaching therapies for boys with Duchenne muscular dystrophy." Parent Project Muscular Dystrophy. Annual Conference in Cincinnati/Ohio, 13-16 July 2006, Acta Myologica, 25(2), October 1, 2006, pp. 77-97] es un artículo de revisión de la Parent Project Muscular Dystrophy Annual Conference de 2006 que resume, entre otros, el informe de Joseph Metzger (uno de los inventores de la presente solicitud) sobre la influencia positiva del poloxámero 188 sobre la función cardíaca de ratones mdx. Scheuerbrandt, 2006 se aleja de la presente invención y, en particular, destaca que: *"Es obvio que este efecto protector del poloxámero 188 sobre músculos cardíacos podría también ser importante para la reparación de las células de músculo esquelético distrófico. Esto se ha intentado, aunque los primeros resultados no han sido tan buenos como se había esperado. La investigación sobre este abordaje está actualmente en curso y podría conducir a otra posibilidad de tratamiento para la enfermedad de Duchene."* Ryall y col., 2007 [Ryall y col.: The membrane sealant poloxamer reduces membrane permeability in tibialis anterior muscles from dystrophic mdx mice", FASEB J. 21 (6), Abril 6, 2007, pp. A945-A946] informan que P188 *"puede desempeñar un papel en el mantenimiento de la integridad del sarcolema"*. Esto se puso de manifiesto en D4 mediante la captación reducida del pigmento azul de Evans (EBD) en ratones mdx dañados y no dañados tratados con P188. No obstante, el tratamiento con P188 en Ryall y col., 2007 "no alteró la susceptibilidad a la LC (lesión inducida por contracción)" como se destaca en, entre otros lugares, la frase final del resumen. Esta falta de correlación del efecto de fuga en la membrana de P188 con cualquier reducción en la susceptibilidad a la lesión en músculo esquelético es un resultado negativo que se aleja del uso de P188 como se cita en las reivindicaciones adjuntas. El documento WO-A-2006/100017 describe el uso de idebenona para el tratamiento de distrofias musculares y tejido del músculo esquelético y/o cardiomiopatía asociada con una distrofia muscular. El documento WO-A-206/091941 describe el uso de poloxámeros para el tratamiento de enfermedad cardíaca.

Ninguno de los documentos de la técnica anterior citados anteriormente divulga, enseña o sugiere una composición que comprende un poloxámero para su uso en el tratamiento, prevención o reducción de lesión del músculo esquelético del diafragma de deficiencia de músculo esquelético del diafragma en un sujeto.

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

### **Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a composiciones y procedimientos para tratar y prevenir deficiencias de músculo esquelético. En particular, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden poloxámeros (p. ej., poloxámero 188 - P188) y a procedimientos de uso de las mismas para tratar y prevenir deficiencias y lesiones de músculo esquelético (p. ej., músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$ ; músculo esquelético que tiene microdesgarros).

Los experimentos realizados durante el curso del desarrollo de las realizaciones de la presente invención demostraron que los poloxámeros eran eficaces en la reducción de deficiencias de músculo esquelético, incluidas, entre otras, músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$ , y/o músculo esquelético que tiene microdesgarros.

De acuerdo con lo anterior, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar a un sujeto con un déficit de la fuerza de contracción del músculo esquelético que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un poloxámero en condiciones tales que el déficit de la fuerza de contracción del músculo esquelético mejora en el sujeto. La presente descripción proporciona procedimientos para prevenir el déficit de la fuerza de contracción del músculo esquelético en un sujeto deficiente en distrofina que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un poloxámero. La presente descripción proporciona procedimientos para reducir la concentración de calcio en músculo esquelético, que comprenden administrar en el músculo esquelético una

composición que comprende un poloxámero.

Los procedimientos no están limitados a un tipo concreto de poloxámeros. El poloxámero puede ser un poloxámero purificado o fraccionado. El poloxámero puede ser P188, P138, P237, P288, P124, P338, y/o P407. Las poloxaminas y/o los poliglicidoles se pueden usar en lugar de, o junto con, poloxámeros. Los procedimientos no están limitados a un tipo concreto de sujeto. El sujeto puede ser un sujeto humano o un sujeto no humano (p. ej., un ratón).

El sujeto puede ser un sujeto deficiente en distrofina. El sujeto puede tener distrofia muscular de Duchene. El sujeto puede sufrir un déficit de la fuerza de contracción del músculo esquelético. Los procedimientos no están limitados a una forma concreta de administración de la composición. La composición se puede administrar mediante administración intravenosa. La administración puede ser local (p. ej., intramuscular). Los procedimientos no están limitados a tratar un tipo concreto de músculo esquelético. Ejemplos de músculo esquelético que se pueden tratar con los procedimientos de la presente invención incluyen, entre otros, gastronemio, tibialis posterior, sóleo, largo, breve, glúteo mayor, bíceps femoral, semitendinoso, semimembranoso, iliopsoas, cuádriceps femoral, músculos aductores de la cadera, elevador de la escápula, trapecio, abdominal recto, abdominal transverso, músculo oblicuo externo del abdomen, músculo oblicuo interno del abdomen, erector de la columna, pectoral mayor, bíceps braquial, tríceps braquial, braquial, pronador redondo, braquiorradial, romboides, deltoide, latissimus dorsi, diafragma y manguito de los rotadores.

Los procedimientos no están limitados a un nivel de dosis concreto para la administración de poloxámero a un sujeto. Cabe esperar que cada dosis (p. ej., de una composición que comprende un poloxámero (p. ej., administrado a un sujeto para prevenir o tratar una deficiencia de músculo esquelético (p. ej., músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$ , músculo esquelético que tiene microdesgarros)) comprende entre 0,1 mg - 200 mg (p. ej., de 0,1 a 5000; de 0,2 a 4000; de 0,3 a 3000; de 0,4 a 2500; de 0,5 a 2000; de 0,6 a 1500; de 0,7 a 1000; de 1 a 800; de 10 a 500; de 100 a 450; de 200 a 400; de 300 a 350; etc.) de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. Cada dosis puede comprender entre 0,46 a 500 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. Cada dosis puede comprender 0,46 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. Cada dosis puede comprender 200-400 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. Cada dosis puede comprender 400 - 500 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. Cada dosis puede comprender 500-2000 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. Cada dosis puede comprender menos de 100 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. Cada dosis puede comprender más de 2.000 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. Cada dosis puede comprender 400-520 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. Cada dosis puede comprender 425-495 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. Cada dosis puede comprender 450-470 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. Cada dosis puede comprender 460 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado.

Los procedimientos no están limitados a una forma concreta de administración de poloxámero a un sujeto. Ejemplos de administración incluyen, pero sin limitarse a estos, administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, inyección intramuscular o infusión, intratecal e intraventricular.

El tratamiento y/o prevención puede disminuir la susceptibilidad a la sobrecarga de calcio en el músculo esquelético del sujeto. La disminución de la susceptibilidad a la sobrecarga de calcio en tejido de músculo esquelético del sujeto puede comprender reducir los niveles intracelulares de  $Ca^{+2}$  en el sarcolema de músculo esquelético del sujeto. La reducción de los niveles intracelulares de  $Ca^{+2}$  en el músculo esquelético puede prevenir el remodelado o invertir el remodelado del tejido de músculo esquelético en el sujeto.

La composición que comprende un poloxámero se puede coadministrar con uno o más agentes útiles en el tratamiento de deficiencias de músculo esquelético. Ejemplos de dichos agentes incluyen, entre otros, estreptomycin, prednisona, deflazacort, azatioprina, ciclosporina, ácido valproico, fenilbutirato, butirato sódico, M344, ácido suberoilánilida hidroxámico y PCT124 o una combinación de estos agentes.

La presente descripción proporciona composiciones que comprenden un poloxámero y un agente útil para el tratamiento de un déficit de la fuerza de contracción del músculo esquelético. El agente puede ser útil para el tratamiento del déficit de la fuerza de contracción del músculo esquelético y se selecciona del grupo que consiste en estreptomycin, prednisona, deflazacort, azatioprina, ciclosporina, ácido valproico, fenilbutirato, butirato sódico, M344, ácido suberoilánilida hidroxámico y PCT124 o una combinación de estos agentes. La composición puede comprender dos o más agentes útiles para el tratamiento de un déficit de la fuerza de contracción del músculo esquelético. Las composiciones no están limitadas a un tipo concreto de poloxámero. El poloxámero puede ser P188, P138, P237, P288, P124, P338, y/o P407. Las poloxaminas y/o los poliglicidoles se pueden usar en lugar de, o junto con, poloxámeros. Los procedimientos de la presente descripción no están limitados a tipos concretos de músculo esquelético. Ejemplos de músculo esquelético incluyen, pero sin limitarse a estos, al menos uno de los siguientes músculos esqueléticos: gastronemio, tibialis posterior, sóleo, largo, breve, glúteo mayor, bíceps femoral, semitendinoso, semimembranoso, iliopsoas, cuádriceps femoral, músculos aductores de la cadera, elevador de la escápula, trapecio, abdominal recto, abdominal transverso, músculo oblicuo externo del abdomen, músculo oblicuo interno del abdomen, erector de la columna, pectoral mayor, bíceps braquial, tríceps braquial, braquial, pronador

redondo, braquiorradial, romboides, deltoide, latissimus dorsi, diafragma y manguito de los rotadores.

