

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 691**

51 Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2005 PCT/US2005/009149**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2005 WO05089489**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2005 E 05731443 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 1765149**

54 Título: **Uso de relaxina para aumentar la distensibilidad arterial**

30 Prioridad:

19.03.2004 US 554716 P

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

04.10.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH (100.0%)
200 GARDNER STEEL CONFERENCE CENTER
THACKERAY & O'HARA STREETS
PITTSBURGH, PA 15260, US**

72 Inventor/es:

**CONRAD, KIRK P. y
SHROFF, SANJEEV G.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 635 691 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).

Uso de relaxina para aumentar la distensibilidad arterial5 **Descripción****CAMPO DE LA INVENCION**

10 **[0001]** La presente invención está en el campo de la distensibilidad arterial, y en particular, el uso de relaxina para aumentar la distensibilidad arterial.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 **[0002]** La distensibilidad arterial declina con la edad incluso en individuos sanos sin enfermedad cardiovascular manifiesta. Con la edad se ve un descenso en la capacidad de las arterias grandes y pequeñas para distenderse en respuesta a un aumento en la presión. La reducción asociada con la edad en la distensibilidad arterial es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, y se asocia con otras condiciones patológicas. Por ejemplo, la distensibilidad arterial reducida también se asocia con la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. Se ha reportado que las arterias diabéticas parecen envejecer a una tasa acelerada comparadas con las arterias de los individuos no diabéticos. Ver, p.ej., Arnett et al. (1994) Am J Epidemiol. 140:669-682; Rowe (1987) Am J Cardiol. 60:68G-71G; Cameron et al. (2003) Diabetes Car. 26(7):2133-8; Kass et al. (2001) Circulation 104:1464-1470; Avolio et al. (1983) Circulation 68:50-58; U.S. Patent No. 6,251,863; U.S. Patent No. 6,211,147.

25 **[0003]** Hay una necesidad para métodos de aumentar la distensibilidad arterial, y para tratar los trastornos asociados con o resultante de la distensibilidad arterial reducida. La presente invención aborda estas necesidades.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

30 **[0004]** La presente invención muestra el uso, para tratar a los individuos con disminución de la distensibilidad arterial, de una cantidad efectiva de una formulación que comprende un agonista del receptor de relaxina, el cual es una relaxina humana recombinante, es decir, relaxina H2 humana.

35 **[0005]** En un contexto de la invención, la invención proporciona un método para aumentar la distensibilidad arterial en un sujeto, donde dicho método comprende medir la distensibilidad arterial global en un sujeto; determinar que la distensibilidad arterial global está disminuida en el sujeto en relación con la distensibilidad arterial global en un sujeto sano; y administrar a un sujeto una formulación farmacéutica que comprende relaxina para aumentar la distensibilidad arterial en el sujeto. La distensibilidad arterial global puede medirse, en un contexto, a partir del decaimiento diastólico de la onda de presión aórtica usando el método del área. En otro contexto, la distensibilidad arterial global puede calcularse como el cociente volumen latido a presión de pulso, donde el volumen latido se define como el cociente del gasto cardíaco a la frecuencia cardíaca.

45 **[0006]** En contextos relacionados, la distensibilidad arterial local o la distensibilidad arterial regional de un sujeto puede medirse además o como una alternativa a la medición de la distensibilidad arterial global y, si la distensibilidad arterial global o regional disminuye en relación a la distensibilidad arterial global o regional esperada para un individuo sano en situación similar, la relaxina puede administrarse para aumentar la distensibilidad arterial en ese individuo.

50 **[0007]** En otros contextos, el sujeto a quien se administra relaxina sufre uno o más de los siguientes trastornos: aterosclerosos, coronariopatía, disfunción diastólica, hipercolesterolemia, hipertrofia ventricular izquierda rigidez arterial asociada con el tabaquismo a largo plazo, rigidez arterial asociada con la obesidad, rigidez arterial asociada con la edad, lupus eritematoso sistémico e hipercolesterolemia. En contextos relacionados, la invención proporciona métodos para aumentar la distensibilidad arterial en mujeres perimenopáusicas, menopáusicas y posmenopáusicas y en individuos que están en riesgo de uno de los trastornos antes mencionados.

55 **[0008]** En un contexto adicional de la invención, la administración de relaxina aumenta la distensibilidad arterial al menos en 10%, 15%, 20% o más, en relación con la distensibilidad arterial medida antes de la administración. En otros contextos adicionales, la invención proporciona para la administración de relaxina a los individuos con distensibilidad arterial disminuida a una tasa predeterminada de forma de mantener una concentración sérica de relaxina de 0.5 a 80 ng/ml. En un contexto, la relaxina es relaxina humana recombinante. En otro contexto, la relaxina es relaxina H2 recombinante. En contextos relacionados, la relaxina puede administrarse diariamente, en una formulación inyectable, como formulación de liberación sostenida o como infusión continua.

65

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0009]

- 5 Las Figuras 1A-C muestran en cambio porcentual desde el inicio para el gasto cardiaco (Figura 1A), frecuencia cardiaca (Figura 1B) y volumen latido (Figura 1C) en ratas hembras a las que se les administró relaxina humana recombinante a dosis bajas (rhRLX; 4 µg/h), rhRLX a dosis altas (25 µg/h) o vehículo.
- 10 Las Figuras 2A-D muestran el cambio porcentual desde el inicio para la resistencia vascular sistémica (Figura 2A), presión arterial media (Figura 2B), distensibilidad arterial global (Figura 2C) y cociente de volumen latido a presión de pulso en ratas hembras a las que se les administró dosis bajas de rhRLX, dosis altas de rhRLX o vehículo.
- 15 Las Figuras 3A y 3B muestran los trazados de presión arterial representativos de una rata (Figura 3A); y ensamblan las ondas de presión arterial media para los tres grupos (vehículo, rhRLX a dosis bajas y rhRLX a dosis altas) el día 10 después de la implantación de la minibomba osmótica (Figura 3B).
- 20 Las Figuras 4A y 4B muestran el estrés circunferencial (σ)-radio de la pared media (R_m) (Figura 4A); y las relaciones del módulo elástico incremental (E_{inc})- R_m (Figura 4B) para arterias renales pequeñas aisladas de ratas tratadas con rhRLX o vehículo por 5 días.
- 25 La Figura 5 muestra cambios temporales en la hemodinámica sistémica en respuesta a la administración de una dosis baja (4µg/h) de relaxina humana recombinante en ratas machos y hembras. Los datos de la frecuencia cardiaca (A), el volumen latido (B), el gasto cardiaco (C) y la presión arterial media (D) se presentan como porcentajes de los iniciales. * $P < 0.05$ vs. basal (LSD de Fisher post hoc). Los incrementos significativos en SV se muestran solo para los días 6, 8 y 10.
- 30 La Figura 6 muestra los cambios temporales en las propiedades arteriales sistémicas en respuesta a la administración de una dosis baja (4µg/h) de relaxina humana recombinante en ratas machos y hembras. Los datos de resistencia vascular sistémica (A) y dos medidas de distensibilidad arterial global, ($AC_{\text{área}}$ (B) y SV/PP (C), se presentan como porcentajes de los iniciales. * $P < 0.05$ vs. inicial (LSD de Fisher post-hoc). Se muestran incrementos significativos en $AC_{\text{área}}$ y SV/PP solo para los días 8 y 10.
- 35 La Figura 7 muestra cambios temporales en la hemodinámica sistémica en respuesta a la administración de tres dosis de relaxina humana recombinante en ratas hembras: baja (4 µg/h), media (25 µg/h) y alta (50 µg/h). Los datos de frecuencia cardiaca (A), volumen latido (B), gasto cardiaco (C) y presión arterial media (D) se presentan como porcentajes de los iniciales. * $P < 0.05$ vs. basal (LSD de Fisher post-hoc).
- 40 La Figura 8 muestra cambios temporales en la hemodinámica sistémica en respuesta a la administración de tres dosis de relaxina humana recombinante en ratas hembras: baja (4 µg/h), media (25 µg/h) y alta (50 µg/h). Los datos de resistencia vascular sistémica (A) y dos medidas de distensibilidad arterial global, $AC_{\text{área}}$ (B) y SV/PP (C), se presentan como porcentajes de los iniciales. * $P < 0.05$ vs. basal (LSD de Fisher post hoc).
- 45 La Figura 9 muestra los cambios temporales en la hemodinámica sistémica en respuesta a la administración de la dosis alta a corto plazo de relaxina humana recombinante en ratas hembras. Los datos de frecuencia cardiaca (A), volumen latido (B), gasto cardiaco (C) y presión arterial media (D) se presentan como porcentajes de los iniciales. * $P < 0.05$ vs. basal (LSD de Fisher post hoc). La Figura 10 muestra los cambios temporales en las propiedades arteriales sistémicas en respuesta a la administración de dosis altas a corto
- 50 plazo de relaxina humana recombinante en ratas hembras. Los datos de resistencia vascular sistémica (A) y dos medidas de distensibilidad arterial global, ($AC_{\text{área}}$ (B) y SV/PP (C), se presentan como porcentajes de los iniciales.
- 55 La Figura 11 muestra las relaciones entre los cambios porcentuales compuestos desde el inicio y los valores iniciales para la resistencia vascular sistémica (A) y dos medidas de distensibilidad arterial global, $AC_{\text{área}}$ (B) y SV/PP (C), en ratas machos y hembras a las que se les administró dosis bajas de relaxina humana recombinante (4µg/h). Estas relaciones eran independientes del sexo. La línea sólida en cada panel corresponde a la gráfica de la relación obtenida por regresión lineal (ratas machos y hembras combinadas).

60 DEFINICIONES

- 65 **[0010]** Los términos “sujeto”, “hospedador”, “individuo” y “paciente”, usados aquí de forma intercambiable, se refieren a cualquier sujeto, particularmente un mamífero, para el cual se desea un diagnóstico o terapia, particularmente seres humanos. Otros sujetos pueden incluir ganado, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, etc. En muchos contextos, un sujeto es un humano en necesidad de tratamiento para una

enfermedad o condición relacionada con o resultante de una distensibilidad arterial reducida.

[0011] Los términos “tratamiento”, “tratando”, “terapia”, etc., se usan aquí para referirse generalmente a obtener un efecto terapéutico, farmacológico o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntomas y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento” como se usa aquí cubra cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, p.ej., un ser humano, e incluye: (a) prevenir que ocurra la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a ella, pero a quien no se le ha diagnosticado aún; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad.

[0012] Como se usa aquí los términos “aislado” y “sustancialmente purificado”, usados de forma intercambiable, cuando se usan en el contexto de “relaxina aislada”, se refiere al polipéptido de relaxina que es un entorno diferente a aquél en el cual aparece naturalmente el polipéptido de relaxina. Como se usa aquí, el término “sustancialmente purificado” se refiere a un polipéptido de relaxina que se retira de un entorno natural y al menos está 60% libre, preferiblemente 75% libre, y más preferiblemente 90% libre de otros componentes con los cuales está asociado naturalmente.

[0013] Antes de describir la presente invención, hay que entender que esta invención no se limita a los contextos particulares descritos. El alcance de la presente invención estará limitado solo por las declaraciones incluidas.

[0014] Donde se proporciona un rango de valores, se comprende que cada valor interviniente, a la décima parte de la unidad del menor límite a menos que el contexto claramente dicte otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier valor establecido o interviniente en ese rango establecido, se incluye dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos menores pueden incluirse de forma independiente en los rangos menores, y también se incluyen dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Donde el rango establecido incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen cualquiera de ellos o ambos límites incluidos también se incluyen en la invención.

[0015] A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la cual pertenece esta invención. Aunque métodos y materiales usados o equivalentes a los descritos aquí también pueden usarse en la práctica o evaluación de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

[0016] Es de hacer notar que cuando se usan aquí y en las declaraciones incluidas, las formas singulares “un”, “y” y “el” incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a “una formulación de relaxina” incluye una pluralidad de tales formulaciones y la referencia a “el agente activo” incluye la referencia a uno o más agentes activos y equivalentes conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

[0017] Las publicaciones discutidas aquí se proporcionan solo para su divulgación antes de la fecha de registro de la presente aplicación. Nada aquí se construirá como una admisión que la presente invención no puede preceder tal publicación en virtud de una invención previa. Así, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas reales de publicación que pueden tener que confirmarse de forma independiente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0018] La presente invención proporciona métodos para tratar trastornos asociados con la rigidez arterial; métodos para aumentar la distensibilidad arterial; métodos para reducir la rigidez arterial en un individuo; y métodos para reducir el riesgo que un individuo desarrolle una o más complicaciones o trastornos asociados con una reducción de la distensibilidad arterial. Los métodos generalmente implican administrar a un individuo en necesidad de ello una cantidad efectiva de un agonista del receptor de la relaxina. En algunos contextos, el individuo tiene, o está en riesgo de desarrollar, rigidez arterial relacionada con la edad. En otros contextos, el individuo es una mujer perimenopáusica, menopáusica o posmenopáusica, y así ha desarrollado, o está en riesgo de desarrollar, rigidez arterial.

[0019] Una de las mayores adaptaciones cardiovasculares en el embarazo humano es el aumento de la distensibilidad arterial global, acompañada por aumentos en los niveles de relaxina, los cuales alcanzan un pico a finales del primer trimestre justo cuando la resistencia vascular sistémica (SVR) alcanza un nadir. Al menos en teoría, el aumento en la distensibilidad arterial global es crítico para el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular durante el embarazo por varias razones: (1) el aumento en la AC previene el descenso excesivo en la presión diastólica la cual de otra forma caería a niveles precariamente bajos debido al descenso significativo en la SVR; (2) el aumento minimiza el trabajo pulsátil u oscilatorio realizado por el corazón el cual de otra forma aumentaría en desproporción al aumento en el trabajo total requerido e invertido por el corazón durante el embarazo; y (3) el aumento en la AC global preserva el estrés de roce continuo (o evita el roce oscilatorio) en la interfaz sangre-endotelial a pesar de la circulación hiperdinámica del embarazo, favoreciendo así la producción de

óxido nítrico en vez de superóxido y otras especies reactivas de oxígeno dañinas por el endotelio. El aumento en la AC global, junto con la reducción en la SVR, pueden resultar en un déficit circulatorio, y así, contribuir a la retención de sodio y agua y a la expansión del volumen plasmático durante el principio del embarazo.

5 MÉTODOS DE TRATAMIENTO

10 **[0020]** La presente invención proporciona métodos para aumentar la distensibilidad arterial los cuales utilizan el paso de administrar a un individuo que lo necesite una cantidad efectiva de un agonista del receptor de relaxina. En algunos contextos, el individuo tiene aterosclerosis, coronariopatía, disfunción diastólica, hipercolesterolemia familiar, hipertrofia ventricular izquierda, rigidez arterial asociada con tabaquismo a largo plazo, rigidez arterial asociada con obesidad rigidez arterial asociada con la edad, lupus eritematoso sistémico e hipercolesterolemia, o está en riesgo de desarrollar rigidez arterial relacionada con la edad. En otros contextos, el individuo es una mujer perimenopáusica, menopáusica o posmenopáusica, o una mujer que ha cesado sus menstruaciones por razones no relacionadas con la edad, p.ej., debido al ejercicio excesivo o como resultado de una cirugía (p.ej., histerectomía, ooforectomía). y ha desarrollado, o está en riesgo de desarrollar, rigidez arterial.