La presente descripción proporciona composiciones que comprenden un poloxámero en contacto con un músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción del músculo esquelético. El músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción del músculo esquelético puede derivar de un sujeto deficiente en distrofina. Las composiciones no están limitadas a un tipo concreto de poloxámero. El poloxámero puede ser P188, P138, P237, P288, P124, P338, y/o P407. Las poloxaminas y/o los poliglicidos se pueden usar en lugar de, o junto con, poloxámeros. El músculo esquelético puede incluir, entre otros, al menos uno de los siguientes músculos esqueléticos: gastronemio, tibialis posterior, sóleo, largo, breve, glúteo mayor, bíceps femoral, semitendinoso, semimembranoso, iliopsoas, cuádriceps femoral, músculos aductores de la cadera, elevador de la escápula, trapecio, abdominal recto, abdominal transverso, músculo oblicuo externo del abdomen, músculo oblicuo interno del abdomen, erector de la columna, pectoral mayor, bíceps braquial, tríceps braquial, braquial, pronador redondo, braquiorradial, romboides, deltoide, latissimus dorsi, diafragma y manguito de los rotadores.

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra (A) la estructura basal de un poloxámero y (B) ejemplos de poloxámeros disponibles comercialmente útiles en composiciones y procedimientos de la presente descripción.

La Figura 2 muestra el músculo lumbrical del 2<sup>a</sup> dedo de la pata delantera de un ratón en experimentos realizados durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención. (A) Se muestra el músculo junto con una aguja hipodérmica de 30G. (b) Sección transversal teñida con hematoxilina y eosina de un músculo lumbrical silvestre antes del protocolo de contracción isométrica. Los músculos normalmente están compuestos por 200-250 fibras y tienen un diámetro de aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ . (C) músculo de *mdx* del protocolo de contracción isométrica. Las características distróficas incluyen la presencia de núcleos centrales e infiltración de células mononucleares. (D) Extremo distal de un músculo *mdx* 10 minutos después del protocolo de contracción isométrica. De las 160 fibras musculares, aproximadamente el 10% aparecen oscuros y agrandados (flechas) o desprovistos de materia celular (asteriscos). Estas anomalías son indicativas de fibras musculares hipercontraídas. (E) músculo lumbrical *mdx in-vitro* a lo largo de su eje longitudinal después protocolo de contracción isométrica. El músculo se incubó con pigmento azul de Evans y muestra la presencia de áreas de vacío inmediatamente adyacentes a las regiones hipercontraídas en las fibras musculares.

La Figura 3 muestra la producción de fuerza de músculos lumbricales silvestres y *mdx* en experimentos realizados durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención. (A) Registros del ejemplo de la producción de la fuerza isométrica. (i) indica el conjunto de un ratón WT, (ii) indica el conjunto de un ratón *mdx*. Para claridad, solo se muestran los registros de la primera (1) y la última (20) contracción isométrica. (B) producción de fuerza de músculos lumbricales WT (barras negras, n= 6) y *mdx* (barras blancas, n= 8) durante un protocolo de 20 contracciones isométricas. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM. Se realizó una prueba t de Student de una cola únicamente con la contracción número 20. El asterisco indica una diferencia con respecto al grupo WT ( $P < 0,05$ ).

La Figura 4 muestra la producción de fuerza de músculos lumbricales *mdx* al final de 20 contracciones isométricas en experimentos realizados durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA de una vía, seguida de una comparación pareada de Student-Newman-Keuls entre grupos. El asterisco indica una diferencia con respecto al grupo *mdx* sin tratar ( $P < 0,05$ )

### **Definiciones**

Como se usa en el presente documento, la expresión “signos y síntomas de una deficiencia de músculo esquelético” se refiere a signos y síntomas asociados con una deficiencia de músculo esquelético (p. ej., reconocida mediante observación simple y, cuando se combina con una actividad individual, edad y antecedentes familiares de la deficiencia de músculo esquelético, puede conducir a un diagnóstico precoz y preciso de un trastorno relacionado con la deficiencia de músculo esquelético (p. ej., DMD)). Ejemplos de signos y síntomas de una deficiencia de músculo esquelético incluyen, entre otros, un músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $\text{Ca}^{2+}$  y músculo esquelético que tiene microdesgarros. La expresión “en el que dichos síntomas se reducen” se refiere a una reducción cualitativa o cuantitativa de síntomas detectables, incluidos, entre otros, mejora de la fuerza de contracción de músculo esquelético, reducción de los desgarros de músculo esquelético, y/o mejora del equilibrio de  $\text{Ca}^{2+}$  de músculo esquelético.

Como se usa en el presente documento, la expresión “en riesgo de una deficiencia de músculo esquelético” se refiere a sujetos (p. ej., un segmento de la población mundial o animales de investigación) que tienen un mayor riesgo (es decir, sobre el sujeto promedio (p. ej., persona o animal de investigación) para una deficiencia de músculo

esquelético (p. ej., músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $\text{Ca}^{2+}$  y músculo esquelético que tiene microdesgarros) (p. ej., un sujeto con DMD) y se puede producir a cualquier edad.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión “composición terapéutica que comprende un poloxámero” se refiere a composiciones que contienen un poloxámero (p. ej., P188), o combinación de poloxámeros, usadas para el tratamiento de una deficiencia de músculo esquelético. Una composición terapéutica que comprende un poloxámero también puede comprender uno o más de otros compuestos o agentes incluidos, entre otros, estreptomycin, prednisona, deflazacort, azatioprina, ciclosporina, ácido valproico, fenilbutirato, butirato sódico, M344, ácido suberoilánilida hidroxámico y PCT124 o una combinación de estos agentes, y/u otros agentes terapéuticos, líquidos fisiológicamente tolerables, geles, vehículos, diluyentes, excipientes, salicilatos, inmunosupresores, antibióticos, aglutinantes, cargas, conservantes, agentes estabilizantes, emulsionantes y tampones.

10 Como se usa en el presente documento, los términos “huésped”, “sujeto” y “paciente” se refieren a cualquier animal, incluidos, entre otros, animales humanos y no humanos (p. ej., roedores), primates no humanos, ovinos, bovinos, rumiantes, lagomorfos, porcinos, caprinos, equinos, caninos, felinos etc.) que se estudia, analiza, prueba, diagnostica o trata (p. ej., se administra terapéutica o profilácticamente una composición que comprende un poloxámero de la presente invención). Los términos “huésped” “sujeto” y “paciente” se usan de forma intercambiable, a menos que se indique lo contrario en el presente documento.

15 Como se usa en el presente documento, las expresiones “cantidad terapéuticamente eficaz” y “cantidad eficaz”, cuando se usan en referencia a una composición que comprende un poloxámero de la presente invención, se refieren a una cantidad (p. ej., un nivel de dosificación) suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados (p. ej., que son eficaces en el tratamiento o prevención de una deficiencia de músculo esquelético). Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosis y no se pretende que esté limitada a una formulación o vía de administración concreta.

20 Como se usa en el presente documento, los términos “administración” y “que administra” se refieren a la acción de dar un fármaco, profármaco u otro agente o tratamiento terapéutico (p. ej., composiciones de la presente invención) a un sujeto (p. ej., un sujeto o células, tejidos y órganos in vivo, in vitro o ex vivo).

25 Como se usa en el presente documento, los términos “coadministración” y “que coadministra” se refieren a la administración de al menos dos agentes (p. ej., una composición que comprende un poloxámero y uno o más agentes adicionales, por ejemplo prednisona o estreptomycin) o terapias a un sujeto. En algunas realizaciones, la coadministración de dos o más agentes o terapias es concurrente. En otras realizaciones, se administra un primer agente/terapia antes de un segundo agente/terapia. Los expertos en la técnica entienden que las formulaciones y/o vías de administración de los diversos agentes o terapias usadas pueden variar. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la dosificación adecuada para la coadministración. En algunas realizaciones, cuando los agentes o terapias se coadministran, los respectivos agentes o terapias se administran a dosis menores que las adecuadas para su administración en monoterapia. Por tanto, la coadministración es especialmente deseable en las realizaciones en las que la coadministración de los agentes o terapias disminuye la dosis requerida de un agente(s) potencialmente dañino (p. ej., tóxico) y/o cuando la coadministración de dos o más agentes tiene como resultado la sensibilización de un sujeto a los efectos beneficiosos de uno de los agentes mediante coadministración del otro agente.

30 Como se usa en el presente documento, el término “tratamiento”, o sus equivalentes gramaticales, abarcan la mejora y/o inversión de los síntomas de una deficiencia de músculo esquelético. Un agente que produce una mejora en cualquier parámetro asociado con la enfermedad cuando se usa en los procedimientos de detección selectiva de la presente invención puede identificarse de este modo como un compuesto terapéutico. El término “tratamiento” se refiere a tratamiento profiláctico y/o terapéutico o medidas preventivas. Por ejemplo, los que se pueden beneficiar del tratamiento con composiciones y procedimientos de la presente invención incluyen aquéllos ya con una enfermedad y/o disfunción (p. ej., lesión muscular, DMD y/o una deficiencia de músculo esquelético), así como aquéllos en los que una enfermedad y/o disfunción se va a prevenir (p. ej., usando un tratamiento profiláctico de la presente invención).