20 **[0021]** Los métodos generalmente implican administrar a un individuo una cantidad efectiva de relaxina. En algunos contextos, una cantidad efectiva de relaxina es una cantidad que es efectiva para aumentar la distensibilidad arterial al menos en 5%, al menos en 10%, al menos en 15%, al menos en 20%, al menos en 25%, al menos en 30%, al menos en 35%, al menos en 40%, al menos en 45% o al menos en 50%, o más, comparado con la distensibilidad arterial en ausencia del tratamiento con relaxina.

25 **[0022]** En algunos contextos, una cantidad efectiva de relaxina es una cantidad que es efectiva para reducir la rigidez arterial al menos en 5%, al menos en 10%, al menos en 15%, al menos en 20%, al menos en 25%, al menos en 30%, al menos en 35%, al menos en 40%, al menos en 45% o al menos en 50%, o más, comparado con la rigidez arterial en el individuo en ausencia del tratamiento con relaxina.

30 **[0023]** En algunos contextos, una cantidad efectiva de relaxina es una cantidad que es efectiva para reducir la rigidez arterial al menos en 5%, al menos en 10%, al menos en 15%, al menos en 20%, al menos en 25%, al menos en 30%, al menos en 35%, al menos en 40%, al menos en 45% o al menos en 50%, o más, comparado con la rigidez arterial en el individuo en ausencia del tratamiento con relaxina.

35 **[0024]** Los trastornos resultantes o asociados con la rigidez arterial o distensibilidad arterial reducida incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, coronariopatía, disfunción diastólica, hipercolesterolemia familiar, hipertrofia ventricular izquierda, rigidez arterial asociada con tabaquismo de larga data, rigidez arterial asociada con obesidad, rigidez arterial asociada con la edad, lupus eritematoso sistémico e hipercolesterolemia. De particular interés en algunos contextos, es la rigidez arterial asociada con el envejecimiento normal, disfunción diastólica, menopausia, obesidad, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, tabaquismo de larga data e hipertrofia ventricular izquierda.

40 **[0025]** Un aumento en la distensibilidad arterial, o una reducción en la rigidez arterial, reduce el riesgo que un individuo desarrolle una condición patológica resultante de la distensibilidad arterial reducida.

45 **[0026]** En algunos contextos, una cantidad efectiva de relaxina es una cantidad que es efectiva para reducir el riesgo que un individuo desarrolle una condición patológica asociada o resultante de la distensibilidad arterial reducida al menos en 5%, al menos en 10%, al menos en 15%, al menos en 20%, al menos en 25%, al menos en 30%, al menos en 35%, al menos en 40%, al menos en 45% o al menos en 50%, o más, comparado con el riesgo de desarrollar la condición en ausencia del tratamiento con relaxina.

50 **[0027]** En general, como se discute antes, una cantidad efectiva de relaxina es una que es efectiva para aumentar la distensibilidad arterial. El término "aumentar" se usa de forma intercambiable aquí con "estimular" y "promover." Los Ejemplos proporcionan guías generales para las cantidades efectivas usadas en ratas. Los expertos en la materia podrán determinar fácilmente las cantidades efectivas para su uso en seres humanos, dadas las guías en los Ejemplos. En general, una dosis de relaxina está entre 0.1 y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal al día, entre 6.0 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal al día o entre 1.0 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal al día. Para su administración a una persona de 70 kg, el rango de dosis estaría entre 7.0 μg y 3.5 mg al día, entre 42.0 μg y 2.1 mg al día o entre 84.0 y 700 μg al día. En algunos contextos, para la administración a un humano, una dosis efectiva está entre 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal al día y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal al día, o entre 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal al día y 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal al día. La cantidad de relaxina administrada dependerá, claro está, del tamaño, sexo y peso del sujeto y la severidad de la enfermedad o condición, la forma y esquema de administración, la probabilidad de recurrencia de la enfermedad, y el juicio del médico tratante. En cada caso la dosis diaria puede administrarse por un período de tiempo, en vez de un solo bolus, dependiendo del efecto deseado y las diferencias en circunstancias individuales.

65 **[0028]** En algunos contextos, relaxina se administra al individuo a una tasa predeterminada de forma de mantener una concentración sérica de relaxina entre 0.01 ng/ml y 80 ng/ml, p.ej., entre 0.01 ng/ml y 0.05 ng/ml, entre 0.05 ng/ml y 0.1 ng/ml, entre 0.1 ng/ml y 0.25 ng/ml, entre 0.25 ng/ml y 0.5 ng/ml, entre 0.5 ng/ml y 1.0 ng/ml, entre 1.0

ng/ml y 5 ng/ml, entre 5 ng/ml y 10 ng/ml, entre 10 ng/ml y 15 ng/ml, entre 15 ng/ml y 20 ng/ml, entre 20 ng/ml y 25 ng/ml, entre 25 ng/ml y 30 ng/ml, entre 30 ng/ml y 35 ng/ml, entre 35 ng/ml y 40 ng/ml, entre 40 ng/ml y 45 ng/ml, entre 45 ng/ml y 50 ng/ml, entre 50 ng/ml y 60 ng/ml, entre 60 ng/ml y 70 ng/ml o entre 70 ng/ml y 80 ng/ml.

5 Determinando la efectividad

[0029] Usando cualquier método conocido puede determinarse si una formulación dada de relaxina, o si una dosis dada de relaxina es efectiva aumentando la distensibilidad arterial, reduciendo la rigidez arterial o aumentando la elasticidad arterial. La rigidez arterial puede medirse por varios métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo los métodos discutidos en los Ejemplos.

[0030] Una medida de distensibilidad arterial global es el valor A_{carea} , el cual se calcula a partir del decaimiento diastólico de la onda de presión aórtica $[P(t)]$ usando el método del área (Liu et al. (1986) Am. J. Physiol.251:H588-H600), como se describe en el Ejemplo, abajo. Otra medida de distensibilidad arterial global se calcula como el cociente de volumen latido a presión de pulso (Chemla et al. (1998) Am. J. Physiol. 274:H500-H505), como se describe en el Ejemplo, abajo.

[0031] La distensibilidad arterial local puede determinarse midiendo la elasticidad de una pared arterial en un punto particular usando medios invasivos o no invasivos. Ver, p.ej., U.S. Patent No. 6,267,728. La distensibilidad regional, la cual describe la distensibilidad en un segmento arterial, puede calcularse a partir del volumen y la distensibilidad arterial, y se mide principalmente con el uso de la velocidad de la onda de pulso. Ver, p.ej., Ogawa et al., Cardiovascular Diabetology (2003) 2:10; Safar et al., Arch Mal Coer (2002) 95:1215-18. Otros métodos idóneos de medir la distensibilidad arterial se describen en la literatura, y puede usarse cualquier método conocido. Ver, p.ej., Cohn, J.N., "Evaluation of Arterial Compliance", en: Hypertension Primer, Izzo, J.L. and Black, H.R., (eds.), Pub. by Council on High Blood Pressure Research, American Heart Association, pp. 252-253, (1993); Finkelstein, S.M., et al., "First and Third-Order Models for Determining Arterial Compliance", Journal of Hypertension, 10 (Suppl. 6,) S11-S14, (1992); Haidet, G.C., et al., "Effects of Aging on Arterial Compliance in the Beagle", Clinical Research, 40, 266A, (1992); McVeigh, G.E., et al., "Assessment of Arterial Compliance in Hypertension", Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 2, 82-86, (1993).

30 Agonistas del receptor de relaxina.

[0032] Como se usa aquí, los términos "agonista del preceptor(sic) de relaxina" y "relaxina" se usan de forma intercambiable para referirse a polipéptidos de relaxina H2 biológicamente activos (también denominados aquí "farmacéuticamente activos") a partir de fuentes recombinantes o nativas (p.ej., de origen natural); variantes del polipéptido de relaxina, tales como variantes de la secuencia de aminoácidos; polipéptidos sintéticos de la relaxina; y agonistas no peptídicos del receptor de relaxina, p.ej., un mimético de relaxina.

[0033] La relaxina biológicamente activa de origen natural puede derivarse a partir de fuentes humanas, murinas (es decir, rata o ratón), porcinas, u otras fuentes de mamíferos. El término "relaxina" incluye la preprorrelaxina H2, prorrelaxina y relaxina; relaxina humana recombinante (rhRLX). Las secuencias de aminoácidos de la relaxina humana se describen en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de la relaxina humana se encuentran bajo los siguientes Nos. de Inclusión de GenBank: NP_604390 y NP_005050, prorrelaxina H2 humana. El término "agonista de receptor de la relaxina" incluye una relaxina humana derivada de cualquiera de las secuencias antes mencionadas.

[0034] El término "agonista del receptor de relaxina" también incluye un polipéptido de relaxina que comprenden las cadenas A y B que tienen truncamientos N- y/o C-. Por ejemplo, en la relaxina H2, la cadena A puede variar de A (1-24) a A(10-24) y la cadena B de B(-1-33) a B(10-22).

[0035] También incluido dentro del alcance del término "agonista del receptor de relaxina" son los polipéptidos de relaxina H2 que comprenden inserciones, sustituciones o supresiones de uno o más residuos de aminoácidos, variantes de glicosilación, relaxina no glicosilada, sales orgánicas e inorgánicas, derivados modificados covalentemente de relaxina, preprorrelaxina y prorrelaxina. También incluido en el término es un análogo de relaxina que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia salvaje (p.ej., de origen natural), incluyendo, pero no limitada a, análogos de relaxina divulgados en la U.S. Patent No. 5,811,395, y U.S. Patent No. 6,200,953. Otras relaxinas idóneas y formulaciones de relaxina se encuentra en la U.S. Patent No. 5,945,402. También se incluye un polipéptido de relaxina modificado para aumentar la vida media *in vivo*, p.ej., relaxina PEGilada (es decir, relaxina conjugada con un poli-etilenglicol), etc.

[0036] Posibles modificaciones a los residuos de aminoácidos del polipéptido de relaxina incluyen la acetilación, formilación o protección similar de grupos amino libres, incluyendo la amidación de los grupos N-terminal o C-terminal, o la formación de ésteres de grupos hidroxilo o carboxilo, p.ej., modificación del residuo triptófano (Trp) en B2 por 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 con un aminoácido diferente (incluyendo la forma D- de un aminoácido natural), incluyendo, pero no

limitado a, el reemplazo de la fracción Met en B24 con norleucina (Nle), valina (Val), alanina (Ala), glicina (Gly), serina (Ser) u homoserina (HomoSer). Otras posibles modificaciones incluyen la supresión de un aminoácido natural de la cadena o la adición de uno o más aminoácidos extra a la cadena. Modificaciones adicionales incluyen sustituciones de aminoácidos en las uniones B/C y C/A de prorrelaxina, cuyas modificaciones facilitan el clivaje de la cadena C de la prorrelaxina; y la relaxina variante que comprende un péptido C no natural, p.ej., como se describe en la U.S. Patent No. 5,759,807.

[0037] También se incluyen en el término “agonista del receptor de relaxina” los polipéptidos de fusión que comprenden un polipéptido de relaxina y un polipéptido heterólogo. Un polipéptido heterólogo compañero de fusión (p.ej., un polipéptido que no era relaxina) puede ser C-terminal o N-terminal a la porción de relaxina de la proteína de fusión. Los polipéptidos heterólogos incluyen polipéptidos inmunológicamente detectables (p.ej., “etiquetas epitópicas”); polipéptidos capaces de generar una señal detectable (p.ej., proteína verde fluorescente, enzimas tales como la fosfatasa alcalina y otras conocidas en la técnica); polipéptidos terapéuticos, incluyendo, pero no limitados a, citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento.

[0038] Tales variaciones o alteraciones en la estructura de la molécula de relaxina resultantes en variantes se incluyen dentro del alcance de esta invención en tanto se mantenga la actividad funcional (biológica) de la relaxina. En general, cualquier modificación de la secuencia de aminoácidos o estructura de relaxina ni aumenta su inmunogenicidad en el individuo tratado con la variante de relaxina. Esas variantes de relaxina que tienen la actividad funcional descrita pueden identificarse fácilmente usando los métodos discutidos aquí.

FORMULACIONES DE RELAXINA H2

[0039] Las formulaciones de relaxina idóneas para su uso en los métodos de la invención son formulaciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de relaxina farmacéuticamente activa, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La formulación en algunos contextos es inyectable y en algunos contextos está diseñada para inyección intravenosa.

[0040] Cualquier formulación conocida de relaxina puede usarse en los métodos de la presente invención, en tanto la relaxina sea farmacéuticamente activa. La relaxina “farmacéuticamente activa” es una forma de relaxina que resulta en una mayor distensibilidad arterial cuando se administra a un individuo.

[0041] La relaxina puede administrarse como un polipéptido, o como un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica relaxina. La relaxina idónea para el uso en los métodos de la presente invención puede aislarse a partir de fuentes naturales, puede sintetizarse química o enzimáticamente, o producirse usando técnicas recombinantes estándar conocidas en la técnica. Ejemplos de métodos para hacer relaxina recombinante se encuentran en varias publicaciones, incluyendo, p.ej., Patent Nos. 4,835,251; 5,326,694; 5,320,953; 5,464,756; and 5,759,807.

[0042] La relaxina idónea para su uso incluye, pero no se limita a, relaxina humana, relaxina humana recombinante, relaxina derivada de mamíferos no humanos, como relaxina porcina, y cualquiera de una variedad de variantes conocidas en la técnica. La relaxina, variantes farmacéuticamente activas de relaxina y formulaciones farmacéuticas que comprenden relaxina se conocen en la técnica. Ver, p.ej., U.S. Patent Nos. 5,451,572; 5,811,395; 5,945,402; 5,166,191; and 5,759,807, relacionadas con formulaciones de relaxina, y para enseñanzas relacionadas con la producción de relaxina. En los Ejemplos descritos aquí, la relaxina humana recombinante (rhRLX) es idéntica en la secuencia de aminoácidos al producto natural del gen H2 humano, consistiendo en una cadena A de 24 aminoácidos y una cadena B de 29 aminoácidos.

[0043] La relaxina puede administrarse a un individuo en la forma de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican relaxina. Las secuencias de nucleótidos que codifican relaxina son conocidas en la técnica, cualquiera de las cuales puede usarse en los métodos descritos aquí. Ver, p.ej., Inclusión en Gen Bank No. NM_005059. Los polinucleótidos y polipéptidos de relaxina de la presente invención pueden introducirse en una célula con un vehículo de administración genética. El vehículo de administración genética puede ser de origen viral o no viral (ver generalmente, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51-64; Kimura (1994) Human Gene Therapy 5:845-852; Connelly (1995) Human Gene Therapy 1:185-193; y Kaplitt (1994) Nature Genetics 6:148-153). Los vehículos de terapia genética para la administración de constructos que incluyen una secuencia de codificación de un polinucleótido de la invención puede administrarse de forma local o sistémica. Estos constructos pueden utilizar abordajes de vectores virales o no virales. La expresión de tales secuencias de codificación puede inducirse usando promotores mamíferos endógenos o heterólogos. La expresión de la secuencia de codificación puede ser constitutiva o regulada.