35 Como se usa en el presente documento, la expresión “en riesgo de enfermedad o disfunción” se refiere a un sujeto (p. ej., un ser humano) que está predispuesto a experimentar una enfermedad o disfunción concreta. Esta predisposición puede ser genética (p. ej., una tendencia genética concreta a experimentar la enfermedad, tal como trastornos hereditarios) o debido a otros factores (p. ej., edad, peso, condiciones ambientales, hipertensión, nivel de actividad, síndrome metabólico etc.). Por tanto, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún riesgo concreto ni se pretende que la presente invención esté limitada a ningún tipo de trastorno o disfunción relacionado con deficiencias de músculo esquelético (p. ej., DMD).

40 Como se usa en el presente documento, la expresión “que sufre enfermedad o disfunción” se refiere a un sujeto (p. ej., un ser humano) que está experimentando una enfermedad o disfunción concreta. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún signo o síntoma concreto ni a ninguna enfermedad concreta. Por tanto, se pretende que la presente invención abarca sujetos que estén experimentando cualquier gama de enfermedades o disfunciones, de modo que el sujeto exhibe al menos algunos de los indicios (p. ej., signos y síntomas) asociados

con la enfermedad o disfunción concreta.

Los términos “compuesto” y “agentes” se refieren a cualquier entidad química, sustancia farmacéutica, fármaco y similares que se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad, patología, afección o trastorno de la función corporal. Los compuestos comprenden compuestos terapéuticos conocidos y potenciales.

- 5 Un “compuesto terapéutico conocido” se refiere a un compuesto terapéutico que se ha demostrado (p. ej., mediante ensayos con animales o experiencia previa con administración a seres humanos) que es eficaz en dicho tratamiento. En otras palabras, un compuesto terapéutico no está limitado a un compuesto eficaz en el tratamiento de enfermedad o disfunción.

**Descripción detallada de la invención**

- 10 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

- 15 El músculo esquelético es un tipo de músculo estriado, normalmente unido al esqueleto. Los músculos esqueléticos se usan para crear movimiento aplicando fuerza a los huesos y articulaciones mediante contracción. Generalmente se contraen de forma voluntaria (mediante estimulación de los nervios somáticos), aunque se puede contraer de forma involuntaria a través de los reflejos.

Las células musculares (también denominadas fibras) tienen una forma cilíndrica alargada y están multinucleadas (en vertebrados y moscas). Los núcleos de estos músculos se localizan en el lado periférico de la célula, justo debajo de la membrana plasmática, que desocupa la parte central de la fibra muscular para las miofibrillas.

- 20 Los músculos esqueléticos tienen un extremo (el “origen”) unido a un hueso más cerca del centro del eje del cuerpo y a menudo, pero no siempre, es un hueso relativamente fijo (como la escápula) y el otro extremo (la “inserción”) se une a través de una articulación a otro hueso más alejado del eje del cuerpo (tal como el húmero) La contracción del músculo hace que los huesos roten alrededor de la articulación y que los huesos se muevan unos respecto de otros (p. ej., como el levantamiento de la parte superior del brazo en el caso del origen y la inserción descritos en el presente documento).

- 25 Aproximadamente 1 de cada 3500 varones está afectado por la distrofia muscular de Duchene (DMD), mientras que la distrofia muscular de Becker (DMB) es menos frecuente, afecta a aproximadamente 1 de cada 30.000 varones. Ambas enfermedades son el resultado de mutaciones en el gen localizado en el cromosoma X, en Xp21.1, que codifica la distrofina. En la DMD, no hay distrofina mientras que en la DMB su tamaño es menor o anormal. La distrofina es una proteína estructural que participa en la organización celular en las células musculares y estimula la estabilidad de las miofibrillas y del sarcolema (membrana de las células musculares) (véase, por ejemplo, Kaprielian y Severs, 2000 Heart Failure Reviews 5: 221-238).

- 30 Descubierto en 1984, el ratón *mdx* (véase, por ejemplo, Bulfield G, y col., (1984) Proc Natl Acad Sci U S A 81, 1189-1192) carece de distrofina y es un modelo importante para estudiar los efectos de la deficiencia en distrofina. Los estudios realizados en tejido muscular del ratón *mdx* tienen alteraciones documentadas en la estructura y la función (véase, por ejemplo, Lynch GS, y col., (2001) J Physiol 535, 591-600; Head S1, y col., (1992) Proc Biol Sci 248, 163-169) que incluyen un grado elevado de susceptibilidad a los déficit de fuerza inducidos por contracción asociados con la prolongación de las contracciones (p. ej., véase, Li S, y col., (2006) Hum Mol Genet 15, 1610-1622). Dependiendo del tipo de fibra muscular y de la gravedad del protocolo productor de lesiones, los músculos esqueléticos distróficos sostienen una pérdida de fuerza que es de 2 a 7 veces mayor que la de los músculos de los ratones silvestres (WT) expuestos al mismo protocolo de prolongación de la contracción (véase, por ejemplo, Li S, y col., (2006) Hum Mol Genet 15, 1610-1622). Además, los músculos distróficos tienen un sarcolema que es más permeable a los iones extracelulares e impermeable a pigmentos (véase, por ejemplo, Yeung EW, y col., (2005) J Physiol 562, 367-380; Vandebrouck C, y col., (2002) J Cell Biol 158, 1089-1096; Petrof BJ (2002) Am J Phys Med Rehabil 81, S162-S174). Posibles vías responsables de permitir la entrada de constituyentes extracelulares normalmente excluidos al interior de las fibras musculares distróficas incluyen desgarros de micromembrana (véase, por ejemplo, Petrof BJ (2002) Am J Phys Med Rehabil 81, S 162-S 174) y mal funcionamiento de los canales iónicos (véase, por ejemplo, Yeung EW, y col., (2005) J Physiol 562, 367-380; Vandebrouck C, y col., (2002) J Cell Biol 158, 1089-1096). Estas vías permiten la entrada de calcio extracelular en las fibras musculares y tienen como resultado una elevada concentración intracelular de calcio. La elevada concentración de calcio es perjudicial para la estructura muscular y su función mediante una variedad de mecanismos dependientes de calcio (véase, p. ej., Lamb GD, y col., (1995) J Physiol 489 (Pt 2), 349-362; Verburg E, y col., (2005) J Physiol 564, 775-790). A pesar de la aceptación general de que las membranas de músculos esqueléticos distróficos son más “permeables” que los de los ratones WT (véase, por ejemplo, Yeung EW, y col., (2005) J Physiol 562, 367-380; Vandebrouck C, y col., (2002) J Cell Biol 158, 1089-1096; Petrof BJ (2002) Am J Phys Med Rehabil 81, S162-S174), no se han establecido las contribuciones relativas de los desgarros de la micromembrana y los canales iónicos con mal funcionamiento al déficit de la fuerza inducido por contracción.

La estreptomocina es un inhibidor de los canales activados por estiramiento (SAC) (véase, por ejemplo, Sokabe M, y

col., (1993) *Ann N Y Acad Sci* 707, 417-420) que reduce la magnitud de la lesión inducida por contracción en músculos distróficos (véase, por ejemplo, Yeung EW y col., (2005) *J Physiol* 562, 367-380). El poloxámero 188 (P188) es un polímero anfifílico de 8,4 kDa que sirve de parche eficaz para membranas rotas en neuronas (véase, por ejemplo, Marks JD, y col., (2001) *FASEB J* 15, 1107-1109) y miocitos cardíacos (véase, por ejemplo, Yasuda S, y col., (2005) *Nature* 436, 1025-1029). El P188 potencia la recuperación del músculo esquelético (véase, por ejemplo, Lee RC, y col., (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4524-4528), fibroblastos (véase, por ejemplo, Merchant FA, y col., (1998) *J Surg Res* 74, 131-140) y la médula espinal (véase, por ejemplo, Borgens RB, y col., (2004) *J Neurosci Res* 76, 141-154) de diversos protocolos de inducción de lesión.

Los experimentos realizados durante el curso del desarrollo de realizaciones para la presente invención investigador, por ejemplo, el uso de estreptomycin y poloxámeros, la medida en la cual los canales mecanosensibles y los desgarros de micromembrana son responsables del incremento de la susceptibilidad de los músculos distróficos a la lesión inducida por contracción. Por ejemplo, los músculos lumbricales (LMB) se trataron con estreptomycin o poloxámero 188 y después se administró un protocolo de contracción isométrica *in-vitro* que produjo un déficit de fuerza en los músculos distróficos. Se demostró que los poloxámeros eran eficaces en la reducción del déficit de fuerza inducido por contracción en un músculo esquelético completo de *mdx*. Se demostró que el tratamiento de los músculos *mdx* con estreptomycin era igualmente eficaz en la reducción del déficit de fuerza inducido por contracción, pero, probablemente, mediante, por ejemplo, un mecanismo diferente del de los poloxámeros. Estos resultados fueron inesperados. De hecho, la investigación previa indicó que los poloxámeros no podrían prevenir la rotura de la membrana inducida por ejercicio en fibras de músculo esquelético *mdx* (véase, por ejemplo, Quinlan, J.G., y col., (2006) *Neuromuscul. Disord.* 16(12) 855-864).

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona nueva información sobre la patogenia de los trastornos de músculo esquelético (p. ej., DMD y trastornos relacionados) y composiciones y procedimientos para el tratamiento y la prevención de los mismos y para usos de investigación. La presente descripción proporciona procedimientos de tratamiento de, por ejemplo, músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$  y/o músculo esquelético que tiene microdesgarros (p. ej., a causa de DMD, producida por lesión inducida por ejercicio u otras causas) con un poloxámero sellador de membrana (p. ej., poloxámero 188, P188). El tratamiento con un poloxámero (p. ej., P188) puede invertir el déficit de la fuerza de contracción del músculo esquelético en músculos esqueléticos deficientes en distrofina (véase, por ejemplo, los Ejemplos I y II). El tratamiento con un poloxámero se puede usar en el tratamiento de la DMD. La presente descripción proporciona procedimientos de protección de células de músculo esquelético y de sujetos (humanos, mamíferos no humanos etc.) frente al desarrollo de músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$  y/o músculo esquelético que tiene microdesgarros mediante la administración al sujeto de un poloxámero (p. ej., P188). La descripción proporciona tratamientos para un trastorno de deficiencia de distrofina (p. ej., DMD) en un sujeto que comprende administrar (p. ej., administración intravenosa (i.v.)) al sujeto una composición que comprende un poloxámero (p. ej., P188). El sujeto puede ser cualquier sujeto que tenga o sea susceptible a sufrir una lesión inducida del músculo esquelético. Aunque no es necesario comprender el mecanismo para poner en práctica la presente invención y la presente invención no está limitada a ningún mecanismo de acción concreto, en algunas realizaciones la administración de una composición que comprende un poloxámero (p. ej., P188) produce mejoras (p. ej., inmediatas y/o sostenidas) de la función del músculo esquelético (p. ej., fuerza de contracción del músculo esquelético) debido a un sellado de los desgarros micromembranales del músculo esquelético para prevenir, por ejemplo, la entrada de calcio extracelular en las fibras musculares.

Los actuales paradigmas terapéuticos para la DMD se centran en la expresión de distrofina a través del salto de exones o de la transducción viral de distrofina truncada u otros genes (p. ej., utrofina o disferlina) que limitan las y col., *Hum Mol Genet* 11, 3333-44 (2002); Torrente y col., *J Clin Invest* 114, 182-95 (2004); Goyenville y col., *Science* 306, 1796-9 (2004)). Estas estrategias son prometedoras pero suponen un reto debido a la necesidad de apuntar a todos los músculos estriados del cuerpo. La presente invención proporciona una simple alternativa comparativa química para tratar la DMD, que comprende administrar a un sujeto con DMD una composición que comprende un poloxámero. Aunque no es necesario comprender el mecanismo para poner en práctica la presente invención y la presente invención no está limitada a ningún mecanismo de acción concreto, en algunas realizaciones la administración de un poloxámero tiene como resultado la estabilización y/o reparación aguda de la membrana.

Como se demuestra en el presente documento (p. ej., en modelos de ratones de DMD, véanse los ejemplos I y II), la administración de un poloxámero proporciona una mejora fácil e inmediata para el músculo esquelético. En la actualidad, el P188 está en ensayos clínicos de fase III para el tratamiento de crisis vasooclusivas en pacientes con drepanocitosis que recientemente han demostrado la seguridad y la inocuidad del P188 en seres humanos (véase, por ejemplo, Adams-Gravcs y col., *Blood* 90, 2041-6 (1997)). No obstante, al contrario que el curso episódico de la drepanocitosis, la DMD es una enfermedad progresiva y el tratamiento eficaz con poloxámero, en algunas realizaciones, usa administración intravascular crónica. Por tanto, la presente invención usa poloxámeros de sellado de membrana que representan una clase nueva de agentes terapéuticos para prevenir o limitar los daños progresivos en la DMD y para tratar las deficiencias de músculo esquelético como se define en las reivindicaciones.

La presente invención no está limitada a ningún poloxámero concreto para su uso en la estabilización de la membrana de músculos esqueléticos en sujetos (p. ej., aumentando de este modo la distensibilidad celular y

mejorando la función del músculo esquelético). En algunas realizaciones preferidas se usa P188 (p. ej., en una composición (p. ej., una composición farmacéutica) de la presente invención). La presente invención no está limitada al uso de P188. De hecho, cualquier poloxámero que posea características y rasgos similares (p. ej., efectos biológicos) a las de P188 encuentra uso en la presente invención, incluyendo, entre otros, P138, P237, P288, P124, P338 y P407.

P188 es uno de una familia de moléculas de poloxámero desarrolladas inicialmente por BASF en la década de 1950. Es un copolímero tribloque no iónico fabricado con poli(óxido de etileno)<sub>80</sub>-poli(óxido de propileno)<sub>30</sub>-poli(óxido de etileno)<sub>80</sub> (masa molecular ≈ 8,4 kDa). La molécula tiene varios nombres, incluidos PLURONIC F68, RheothRx y FLOCOR.

Los poloxámeros (también denominados polímeros de bloque PLURONIC disponibles en BASF Corp., Wyandotte, MI) comprenden, generalmente, bloques de óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO) dispuestos en una estructura básica A-B-A. EO -PO -EO. Esta disposición tiene como resultado un copolímero anfifílico en el que el número de unidades EO<sub>(x)</sub> hidrofílicas y de PO<sub>(y)</sub> hidrofóbicas se puede alterar (véase, por ejemplo, Reeve, pgs. 231-249, in Handbook of Biodegradable Polymers, Harwood Academic Pub., Eds. Domb y col., (1997)). La estructura básica de varios poloxámeros se muestra en la Fig. 1A. En la FIG 1B se muestra una lista de copolímeros PLURONIC seleccionados disponibles en BASF Corp. Los copolímeros con varios valores de x and y se caracterizan por un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) distinto. Los poloxámeros se pueden sintetizar mediante adición secuencial de monómeros de PO y EO en presencia de un catalizador alcalino, tal como hidróxido sódico o potásico (véase, por ejemplo, Schmolka, J. Am. Oil Chem. Soc. 54 (1977) 110-116). La reacción se inicia mediante polimerización del bloque de PO, seguida del crecimiento de las cadenas de EO en ambos extremos del bloque de PO. La polimerización aniónica normalmente produce polímeros con un índice de polidispersión (*M/M*) relativamente bajo.

En algunas realizaciones, una composición que comprende un poloxámero de la presente invención comprende un poloxámero purificado y/o fraccionado (p. ej., purificado y/o fraccionado usando filtración en gel o fraccionamiento cromatográfico (véase, por ejemplo, Emanuele y col., Expert Opin Investig Drugs. 1998; 7:1193-20, las patentes de EE.UU. N° 6.977.045 y 6.761.824). En algunas realizaciones se usan poloxámeros que tienen mezclas (p. ej., mezclas de homopolímero de PO y/o copolímero de bloque) eliminadas. En algunas realizaciones se usa un poloxámero (p. ej., copolímero de polioxipropileno/polioxietileno) que está optimizado para una mejor actividad biológica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.747.064). En algunas realizaciones se usan formas químicamente modificadas de uno o más poloxámeros en las composiciones y procedimientos de la presente invención. Las modificaciones químicas de poloxámeros incluyen, entre otros, radiomarcaje, acetilación, biotilación, adición de un fluoróforo y otras modificaciones químicas.

En la presente invención se pueden usar diversos poloxámeros en (p. ej., en una composición que comprende un poloxámero) que poseen características y rasgos similares (p. ej., efectos biológicos) con los de P188 (p. ej., en base a las características descritas en la FIG. 1b). Estos poloxámeros incluyen, entre otros, P138, P237, P288, P124, P338 y P407. En algunas realizaciones, se usa un poloxámero con un peso molecular de entre 5.000 y 9.000 dalton (p. ej., en una composición (p. ej., una composición farmacéutica) de la presente invención). En algunas realizaciones, se usa un poloxámero con un peso molecular de entre 9.000 y 12.000 dalton (p. ej., en una composición (p. ej., una composición farmacéutica) de la presente invención). En algunas realizaciones, se usa un poloxámero con un peso molecular de entre 12.000 y 15.000 dalton. Un poloxámero con un peso molecular inferior a 5.000 o superior a 15.000 dalton puede encontrar uso en la presente invención (p. ej., en una composición (p. ej., una composición farmacéutica) de la presente invención).

En algunas realizaciones, se usa un poloxámero con un contenido en polioxietileno superior al 50% (p. ej., en una composición (p. ej., una composición farmacéutica) de la presente invención). En algunas realizaciones, se usa un poloxámero con un contenido en polioxietileno de entre 50 y 60%. En algunas realizaciones, se usa un poloxámero con un contenido en polioxietileno de entre 60 y 70%. Los poloxámeros con un contenido en polioxietileno inferior al 50% y superior al 70% también pueden encontrar uso en la presente invención (p. ej., en una composición (p. ej., una composición farmacéutica) de la presente invención).