[0044] La presente invención puede emplear retrovirus recombinantes que se construyen para portar o expresar una molécula seleccionada de ácido nucleico de interés. Los vectores retrovirales que pueden emplearse incluyen los descritos en EP 415 731; WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; U.S. Patent No. 5,219,740; WO 93/11230; WO 93/10218; Vile and Hart (1993) Cancer Res. 53:3860-3864; Vile and Hart (1993) Cancer Res. 53:962-967; Ram et al. (1993) Cancer Res. 53:83-88; Takamiya et al. (1992) J. Neurosci. Res. 33:493-503; Baba et al. (1993) J. Neurosurg. 79:729-735; U.S. Patente n°. 4,777,127; y EP 345,242.

[0045] Las líneas celulares de empaque idóneas para el uso con los constructos de vectores virales antes descritos pueden prepararse fácilmente (ver publicaciones de PCT WO 95/30763 and WO 92/05266), y usarse para crear líneas celulares productoras (también denominadas líneas celulares vectoras) para la producción de partículas vectoras recombinantes. Las líneas celulares de empaque se hacen a partir de líneas celulares parentales humanas (tales como las células HT1080) o de visón, permitiendo así la producción de retrovirus recombinantes que pueden sobrevivir su inactivación en el suero humano.

[0046] Los vehículos de administración genética también pueden emplear parvovirus tales como vectores de virus asociados a adeno (AAV). Ejemplos representativos incluyen los vectores AAV mostrados por Srivastava en WO 93/09239, Samulski et al. (1989) J. Vir. 63:3822-3828; Mendelson et al. (1988) Virology 166:154-165; and Flotte et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10613-10617.

[0047] También de interés son los vectores adenovirales, p.ej., los descritos por Berkner, Biotechniques (1988) 6:616-627; Rosenfeld et al. (1991) Science 252:431-434; WO 93/19191; Kolls et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219; Kass-Eisler et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11498-11502; WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655.

[0048] Otros vehículos de administración genética y métodos pueden emplearse, incluyendo DNA policatiónico condensado unido o no a adenovirus muerto solamente, por ejemplo Curiel (1992) Hum. Gene Ther. 3:147-154; DNA unido a ligando, por ejemplo, ver Wu (1989) J. Biol. Chem. 264:16985-16987; células eucariotas de vehículos de administración celular; deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizado; pistola de partícula de transferencia genética manual, como la descrita en la U.S. Patent No. 5,149,655; radiación ionizante como la descrita en la U.S. Patent No. 5,206,152 y en WO 92/11033; neutralización de carga nucleica o fusión con membranas celulares. Abordajes adicionales se describen en Philip (1994) Mol. Cell Biol. 14:2411-2418, y en Woffendin (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:1581-1585.

[0049] También puede emplearse DNA desnudo. Métodos ilustrativos de introducción de DNA desnudo se describen en WO 90/11092 y en la U.S. Patent No. 5,580,859. La eficiencia de captación puede aumentarse usando perlas de látex biodegradable. Las perlas de látex cubiertas con DNA son transportadas eficientemente a las células luego del inicio de la endocitosis por las perlas. El método puede mejorarse más con el tratamiento de las perlas para aumentar la hidrofobia y así facilitar la disrupción del endosoma y liberación del DNA en el citoplasma. Los liposomas que pueden actuar como vehículos de administración genética se describen en la U.S. Patent No. 5,422,120; PCT Nos. WO 95/13796, WO 94/23697, y WO 91/14445; y EP No. 524 968.

[0050] La administración no viral idónea para su uso incluye sistemas de administración mecánicos tales como el abordaje descrito en Woffendin et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11581-11585. Asimismo, la secuencia de codificación y su producto de expresión pueden administrarse a través de la deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizado. Otros métodos convencionales para la administración genética que pueden usarse para la administración de la secuencia de codificación incluyen, por ejemplo, el uso de la pistola de partículas de transferencia genética manual, como se describe en la U.S. Patent No. 5,149,655; el uso de radiación ionizante para activar el gen transferido, como se describe en la U.S. Patent No. 5,206,152 y PCT No. WO 92/11033.

[0051] Al emplear relaxina para aumentar la distensibilidad arterial, puede usarse cualquier modo farmacéuticamente aceptable de administración. La relaxina puede administrarse sola o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo formas de dosis sólidas, semisólidas, líquidas o en aerosol, tales como, por ejemplo, tabletas, cápsulas, polvos, líquidos, geles, suspensiones, supositorios, aerosoles, etc. La relaxina también puede administrarse en formas de dosificación de liberación sostenida o controlada (p.ej., empleando un sistema de administración bioerosionable de liberación lenta), incluyendo inyecciones depot, bombas osmóticas (como el implante Alzet hecho por Alza), píldoras, parches transdérmicos y transcutáneos (incluyendo electrotransporte), etc., para la administración prolongada a una tasa predeterminada, preferiblemente en formas de dosis de unidad idóneas para la administración única de dosis precisas.

[0052] En algunos contextos, la relaxina se administra usando un sistema implantable de administración del medicamento, p.ej., un sistema que es programable para proporcionar la administración de relaxina. Sistemas implantables ilustrativos programables incluyen bombas de infusión implantables. Las bombas de infusión implantables ilustrativas, o equipos útiles en conexión con tales bombas, se describen, por ejemplo, en las U.S. Pat. N°s. 4,350,155; 5,443,450; 5,814,019; 5,976,109; 6,017,328; 6,171,276; 6,241,704; 6,464,687; 6,475,180; y 6,512,954. Un equipo ilustrativo más que puede adaptarse en la presente invención es la bomba de infusión Synchroned (Medtronic).

[0053] Las composiciones incluirán típicamente un portador farmacéutico convencional o excipiente y relaxina. Además, estas composiciones pueden incluir otros agentes activos, portadores, coadyuvantes, etc. Generalmente, dependiendo del modo pretendido de administración, la composición farmacéuticamente aceptable contendrá entre 0.1% y 90%, entre 0.5% y 50% o entre 1% y 25%, por peso de relaxina, siendo el resto excipientes farmacéuticos idóneos, portadores, etc. Los métodos reales de preparar tales formas de dosis son conocidos, o son claros, para los

expertos en la materia; por ejemplo, ver Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15th Edition, 1995, o su edición más reciente. Las formulaciones de relaxina humana descritas en la U.S. Pat. No. 5,451,572 son ejemplos no limitantes de formulaciones idóneas que pueden usarse en los métodos de la presente invención.

5 **[0054]** La administración parenteral generalmente se caracteriza por la inyección, sea subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa, o subcutánea. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, como soluciones líquidas o suspensiones, formas sólidas idóneas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes idóneos son, por ejemplo, agua, solución fisiológica, dextrosa, glicerol, etanol, etc. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas a administrarse también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsificantes, agentes amortiguadores del pH, aumentadores de solubilidad, etc., tales como por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitan, oleato de trietanolamina, ciclodextrinas, etc.

15 **[0055]** El porcentaje de relaxina contenido en tales composiciones parenterales depende mucho de su naturaleza específica, así como de las necesidades del sujeto. Sin embargo, se emplean porcentajes de ingrediente activo de 0.01% a 10% en solución, y serán mayores si la composición es un sólido que será posteriormente diluido a los porcentajes anteriores. En general, la composición comprenderá 0.2-2% de la relaxina en solución.

20 **[0056]** La administración parenteral puede emplear la implantación de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de forma que se mantiene un nivel constante de dosis. En la técnica se conocen varias matrices (p.ej., polímeros, geles hidrofílicos, etc.) para controlar la liberación sostenida, y para disminuir progresivamente la tasa de liberación de agentes activos tales como relaxina. Ver, p.ej., U.S. Pat. No. 3,845,770 (describiendo las bombas osmóticas elementales); U.S. Pat. Nos. 3,995,651, 4,034,756 y 4,111,202 (describiendo las bombas osmóticas en miniatura); U.S. Pat. Nos. 4,320,759 y 4,449,983 (describiendo sistemas osmóticos de multicámara denominados como bombas osmóticas de botón de presión y de presión-masa fundida); y la U.S. Pat. No. 5,023,088 (describiendo bombas osmóticas con el patrón para la dispensación secuencial de varias unidades de dosis).