Algunos usos biológicos comunes de P188 incluyen el uso como ablandador de heces en varios laxantes disponibles comercialmente, como ingrediente en cosméticos y como emulsionante para agentes farmacéuticos. Es un potente tensioactivo. Se ha demostrado que el P188 se inserta en monocapas lipídicas (véase, por ejemplo, Maskarinec y col., 2002 Biophys. J. 82: 1453-1459). Tiene muchos efectos biológicos *in vivo*, incluyendo la reparación de membranas celulares dañadas eléctricamente (véase, por ejemplo, Lee y col., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4524-4528), en liberación controlada de fármacos, para sensibilizar tumores a la quimioterapia (véase, por ejemplo, Kabanov y col., Adv Drug Deliv Rev 2002, 54, 759-779), y para la liberación de terapias génicas, entre otros. Adicionalmente, se demostró que el P188 tiene un efecto sobre el flujo sanguíneo y la viscosidad así como la agregación plaquetaria. (véase, p. ej., Grover y col., (1969) Circ. 39 and 40: I249, (Suppl. I)). Se desarrolló como agente terapéutico con el nombre de RheothRx de Glaxo Wellcome (véase, por ejemplo, Adams-Graves y col., (1997), Blood 90: 2041-2046) y por CytRx con el nombre de FLOCOR para crisis vasooclusivas en la drepanocitosis y ha estado en ensayos clínicos de fase III (véase, por ejemplo, Emanuele, (1998) Expert Opin. Investig. Drugs 7:1193-1200). También estaba en ensayos de fase III para evaluar la actividad trombolítica en pacientes con infarto

de miocardio agudo (IM) (CORE) con resultados mixtos (Schaer y col., (1996) Circ. 94: 298-307; Chareonthaitawe y col., (2000) Heart 84: 142-148). Ha estado en ensayos de fase II como auxiliar de la angioplastia coronaria transluminal percutánea primaria para el IM agudo (véase, por ejemplo, O'Keefe, y col., 1996 Am. J. Cardiol. 78: 747-750). Por tanto, la presente invención contempla el uso de poloxámeros (p. ej., P138, P237 y P288) que disfrutan de características y efectos biológicos similares a los de P188 (p. ej., para tratar y/o prevenir deficiencias de músculo esquelético (p. ej., músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$  y músculo esquelético que tiene microdesgarros).

El P188 es seguro cuando se administra de forma aguda durante hasta 72 horas (véase, por ejemplo, Adams-Graves y col., (1997), Blood 90: 2041-2046) y es bien tolerado por niños y adultos tras la exposición repetida (véase, por ejemplo, Gibbs y Hagemann, 2004 Ann. Pharmacother. 38: 320-324). El efecto adverso más significativo en estudios con RheothRx fue la disfunción renal, pero esto no se ha visto con la forma más purificada FLOCOR. Los efectos adversos más experimentados fueron dolor, anomalías en el sitio de la inyección y náuseas. Tiene una semivida en plasma de 7,5 horas en roedores y 18 horas en sujetos humanos. Se ha demostrado en estudios farmacocinéticos que se metaboliza <5% del poloxámero purificado. Se ha detectado un único metabolito de mayor peso molecular y aclaramiento más lento (véase, por ejemplo, Gibbs y Hagemann, 2004 Ann. Pharmacother. 38: 320-324). El aclaramiento renal es la vía principal de eliminación.

La presente invención proporciona que una composición que comprende un poloxámero (p. ej., P188) se puede usar como tratamiento de primera clase para deficiencias de músculo esquelético (p. ej., músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$  y músculo esquelético que tiene microdesgarros). En algunas realizaciones, una composición que comprende un poloxámero (p. ej., P188) proporciona beneficios aditivos o sinérgicos cuando se administran con una o más composiciones (p. ej., sustancias farmacéuticas, fármacos etc.), (p. ej. estreptomycin) usadas en la actualidad para tratar la DMD (p. ej., prednisona, deflazacort, azatioprina, ciclosporina, ácido valproico, fenilbutirato, butirato sódico, M344, ácido de suberoilánilida hidroxámico y PCT124).

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se usan para prevenir la entrada de calcio extracelular en el músculo esquelético a través de, por ejemplo, sellado de desgarros micromembranales del músculo esquelético. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición que comprende un poloxámero de la presente invención se puede usar para aumentar la distensibilidad celular y la disminuir el  $Ca^{2+}$  intracelular para controlar los niveles en músculo esquelético inestable. Aunque no es necesario comprender el mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no está limitada a un mecanismo de acción concreto, en algunas realizaciones el tratamiento del músculo esquelético inestable con una composición que comprende un poloxámero de la presente invención (p. ej., administrando al músculo esquelético una composición que comprende un poloxámero) altera (p. ej., neutraliza el efecto perjudicial y/o reconstituye (p. ej., repara)) pequeños desgarros en el sarcolema.

La presente invención no está limitada por el tipo de deficiencia de músculo esquelético tratada (p. ej., músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$  y músculo esquelético que tiene microdesgarros). De hecho, cualquier músculo esquelético que comprende la entrada indeseable de calcio extracelular en músculo esquelético a través de, por ejemplo, pequeños desgarros en el sarcolema, se puede tratar con las composiciones y procedimientos de la presente invención. En algunas realizaciones, los pequeños desgarros en el sarcolema son el resultado de una deficiencia en distrofina.

La presente invención no está limitada por el tipo de sujeto al que se le administra una composición de la presente invención. De hecho, se contempla una amplia variedad de sujetos que se van a beneficiar de la administración de una composición de la presente invención. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, los sujetos humanos tienen cualquier edad (p. ej., adultos, niños, lactantes etc.) que sufren o es probable que sufran unas deficiencias de músculo esquelético (p. ej., músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$  y músculo esquelético que tiene microdesgarros) (p. ej., un sujeto con DMD). En algunas realizaciones, los sujetos son mamíferos no humanos (p. ej., cerdos, ganado vacuno, cabras, caballos, ovejas u otro ganado, o ratones, ratas, conejos u otro animal de uso habitual en investigación).

La presente invención no está limitada a un tipo concreto de músculo esquelético que se va a tratar con una composición de la presente invención. Son aproximadamente 639 músculos esqueléticos en el cuerpo humano (véase, por ejemplo, Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice, 39ª edición (2004)), cada uno de los cuales se puede tratar con las composiciones de la presente invención. Ejemplos de músculo esquelético que tiene una deficiencia (p. ej., músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$  y músculo esquelético que tiene microdesgarros) que se puede tratar con las composiciones de la presente invención incluyen, entre otros, al menos uno de los siguientes músculos esqueléticos: gastronemio, tibialis posterior, sóleo, largo, breve, glúteo mayor, bíceps femoral, semitendinoso, semimembranoso, iliopsoas, cuádriceps femoral, músculos aductores de la cadera, elevador de la escápula, trapecio, abdominal recto, abdominal transverso, músculo oblicuo externo del abdomen, músculo

oblicuo interno del abdomen, erector de la columna, pectoral mayor, bíceps braquial, tríceps braquial, braquial, pronador redondo, braquiorradial, romboides, deltoide, latissimus dorsi y manguito de los rotadores.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas (p. ej., que comprenden un poloxámero descrito en el presente documento). Una composición que comprende un poloxámero de la presente invención se puede usar terapéuticamente (p. ej., para corregir el músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $\text{Ca}^{2+}$  y músculo esquelético que tiene microdesgarros) o como prolifáctico (p. ej., para prevenir que el músculo esquelético tenga un déficit de la fuerza de contracción, que el músculo esquelético tenga un desequilibrio de  $\text{Ca}^{2+}$  y que el músculo esquelético tenga microdesgarros). Una composición que comprende un poloxámero de la presente invención se puede administrar a un sujeto mediante una serie de diferentes vías y procedimientos de liberación.

En realizaciones preferidas, una composición que comprende un poloxámero de la presente invención se administra mediante administración intravenosa (i.v.). En algunas realizaciones, una composición de la presente invención se puede administrar una o más veces al día durante varios días. En algunas realizaciones, una composición de la presente invención se puede administrar una o más veces al día durante más de una semana. En algunas realizaciones, una composición de la presente invención se puede administrar una o más veces al día durante dos o más semanas. En algunas realizaciones, una composición de la presente invención se puede administrar una o más veces al día durante uno o más meses, dos o más meses, cuatro o más meses, ocho o más meses o durante más de un año. En realizaciones preferidas, se administra una composición de la presente invención (p. ej., mediante administración crónica (p. ej., se administra una, dos, tres o más veces a la semana en la consulta de un médico durante (p. ej., en un periodo de semanas, meses o años) que es suficiente para mejorar la contracción del músculo esquelético (p. ej., disminuyendo y manteniendo los niveles de calcio en el músculo esquelético a niveles normales). La presente invención no está limitada por la administración intravenosa. De hecho, se contempla que cualquier procedimiento de administración que introduce una composición de la presente invención en la vasculatura es útil como medio de liberación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición de la presente invención se administra por vía parenteral. Ejemplos de administración parenteral incluyen, entre otros, administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, inyección intramuscular o infusión, intratecal o intraventricular.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, i.v. u otra vía de administración pueden incluir soluciones acuosas estériles que pueden también contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados, tales como, entre otros, potenciadores de la penetración, compuestos transportadores y otros transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Una composición de la presente invención se puede formular para administrar por cualquier vía, tal como intravenosa, u otra vía descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, una composición de la presente invención puede comprender preparaciones acuosas estériles. Entre los vehículos y disolventes aceptables se incluyen agua, solución de Ringer, solución salina tamponada con fosfato y solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles en forma de un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite fijo suave mineral o no mineral, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, pueden usarse aceites grasos tales como ácido oleico en la preparación de sustancias inyectables. Las formulaciones vehículo adecuadas para administración i.v., parenteral, mucosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, oral (p. ej., mediante ingestión) o mediante otras vías se pueden encontrar en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19ª edición, 1995.

En realizaciones preferidas adicionales, una composición de la presente invención se administra en una cantidad (p. ej., una dosis) que es suficiente para mejorar la contracción del músculo esquelético (p. ej., disminuyendo y manteniendo los niveles de calcio en el músculo esquelético a niveles normales). La presente invención no está limitada por ninguna dosis concreta. De hecho, la dosis deseada puede variar en función del sujeto que se está tratando (p. ej., la edad, el estado de salud y el tipo y/o grado de deficiencia de músculo esquelético que se está tratando).

En algunas realizaciones, cabe esperar que cada dosis (p. ej., de una composición que comprende un poloxámero (p. ej., administrado a un sujeto para prevenir o tratar una deficiencia de músculo esquelético (p. ej., músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $\text{Ca}^{2+}$ , músculo esquelético que tiene microdesgarros))) comprende entre 100 - 200 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende 200-400 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende entre 400 y 500 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende entre 500 y 2.000 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende menos de 100 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende más de 2.000 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende 400-520 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende más de entre 425 y 495 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende 450-470 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está

siendo tratado. En algunas realizaciones, cada dosis comprende 460 mg de poloxámero por kg de peso del sujeto que está siendo tratado. Una cantidad óptima para una administración particular puede determinarse mediante estudios estándar que implican la observación de la función diastólica y otras respuestas biológicas (p. ej., saturación de oxígeno en sangre) en sujetos.

- 5 En algunas realizaciones, cabe esperar que cada dosis (p. ej., de una composición que comprende un poloxámero que se administra a un sujeto (p. ej., un sujeto humano)) sea del 30% en peso de poloxámero. No obstante, una dosis puede comprender más o menos que esta cantidad de poloxámero. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una dosis puede comprender entre 30-40% en peso de poloxámero. En algunas realizaciones, una dosis puede comprender entre 40-50% en peso/en peso de poloxámero. En algunas realizaciones, una dosis puede comprender entre 50-60% en peso/en peso de poloxámero. En algunas realizaciones, una dosis puede comprender más del 60% en peso de poloxámero.

15 En algunas realizaciones, las preparaciones farmacéuticas que comprenden un poloxámero se formulan en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente pequeña de la preparación farmacéutica adecuada para el sujeto sometido a tratamiento (p. ej., administración de una composición de la presente invención). Cada dosis debería contener una cantidad de las composiciones que comprenda un poloxámero calculado para producir la respuesta deseada (p. ej., una mejor función del músculo esquelético). Los expertos en la técnica conocen bien los procedimientos para determinar la unidad de dosificación adecuada, además de describirse en el presente documento.

20 Las unidades de dosificación se pueden aumentar o disminuir de forma proporcionada en base a varios factores, incluyendo, entre otros, el peso, la edad, el estado de salud del sujeto. Además, las unidades de dosificación se pueden aumentar o disminuir según la respuesta del sujeto al tratamiento (p. ej., la cantidad de déficit de la fuerza de contracción del músculo esquelético).

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

30 Las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente, otros componentes adyuvantes encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas. Por tanto, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales adicionales, compatibles farmacéuticamente activos, tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de varias formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. No obstante, dichos materiales, cuando se añaden, preferentemente no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes adyuvantes, por ejemplo lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales de influencia sobre la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares, que no interaccionan de forma perjudicial con el poloxámero de la formulación.

40 La presente invención también incluye la coadministración de una composición que comprende un poloxámero con uno o más agentes activos adicionales (p. ej., agentes que se conocen en la técnica para tratar o prevenir deficiencias del músculo esquelético). De hecho, es un aspecto adicional de la presente invención proporcionar composiciones para potenciar procedimientos terapéuticos y/o composiciones farmacéuticas de la técnica anterior coadministrando una composición de la presente invención. En los procedimientos de coadministración, los agentes se pueden administrar de forma concurrente o secuencial. En una realización, las composiciones descritas en el presente documento se administran antes que el o los otros agentes activos. Las formulaciones farmacéuticas y modos de administración pueden ser cualquiera de los descritos en el presente documento. Además, los dos o más agentes coadministrados pueden administrarse, cada uno, usando diferentes modos (p. ej., vías) o diferentes formulaciones. Los agentes adicionales que se van a coadministrar pueden ser cualquiera de los agentes bien conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, los que actualmente están en uso clínico.

50 Se contempla que la administración de una composición que comprende un poloxámero se puede coadministrar con uno o más agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de deficiencias de músculo esquelético. Por ejemplo, los agentes que se conocen en la técnica para tratar deficiencias de músculo esquelético (p. ej., músculo esquelético deficiente en distrofina, músculo esquelético que tiene un déficit de la fuerza de contracción, músculo esquelético que tiene un desequilibrio de  $Ca^{2+}$  y músculo esquelético que tiene microdesgarros) incluyen, entre otros, estreptomina, corticosteroides (p. ej., prednisona, deflazacort), agentes inmunosupresores (p. ej., azatioprina, ciclosporina), ácido valproico, fenilbutirato, butirato sódico, M344 (una benzamida e inhibidor de la histona desacetilasa [HDAC]), ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA) y PTC124 (PTC Therapeutics, Inc, South Plainfield, NJ). PTC124 es un compuesto de oxadiazol que, cuando se toma por vía oral, puede anular las señales sin sentido de terminación de la traducción inducidas por la mutación del gen de la distrofina de un modo tal que la proteína producida es la proteína de longitud completa (véase, por ejemplo, Hamed SA (2006) *Drugs Nov*; 9(11): 783-9)

60

(PTC124 está actualmente en ensayos clínicos de fase II con DM de Duchenne y fibrosis quística). La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

### **Parte experimental**

- 5 Los ejemplos siguientes se proporcionan para demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención.

**Animales.** Los ratones *mdx* macho específicos sin patógenos (C57BL/10ScSn-*mdx* stock #001801) de 2-3 meses de edad y ratones C57BL/10 silvestres (WT) de 2-5 meses de edad se obtuvieron en Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los ratones se enjaularon en una instalación específica de barrera sin patógenos. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Guía para los Cuidados y Uso de Animales de laboratorio [Publicación DHHS N° 85-23 (NIH), Revisada en 1985, Office of Science and Health Reports, Bethesda, MD 20892].

**Procedimiento operativo.** Se anestesió a los ratones con una inyección intraperitoneal de avertina (tribromoetanol 400 mg/kg). Se administraron dosis complementarias de avertina según era necesario para mantener al ratón sin respuestas a estímulos táctiles. Las patas delanteras del ratón se cortaron y se diseccionaron los músculos LMB sin el segundo dedo. Los músculos LMB se seleccionaron por su tamaño extremadamente pequeño que garantizaba que todas las fibras eran accesibles a compuestos aplicados externamente. En base a las dimensiones físicas, se estimó que la masa de los músculos LMB era de aproximadamente 0,7 mg. Las disecciones se realizaron en una solución para baño refrigerada, la composición en mM: 137 NaCl, 11,9 NaHCO<sub>3</sub>, 5,0 KCl, 1,8 CaCl<sub>2</sub>, 0,5 MgCl<sub>2</sub>, 0,4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El músculo LMB aislado se montó horizontalmente en una cámara adaptada con el tendón distal unido a un transductor de fuerza (Aurora Scientific, Inc., modelo modificado 400A) y el tendón proximal unido a un servomotor (Aurora Scientific, Inc., Modelo 318B) mediante nudos compuestos por una sutura de nylon de monofilamento 10-0. La temperatura del baño se mantuvo a 25 °C y la cámara se profundió de forma continua con solución Tyrode (composición en mM: 121 NaCl, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 5,0 KCl, 1,8 CaCl<sub>2</sub>, 0,5 MgCl<sub>2</sub>, 0,4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) mantenida a pH 7,3 mediante burbujas de una mezcla de 95% / 5% de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

**Protocolo para inducir lesiones.** Los músculos se estimularon eléctricamente mediante el paso de una corriente entre dos electrodos de platino. Los pulsos de estimulación con corriente constante tuvieron una duración de 0,5 ms y su magnitud se ajustó para provocar una respuesta de sacudida máxima. La longitud óptima ( $L_0$ ) del músculo se determinó ajustando su longitud hasta alcanzar una fuerza máxima de sacudida. Para alcanzar una contracción tetánica isométrica máxima, el músculo se estimuló usando un tren de pulsos a una frecuencia de 220 pulsos por segundo y con una polaridad alterna de los pulsos. El protocolo usado para inducir el déficit de la fuerza consistió en 20 contracciones isométricas, cada una de ellas de 1 segundo de duración y separadas por 1 minuto. El periodo de descanso de un minuto entre contracciones era necesario para minimizar la fatiga y garantizar que cualquier disminución de la fuerza que genera capacidad de los músculos durante y después de las 20 contracciones era atribuible a lesiones inducidas por contracción. Para facilitar las comparaciones entre grupos de músculos de masa variable, la fuerza isométrica absoluta de un músculo durante cada contracción se normalizó hasta la fuerza isométrica máxima ( $P_0$ ) producida por el músculo durante el protocolo de 20 contracciones.