25 **[0057]** Los equipos de liberación de medicamento idóneos para el uso en la administración de relaxina de acuerdo con los métodos de la invención pueden basarse en cualquiera de una variedad de modos de operación. Por ejemplo, el equipo de liberación del medicamento puede basarse en un sistema difusivo, un sistema convectivo, o un sistema erosionable (p.ej., un sistema basado en erosión). Por ejemplo, el equipo de liberación del medicamento puede ser una bomba osmética, una bomba de presión por vapor, o una matriz de rebosamiento osmético, p.ej., donde el medicamento se incorpora en un polímero y el polímero proporciona la liberación de la formulación del medicamento concomitante con la degradación de un material polimérico impregnado del medicamento (p.ej., un material polimérico biodegradable impregnado del medicamento). En otros contextos, el equipo de liberación del medicamento se basa en un sistema de electrodifusión, una bomba electrolítica, una bomba efervescente, una bomba piezoeléctrica, un sistema hidrolítico, etc.

30 **[0058]** Los equipos de liberación del medicamento basados en una bomba de infusión mecánica o electromecánica, también son idóneos para su uso con la presente invención. Ejemplos de tales equipos incluyen los descritos en, por ejemplos, las U.S. Pat. N°s. 4,692,147; 4,360,019; 4,487,603; 4,360,019; 4,725,852, y similares. En general, los presentes métodos de tratamiento pueden cumplirse usando cualquiera de una variedad de sistemas de bomba rellenables no intercambiables. Las bombas osmóticas han sido ampliamente descritas en la literatura. Ver, p.ej., WO 97/27840; y U.S. Pat. N°s. 5,985,305 y 5,728,396.

35 **[0059]** Relaxina puede administrarse por un período de horas, días, semanas, meses o años, dependiendo de varios factores, incluyendo el grado de rigidez arterial, etc. Por ejemplo, relaxina se administra por un período de tiempo entre unas 2 horas a unas 8 horas, entre unas 8 horas a unas 12 horas, entre unas 12 horas a unas 24 horas, entre unas 24 horas a unas 36 horas, entre unas 36 horas a unas 72 horas, entre unos 3 días a una semana, entre una semana a unas 2 semanas, entre unas dos semanas a 1 mes, entre 1 mes a unos 3 meses, entre unos 3 meses a unos 6 meses, entre unos 6 meses a unos 12 meses o entre 1 año a varios años. La administración puede ser constante, p.ej., infusión constante por un período de horas, días, semanas, meses, años, etc. Alternativamente, la administración puede ser intermitente, p.ej., relaxina puede administrarse una vez al día por un período de días, una vez por horas por un período de horas o cualquier otro esquema que se considere idóneo.

40 **[0060]** Las formulaciones de relaxina también pueden administrarse al tracto respiratorio como un aerosol de inhalación nasal o pulmonar o solución para nebulizar, o como un polvo microfino para insuflación, solo o combinado con un portador inerte como lactosa, o con otros excipientes farmacéuticamente aceptables. En tal caso, las partículas de la formulación pueden tener ventajosamente diámetros de menos de 50 micrómetros, preferiblemente menos de 10 micrómetros.

TERAPIAS DE COMBINACIÓN

45 **[0061]** En algunos contextos, un método sujeto se modifica para incluir la administración de al menos un agente terapéutico adicional. Agentes terapéuticos adicionales idóneos incluyen, pero no se limitan a, moduladores del

receptor de estrógeno; antihipertensivos tales como bloqueantes del canal de calcio, antagonistas del receptor de endotelina, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina-I (ACE), bloqueantes adrenérgicos α , vasodilatadores, diuréticos, bloqueantes adrenérgicos β , inhibidores de renina, y antagonistas del receptor de angiotensina; péptidos natriuréticos (p.ej., péptido natriurético auricular, péptido natriurético cerebral, y péptido natriurético tipo C); agentes para bloquear la producción de colesterol (p.ej., estatinas) y agentes usados para tratar la diabetes.

Moduladores del receptor estrogénico

[0062] Moduladores del receptor estrogénico idóneos incluyen cualquiera de una variedad de compuestos estrogénicos, así como Moduladores Selectivos del Receptor Estrogénico ("SERMs"). Los SERMs incluyen, pero no se limitan a, tamoxifeno, raloxifeno, droloxifeno, idoxifeno, lasofoxifeno, CP-336,156, GW5638, LY353581, TSE-424, LY353381, LY117081, toremifeno, fulvestrant, 4-[7-2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-1-piperidinil)etoxi]fenil]-2H-1-benzopiran-3-il]-fenil-2,2-dimetilpropanoate, 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenil-hidrazona, y SH646.

[0063] Los compuestos estrogénicos idóneos incluyen, pero no se limitan a, mestranol, un éster de estradiol, fosfato de poliestriol, sulfato de estrona, estrógenos naturales, estrógenos sintéticos, estrógenos conjugados, estradiol, sulfamatos de estradiol, valerato de estradiol, benzoato de estradiol, etinil estradiol, estrona, estriol, succinato de estriol y estrógenos conjugados, estrógeno equino aconjugado, sulfato de estrona, sulfato de 17β -estradiol, sulfato de 17α -estradiol, sulfato de equilina, sulfato de 17β -dihidroequilina, sulfato de 17α -dihidroequilina, sulfato de equilenina, sulfato de 17β -dihidroequilenina y sulfato de 17α -dihidroequilenina.

[0064] También idóneas para su uso son las formas micronizadas de los estrógenos, como estradiol micronizado, sulfamatos de estradiol micronizado, valerato de estradiol micronizado, benzoato de estradiol micronizado, estrona micronizada o sulfato de estrona micronizada o sus mezclas, estradiol notablemente micronizado, valerato de estradiol micronizado, benzoato de estradiol micronizado o sulfamatos de estradiol micronizado.

[0065] Las dosis efectivas de los estrógenos son convencionales y bien conocidas en la técnica. Las dosis aproximadas típicas para la administración oral son, p.ej., etinil estradiol (0.001-0.030 mg/día), mestranol 5-25 mcg/día, estradiol (incluyendo 17β -estradiol), (0.5-6 mg/día), fosfato de poliestriol (2-8 mg) y estrógenos conjugados (0.3-1.2 mg/día). Las dosis para otros medios de administración serán evidentes para los expertos en la materia. Por ejemplo, las dosis trasdérmicas variarán de acuerdo con la eficacia de adsorción del vehículo empleado.

[0066] Los compuestos estrogénicos pueden administrarse por cualquiera de una variedad de modos convencionales, incluyendo, p.ej., orales (p.ej., soluciones, suspensiones, tabletas, grageas, cápsulas o píldoras), parenterales (incluyendo inyección subcutánea o inyección intravenosa, intramuscular o intrasternal o técnicas de infusión), spray de inhalación, administración trasdérmica, rectal o vaginal (p.ej., por anillos o cremas vaginales).

Agentes antihipertensivos

[0067] Los inhibidores idóneos de la ACE incluyen, pero no se limitan a, benazepril (Lotensin®), captopril (Capoten®), enalapril, enalaprilat, fosinopril (Monopril®), lisinopril (Zestril®; Prinivil®), pentopril, quinapril (Accupril®), quinaprilat, Ramipril (Altace®), trandolapril (Mavik®), zofenopril, moexipril (Univasc®), perindopril (Coversyl®; Aceon®), Vasotec®, cilazapril (Inhibace®).