**Grupos de tratamiento.** Los músculos LMB de ratones WT, denominados músculos WT, se dividieron en dos grupos. Un grupo se expuso a solución Tyrode normal y el otro grupo a solución Tyrode sin calcio. Los músculos de ratones *mdx*, denominados músculos *mdx*, se dividieron en 5 grupos de acuerdo con su tratamiento con: (1) P 188, (2) estreptomicina, (3) P 188 y estreptomicina, (4) Tyrode sin calcio o (5) Tyrode normal. Las concentraciones de P188 (Bayer, NJ) y estreptomicina (Sigma, #S1277) en solución Tyrode fueron 1 mM y 200  $\mu$ M, respectivamente. Para todos los tratamientos, se dejó incubar los músculos en la cámara durante 15 minutos antes de comenzar el protocolo de las contracciones. Los experimentos piloto realizados en músculos WT expuestos a P188 (1 mM) o estreptomicina (200  $\mu$ M) indicaron que estos compuestos no eran tóxicos para el músculo cuando se usaron a estas concentraciones. Para los experimentos sin calcio se omitió el CaCl<sub>2</sub> de la solución Tyrode y el MgCl<sub>2</sub> se incrementó a 2,3 mM para mantener la concentración de los iones divalentes.

El déficit de la fuerza que surge de los experimentos sin calcio tienen, por ejemplo, dos posibles orígenes: un déficit de la fuerza inducida por contracción, así como un déficit de la fuerza "ambiental" causado por una exposición prolongada del músculo a un ambiente no fisiológico. Para separar el ambiente del déficit de la fuerza inducida por contracción se asumió que el ambiente sin calcio tenía un efecto igualmente perjudicial para músculos WT y *mdx* en ambientes sin calcio a los de los músculos WT en los mismos ambientes sin calcio. Al final del protocolo de contracciones, la fuerza tetánica isométrica de los músculos *mdx*, expresada como un porcentaje de  $P_0$ , se dividió por la fuerza tetánica isométrica de los músculos WT, también expresada como un porcentaje de  $P_0$ . Este procedimiento de normalización aisló los déficits de la fuerza inducidos por contracción, lo que permite comparaciones entre los músculos *mdx* en ambientes sin calcio y normales.

**Estadística.** Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó usando una prueba t de Student o un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de significación fijado *a priori* a  $P < 0,05$ . Cuando se usó el ANOVA y se detectó la significación, se usó la comparación post hoc de Student-Newman-Keuls para evaluar las diferencias pareadas.

**Ejemplo II:**

Este ejemplo demuestra la eficacia de P188 en la reducción del déficit de la fuerza inducida por contracción en un músculo esquelético *mdx* entero y que el tratamiento de músculos *mdx* con estreptomycin, un inhibidor de los canales activados por estiramiento, era igual de eficaz en la reducción del déficit de la fuerza inducida por contracción sino probablemente mediante un mecanismo diferente del P188.

En base a la histología de una submuestra de músculos, los músculos LMB tenían un diámetro de aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  y estaban compuestos por de 200 a 250 fibras (véase la Figura 2A, B). Las secciones transversales de los músculos *mdx* mostraron características distróficas típicas (véase, por ejemplo, Brooks, SV (1998) J Muscle Res Cell Mot 19, 179-187), incluyendo áreas de infiltración de células mononucleares y la presencia de células con núcleos centrales (véase la Figura 2C). El  $P_o$  de los músculos WT no tratados ( $14,8 \pm 0,9$  mN,  $n=6$ ) fue superior al  $P_o$  de los músculos *mdx* no tratados  $10,8 \pm 0,4$  mN,  $n=8$ ) ( $P < 0,05$ ). Al final del protocolo de contracción isométrica, los músculos WT no mostraron un déficit de la fuerza. Por el contrario, las fuerzas generadas por los músculos *mdx* no tratados disminuyeron al 69% del  $P_o$  al final del protocolo de 20 contracciones isométricas (véase la Figura 3). Este valor no varió después de un periodo de 10 minutos de recuperación, lo que indica que la fatiga no era un factor contribuyente. Después del protocolo de contracción isométrica, la histología de los músculos *mdx* reveló la presencia de fibras que habían aumentado de tamaño y que se teñían de color oscuro como resultado de regiones de hipercontractura irreversible en la longitud de las fibras (Véase la Figura 2E). En una sección transversal dada del músculo, la hipercontractura de las fibras musculares también tuvo como resultado regiones esporádicas desprovistas de material celular (véase la Figura 2D). La extensión del daño en la fibra en una sección transversal dada es, por ejemplo, probable que sea una subestimación de los daños en la fibra en un músculo entero, una fibra que parece normal en una sección transversal puede estar dañada en otra región a lo largo de su eje.

El tratamiento de los músculos *mdx* con estreptomycin, o P188 solo, o con estreptomycin y P188 simultáneamente, no influyó sobre el  $P_o$  absoluto. Aunque el  $P_o$  absoluto no se vio afectado por el tratamiento, los músculos tratados mostraron una reducción de la magnitud del déficit de la fuerza posterior al protocolo. En comparación con los músculos *mdx* no tratados, los músculos *mdx* tratados con estreptomycin o P188 exhibieron una mayor capacidad para generar fuerza al final del protocolo de contracción, con un incremento del 69% al 84% y el 85% del  $P_o$ , respectivamente (véase la Figura 4). Cuando los músculos *mdx* se trataron con estreptomycin y P188 de forma simultánea, el  $P_o$  normalizado tras el protocolo no fue diferente del tratamiento con P188 o estreptomycin solos ( $P > 0,05$ ) (véase la Figura 4).

En solución Tyrode sin calcio, el  $P_o$  absoluto de los músculos WT y *mdx* disminuyó en aproximadamente un 30% a  $10,8 \pm 0,5$  mN ( $n=3$ ) y  $7,2 \pm 1,3$ mN ( $n=4$ ), respectivamente. La disminución del  $P_o$  absoluto de los músculos WT y *mdx* probablemente se debía al ambiente extracelular no fisiológico sin calcio. Cuando se normalizó en los músculos WT en ambientes sin calcio, los músculos *mdx* en ambientes sin calcio generaron fuerzas que eran el 92% del  $P_o$ , un valor que no era diferente al de los músculos tratados con estreptomycin y/o P188 ( $P < 0,05$ ) (véase la Figura 4).

Tratando los músculos *mdx* con estreptomycin y P188, por separado o de forma simultánea, se observó una reducción del déficit de la fuerza en comparación con los músculos *mdx* sin tratar. Cuando se llevó a cabo el protocolo de contracción isométrica en un ambiente sin calcio, los músculos *mdx* exhibieron de nuevo un menor déficit de la fuerza. Estos resultados, acoplados con una observación directa de la entrada de calcio en los músculos IMB de ratones *mdx* durante un protocolo de contracción similar, sugieren, por ejemplo, que la entrada de calcio extracelular se produce a través de desgarros micromembranales y SAC, y desempeña un papel significativo en el déficit de la fuerza posterior al protocolo en músculos *mdx*. Es probable que este déficit de la fuerza se produzca cuando, por ejemplo, la entrada de calcio extracelular en las fibras musculares *mdx* produce una actividad regional sostenida que, en última instancia, conduce a coágulos de hipercontractura y destrucción de fibras.

**Páginas adicionales 25 a 29 de la memoria descriptiva**

A fin de completar aspectos específicos de la invención se ha resumido lo siguiente.

La invención comprende un procedimiento de tratamiento de un sujeto para prevenir o reducir la lesión o deficiencia de músculo esquelético, que comprende administrar a dicho sujeto una composición que comprende un poloxámero (por ejemplo P188) en condiciones tales que dicha lesión del músculo esquelético se reduce o previene. Dicha deficiencia del músculo esquelético puede ser un déficit de fuerza de contracción del músculo esquelético. Dicho poloxámero puede ser un poloxámero purificado o fraccionado. Dicho sujeto puede ser un sujeto humano. Dicha composición se puede administrar por administración intravenosa. Dicho sujeto puede ser un sujeto deficiente en distrofina, por ejemplo, un sujeto que tenga distrofia muscular de Duchene. Dicho tratamiento puede reducir la susceptibilidad a sobrecarga de calcio en el músculo esquelético de dicho sujeto, en el que dicha reducción de la susceptibilidad a la sobrecarga de calcio en tejido de músculo esquelético de dicho sujeto comprende preferiblemente reducir los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular en el sarcolema del músculo esquelético de dicho sujeto. Dicha reducción de niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular en el músculo esquelético puede evitar la remodelación o remodelación inversa del tejido del musculo esquelético en dicho sujeto. Dicho poloxámero se administra preferiblemente a un nivel de dosificación de aproximadamente entre 420-500 mg por kg de peso de dicho sujeto, por ejemplo, 460 mg por kg de peso de dicho sujeto. Dicha composición que comprende un poloxámero se puede co-administrar con uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en estreptomycin, prednisona,



5 menos un músculo esquelético seleccionado del grupo que consiste en gastronemio, tibialis posterior, sóleo, largo, breve, glúteo mayor, bíceps femoral, semitendinoso, semimembranoso, iliopsoas, cuádriceps femoral, músculos aductores de la cadera, elevador de la escápula, trapecio, abdominal recto, abdominal transverso, músculo oblicuo externo del abdomen, músculo oblicuo interno del abdomen, erector de la columna, pectoral mayor, bíceps braquial, tríceps braquial, braquial, pronador redondo, braquiorradial, romboides, deltoide, latissimus dorsi y manguito de los rotadores.

10 En lo que respecta al primer procedimiento citado anteriormente, es decir, el procedimiento de tratar un sujeto para prevenir o reducir la lesión o deficiencia del músculo esquelético, que comprende la administración a dicho sujeto de una composición que comprende un poloxámero en condiciones tales que dicha lesión del músculo esquelético se reduce o previene, se puede usar una poloxamina y/o un poliglicidol en lugar de, o junto con, dicho poloxámero.

En lo que respecta al segundo procedimiento citado anteriormente, es decir, el procedimiento de prevenir el déficit de fuerza de contracción del músculo esquelético en un sujeto con deficiencia de distrofina que comprende la administración a dicho sujeto de una composición que comprende un poloxámero, se puede usar una poloxamina y/o un poliglicidol en lugar de, o junto con, dicho poloxámero.

15 En lo que respecta al tercer procedimiento citado anteriormente, es decir, el procedimiento de reducir la concentración de calcio en el músculo esquelético que comprende la administración de una composición que comprende un poloxámero a dicho músculo esquelético, se puede usar una poloxamina y/o un poliglicidol en lugar de, o junto con, dicho poloxámero.

20 En lo que respecta a la primera composición citada anteriormente, es decir, la composición que comprende un poloxámero y un segundo agente útil para el tratamiento de un déficit de fuerza de contracción del músculo esquelético, se puede usar una poloxamina y/o un poliglicidol en lugar de, o junto con, dicho poloxámero.

En lo que respecta a la segunda composición citada anteriormente, es decir, la composición que comprende un poloxámero en contacto con un músculo esquelético que presenta un déficit de fuerza de contracción del músculo esquelético, se usa una poloxamina y/o un poliglicidol en lugar de, o junto con, dicho poloxámero.

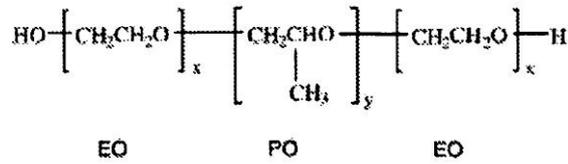
25

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende un poloxámero para su uso en el tratamiento, prevención o reducción de lesión de músculo esquelético del diafragma o deficiencia del músculo esquelético del diafragma en un sujeto.
- 5 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha deficiencia de músculo esquelético del diafragma es un déficit de fuerza de contracción del músculo esquelético.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho poloxámero es un poloxámero purificado o fraccionado.
- 10 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho sujeto es un sujeto humano.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición se administra por administración intravenosa.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho sujeto es un sujeto deficiente en distrofina.
- 15 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicho sujeto tiene distrofia muscular de Duchenne.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho tratamiento reduce la susceptibilidad a solapamiento de calcio en el músculo esquelético del diafragma de dicho sujeto.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho poloxámero es P188.
- 20 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho poloxámero se administra a un nivel de dosificación de entre 0,1-5.000 mg aproximadamente por kg de peso de dicho sujeto.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que dicho poloxámero se administra a un nivel de dosificación de aproximadamente entre 0,46-500 mg por kg de peso de dicho sujeto.
- 25 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que dicho nivel de dosificación es de 0,1-200 mg por kg de peso de dicho sujeto.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición que comprende un poloxámero se co-administra con uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en estreptomina, prednisona, deflazacort, azatioprina, ciclosporina, ácido valproico, fenilbutirato, butirato sódico, M344 y ácido suberoilánilida hidroxámico.
- 30 14. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un poloxámero y un agente útil para el tratamiento de un déficit de fuerza de contracción de músculo esquelético, en el que dicho músculo esquelético es un diafragma.
- 35 15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicho agente útil para el tratamiento de un déficit de fuerza de contracción de músculo esquelético se selecciona del grupo que consiste en estreptomina, prednisona, deflazacort, azatioprina, ciclosporina, ácido valproico, fenilbutirato, butirato sódico, M344 y ácido suberoilánilida hidroxámico, y una combinación de estos agentes.

Figura 1

A



B

Copolímero	PM <sup>a</sup>	nº promedio de unidades EO (x) <sup>b</sup>	nº promedio de unidades PO (y) <sup>b</sup>	HLB <sup>c</sup>	Punto de turbidez en solución acuosa al 1% (°C) <sup>e</sup>	CMC (M) <sup>d</sup>
L35	1900	21,59	16,38	19	73	5,3 × 10 <sup>-3</sup>
L43	1850	12,61	22,33	12	42	2,2 × 10 <sup>-3</sup>
L44	2200	20,00	22,76	16	65	3,6 × 10 <sup>-3</sup>
L61	2600	4,55	31,03	3	24	1,1 × 10 <sup>-3</sup>
L62	2500	11,36	34,48	7	32	4,0 × 10 <sup>-4</sup>
L64	2600	26,36	30,00	15	58	4,8 × 10 <sup>-4</sup>
F68	8400	152,73	28,97	29	>100	4,8 × 10 <sup>-2</sup>
L81	2750	6,25	42,67	2	20	2,3 × 10 <sup>-3</sup>
P84	4200	38,18	43,45	14	74	7,1 × 10 <sup>-3</sup>
P85	4600	52,27	39,66	16	85	6,5 × 10 <sup>-3</sup>
F87	7700	122,50	39,83	24	>100	9,1 × 10 <sup>-5</sup>
F88	11 400	207,27	39,31	28	>100	2,5 × 10 <sup>-4</sup>
L92	3650	16,59	50,34	6	26	8,8 × 10 <sup>-3</sup>
F98	13 000	236,36	44,83	28	>100	7,7 × 10 <sup>-5</sup>
L101	3800	8,64	58,97	1	15	2,1 × 10 <sup>-8</sup>
P103	4950	33,75	59,74	9	86	6,1 × 10 <sup>-6</sup>
P104	5900	53,64	61,03	13	81	3,4 × 10 <sup>-6</sup>
P105	6500	73,66	56,03	15	91	6,2 × 10 <sup>-6</sup>
F108	14 600	265,45	50,34	27	>100	2,2 × 10 <sup>-5</sup>
L121	4400	10,90	68,28	1	14	1,0 × 10 <sup>-6</sup>
P123	5750	39,20	69,40	8	90	4,4 × 10 <sup>-6</sup>
F127	12 600	200,45	65,17	22	>100	2,8 × 10 <sup>-6</sup>

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

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

5 c. Valores HLB de los copolímeros, los puntos de turbidez los determinó el fabricante,

d. Valores de concentración crítica de micelización se determinaron previamente usando una sonda de pireno (véase, por ejemplo, Kozlov y col., *Macromolecules* 33 (200) 3305-3313).

Figura 2

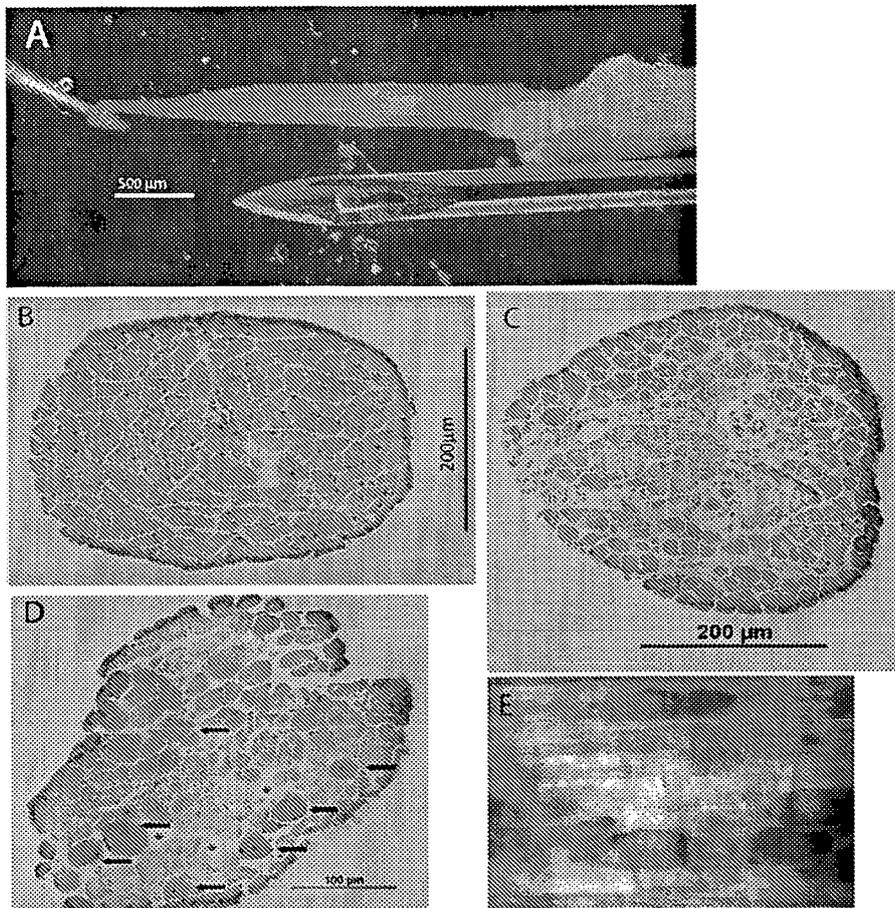


Figura 3