[0068] Los diuréticos idóneos incluyen, pero no se limitan a, acetazolamida; amilorida; bendroflumetiazida; benzotiazida; bumetanida; clorotiazida; clortalidona; ciclotiazida; ácido etacrínico; furosemida; hidroclorotiazida; hidroflumetiazida; indacrinona (mezcla racémica, o como el enantiómero (+) o (-) solo, o un cociente manipulado, p.ej., 9:1 de los enantiómeros dichos, respectivamente); metolazona; meticlotiazida; muzolimina; polítiazida; quinetazona; etacrinato de sodio; nitroprusiato de sodio; ticinafeno; triamtereno; y triclormetiazida.

[0069] Los agentes bloqueantes α -adrenérgicos idóneos incluyen, p.ej., dibenammina; fentolamina; fenoxibenzamina; prazosin; prazosin/polítiazida (Minizide®); tolazolina; doxazosina (Cardura); terazosina (Hytrin®); tamsulosina (Flomax®); y al fuzosima (Uroxatral®).

[0070] Los agentes bloqueantes β -adrenérgicos idóneos incluyen, pero no se limitan a, Betapace (sotalol), Blocadren (timolol), Brevibloc (esmolol), Cartrol (carteolol), Coreg (carvedilol), Corgard (nadolol), Inderal (propranolol), Inderal-LA (propranolol), Kerlone (betaxolol), Levatol (penbutolol), Lopressor (metoprolol), Normodyne (labetalol), Sectral (acebutolol), Tenormin (atenolol), Toprol-XL (metoprolol), Trandate (labetalol), Visken (pindolol), y Zebeta (bisoprolol).

[0071] Los vasodilatadores idóneos incluyen, pero no se limitan a, diazóxido, hidralacina (Apresoline®), minoxidil, nitroprusiato (Nipride®), nitroprusiato de sodio, diazóxido (Hyperstat IV), verapamil y nifedipina.

[0072] Los bloqueantes del canal de calcio idóneos incluyen, pero no se limitan a, amlodipina (Norvasc®), felodipina (Plendil®), nimodipina, isradipina, nicardipina, nifedipina (Procardia®), bepridil (Vasacor®), diltiazem (Cardiazem®), y verapamil (Isoptin®; Calan®).

5 **[0073]** Los bloqueantes o inhibidores del receptor de la angiotensina idóneos incluyen, pero no se limitan a, saralasin, losartan (Cozaar), ciclosidomine, eprosartan, furosemida(SIC), irbesartan, y valsartan.

10 **[0074]** Los inhibidores de renina idóneos incluyen, p.ej., pepstatina y los inhibidores di- o tripéptidos de renina; enalkrenina; RO 42-5892 (Hoffman LaRoche), A 65317 (Abbott), CP 80794, ES 1005, ES 8891, SQ 34017; un compuesto como se muestra en la U.S. Patente No. 6,673,931; y similares.

15 **[0075]** Los antagonistas de endotelina idóneos útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, atrasentan (ABT- 627; Abbott Laboratories), Veletri™ (tezosentan; Actelion Pharmaceuticals, Ltd.), sitaxsentan (ICOS-Texas Biotechnology), enrasentan (GlaxoSmithKline), darusentan (LU135252; Myogen) BMS-207940 (Bristol-Myers Squibb), BMS- 193884 (Bristol-Myers Squibb), BMS-182874 (Bristol-Myers Squibb), J-104132 (Banyu Pharmaceutical), VML 588/Ro 61-1790 (Vanguard Medica), T-0115 (Tanabe Seiyaku), TAK-044 (Takeda), BQ-788 (Banyu Pharmaceutical), BQ123, YM-598 (Yamanouchi Pharma), PD 145065 (Parke-Davis), A-127722 (Abbott Laboratories), A-192621 (Abbott Labora- tories), A-182086 (Abbott Laboratories), TBC3711 (ICOS-Texas Biotechnology), BSF208075 (Myogen), S-0139 (Shiono- gi), TBC2576 (Texas Biotechnology), TBC3214 (Texas Biotechnology), PD156707 (Parke-Davis), PD180988 (Parke- Davis), ABT-546 (Abbott Laboratories), ABT-627 (Abbott Laboratories), SB247083 (GlaxoSmithKline), SB 209670 (GlaxoSmithKline); y antagonistas del receptor de endotelina discutidos en la técnica, p.ej., Davenport and Battistini (2002) Clinical Science 103:15-35, Wu-Wong et al. (2002) Clinical Science 103:1075-1115, y Luescher and Barton (2000) Circulation 102:2434-2440. Un antagonista del receptor de endotelina idóneo es TRACLEER™ (bosentan; producido por Actelion Pharmaceuticals, Ltd.).

20 TRACLEER™ es un antagonista dual del receptor de endotelina activo por vía oral, y bloquea la unión de la endotelina a sus receptores A y B de endotelina. TRACLEER™ generalmente se administra a una dosis de 62.5 mg bid por vía oral por 4 semanas, seguido por una dosis de mantenimiento de 125 mg bid por vía oral.

30 **[0076]** Otros antihipertensivos idóneos incluyen, p.ej., aminofilina; acetatos y tanatos de criptenamina; deserpidina; meremetoxifilina procaína; pargilina; clonidina (Catapres); metildopa (Aldomet); reserpina (Serpasil); guanetidina (Ismelin); y camsilato de trimetafán.

Estatinas

35 **[0077]** Las estatinas idóneas incluyen, sin limitación, productos tales como Crestor, Lipitor, Lescol, Mevacor, Pravochol, Zocor y compuestos relacionados tales como los discutidos, p.ej., en Rev. Port. Cardio. (2004) 23(11):1461-82; Curr Vasc Pharmacol. (2003) 3:329-33.

Agentes terapéuticos para tratar la diabetes tipo 1 o tipo 2

40 **[0078]** Otros agentes idóneos para su uso en una terapia combinada con relaxina incluyen agentes terapéuticos para tratar la diabetes tipo 1, y agentes terapéuticos para tratar la diabetes tipo 2 (p.ej., agentes que aumentan la sensibilidad a la insulina).

Insulina

45 **[0079]** Los agentes terapéuticos para tratar la diabetes tipo 1 incluyen cualquier forma de insulina, en tanto la insulina sea biológicamente activa, es decir, la insulina es efectiva reduciendo los niveles sanguíneos de insulina en un individuo que responde a la insulina. En algunos contextos, se usa insulina humana recombinante (insulina "regular") o un análogo recombinante de insulina humana. En un contexto particular, el análogo de insulina es una forma monomérica de insulina, p.ej., lispro humana. En algunos casos, otras formas de insulina se usan solas o en combinación con insulina humana recombinante. La insulina que es idónea para su uso aquí incluye, pero no se limita a, insulina regular (Humulin R, Novlin R, etc.), semilenta, NPH (suspensión de insulina isofana; Humulin N, Novolin N, Novolin N PenFill, NPH lletil II, NPH-N), lenta (suspensión de insulina zinc; Humulin L, Lente lletin II, Lent N, Novolin N), insulina zinc protamina (PZI), ultralenta (suspensión de insulina zinc, extendida; Humulin U Ultralenta), insulina glargina (Lantus), insulina aspart (Novolog), insulina acilada, insulina monomérica, insulina superactiva, insulina hepatoselectiva, lispro (Humalog™), y otros análogos o derivados de insulina, y mezclas de cualquiera de las anteriores. Las mezclas comúnmente usadas incluyen mezclas de NPH e insulina regular que contienen los siguientes porcentajes de NPH e insulina regular: 70%/30%, 50%/50%, 90%/10%, 80%/20%, 60%/40%, y similares. La insulina que es idónea para su uso aquí incluye, pero no se limita a, las formas de insulina mostradas en las U.S. Patents Nos. 4,992,417; 4,992,418; 5,474,978; 5,514,646; 5,504,188; 5,547,929; 5,650,486; 5,693,609; 5,700,662; 5,747,642; 5,922,675; 5,952,297; and 6,034,054; y aplicaciones publicadas de PCT WO 00/121197; WO 90/10645; y WO 90/12814. Los análogos de insulina incluyen, pero no se limitan a, análogos de insulina superactiva, insulinas monoméricas y análogos de insulina hepatospecíficos.

60

65

[0080] Los análogos de insulina superactiva tienen una actividad elevada sobre la insulina humana natural. Por consiguiente, tal insulina puede administrarse en cantidades sustancialmente menores mientras se obtiene sustancialmente el mismo efecto con respecto a la reducción de los niveles séricos de glucosa. Los análogos superactivos de insulina, incluyen, e.g., insulina humana 10-ácido aspártico-B; insulina humana despentapéptido (B26-B30)→ Asp^{B10}, Tyr³²⁵-α-carboxamida; insulina humana (B26-B30)→ glu^{B10}, Tyr^{B25}-α-carboxamida; insulina destripéptido B28-30; una insulina con ácido γ-aminobutírico sustituido por A13Leu-A14Tyr; y análogos de insulina similares de la fórmula insulina humana des(B26-B30)→ X^{B10}, Tyr^{B25}-α-carboxamide, en la cual X es un residuo sustituido en la posición 10 de la cadena B. Estos análogos de insulina tienen potencias entre 11 y 20 veces la de la insulina humana natural. Todos los análogos de insulina antes descritos implican sustituciones de aminoácidos a lo largo de las cadenas A o B de la insulina humana natural, lo cual aumenta la potencia del compuesto o cambia otras propiedades del compuesto. La insulina monomérica incluye, pero no se limita, a lispro.

[0081] Los derivados de insulina incluyen, pero no se limitan a, insulina acilada, insulina glicosilada, y similares. Ejemplos de insulina acilada incluyen las mostradas en la U.S. Patent No. 5,922,675, p.ej., insulina derivatizada con un ácido graso C₆-C₂₁ (p.ej., ácido mirístico, pentadecílico, palmítico, heptadecílico o esteárico) en un aminoácido-α o -ε de glicina, fenilalanina o lisina.

Agentes que aumentan la sensibilidad a la insulina

[0082] En algunos contextos, un régimen de tratamiento para tratar a un individuo con diabetes tipo 2 comprenden administrar un agente adicional que reduce la resistencia a la insulina (p.ej., aumenta la sensibilidad a la insulina). Los agentes idóneos que tratan la resistencia a la insulina incluyen pero no se limitan a, una biguanida como metformina (p.ej., administrada en una cantidad de 500mg u 850 mg tres veces al día), fenformina o una sal de ellas; un compuesto tiazolidinediónico como troglitazona (ver, p.ej., U.S. Pat. No. 4,572,912), rosiglitazona (SmithKlineBeecham), pioglitazona (Takeda), Glaxo-Wellcome's GL-262570, englitazona (CP-68722, Pfizer) o darglitazona (CP-86325, Pfizer, isaglitazona (MCC-555; Mit-subishi; ver, p.ej., U.S. Pat. No. 5,594,016), reglitazar (JTT-501), L-895645 (Merck), R-119702 (Sankyo/WL), NN-2344, YM-440 (Yamanouchi), Ragaglitazar (NNC 61-0029 o DRF2725; NovoNordisk), farglitazar (GI262570), tesaglitazar (AZ 242), KRP-297, y similares; y combinaciones tales como Avandamet™ (maleato de rosiglitazona y clorhidrato de metformina).

SUJETOS IDÓNEOS PARA EL TRATAMIENTO

[0083] Los individuos que son idóneos para el tratamiento con un método registrado incluyen a cualquier individuo que tenga rigidez arterial (o distensibilidad arterial reducida) y un trastorno asociado con o que resulta de, la distensibilidad arterial reducida, seleccionado a partir de la aterosclerosis, coronariopatía, disfunción diastólica, hipercolesterolemia familiar, hipertrofia ventricular izquierda, rigidez arterial asociada con tabaquismo de larga data, rigidez arterial asociada con obesidad, rigidez arterial asociada con la edad, lupus eritematoso sistémico e hipercolesterolemia.

[0084] Particularmente idóneos para el tratamiento son los individuos cuya distensibilidad arterial global medida está disminuida en relación con un individuo sano en una situación similar. También particularmente idóneos para el tratamiento son los individuos con una distensibilidad arterial local medida la cual está disminuida en relación con la distensibilidad arterial local esperada en un individuo sano en una situación similar. Los individuos con una distensibilidad arterial regional medida la cual está disminuida en relación con la esperada en individuos sanos similarmente también son particularmente idóneos para el tratamiento. En algunos casos, la distensibilidad arterial global, local o regional de un individuo en diferentes puntos en el tiempo puede medirse y compararse para determinar si la distensibilidad arterial en ese individuo está disminuyendo y acercándose a niveles que indican que la intervención es apropiada.

[0085] Los individuos que son idóneos para el tratamiento con un método registrado incluyen individuos que han desarrollado, o estén en riesgo de desarrollar, rigidez arterial asociada con la edad. Tales individuos incluyen humanos que son mayores de 50 años de edad, p.ej., humanos que tienen entre 50 años y 60 años de edad, entre 60 y 65 años de edad, entre 65 años y 70 años de edad, entre 70 años y 75 años de edad, entre 75 años y 80 años de edad o más.

[0086] También idóneas para el tratamiento con un método registrado son las mujeres perimenopáusicas, mujeres menopáusicas, mujeres posmenopáusicas, y las mujeres que han cesado sus menstruaciones por razones no relacionadas con la edad, p.ej., como resultado de cirugía (p.ej., histerectomía, ooforectomía), y así han desarrollado, o están en riesgo de desarrollar, rigidez arterial. Tales mujeres pueden ser tratadas con una terapia combinada que incluya relaxina y estrógeno. Tales mujeres también pueden ser tratadas con una terapia combinada que incluya relaxina, estrógeno y un antihipertensivo.

EJEMPLOS

[0087] Los siguientes ejemplos se proponen para proporcionar a los expertos en la materia una muestra y descripción completa de cómo hacer uso de la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni pretenden representar que los experimentos a continuación son todos los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos por asegurar la precisión con respecto a los números usados (p.ej., cantidades, temperatura, etc.) pero deben tomarse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes por peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura es en grados Celsius y la presión es en o casi atmosférica. Pueden usarse abreviaturas estándar, p.ej., bp, pares de bases; kb, kilobases; pl, picolitros; s o seg, segundos; min, minutos; h o hr, horas; aa, aminoácidos; kb, kilobases; bp, pares de bases; nt, nucleótidos; i.m., intramuscular; i.p., intraperitoneal; s.c., subcutáneo; y similares.

Ejemplo 1: Efecto de relaxina sobre la resistencia y distensibilidad arterial sistémicaMÉTODOSAnimales

[0088] Se adquirieron ratas hembras Long-Evans de 12-14 semanas de edad en Harlan Sprague-Dawley (Frederick, Maryland EEUU). Se les proporcionó dieta PROLAB RMH 2000 que contenía 0.48% sodio (PME Feeds Inc., St. Louis, MO EEUU) y agua *ad libitum*. Las ratas fueron mantenidas en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. El Comité Institucional de Atención y Uso de Animales del Magee-Womens Research Institute aprobó todos los procedimientos en animales.

Preparación quirúrgica

[0089] En resumen, las ratas fueron habituadas a jaulas de metabolismo Nalgene por una semana (VWR Scientific Products), seguido por habituación a un ensamblaje de arnés/muelle de 7.5 cm por otra semana mientras estaban en la jaula de metabolismo (Harvard Apparatus, Holliston, MA EEUU). A los animales se les ajustó el arnés bajo anestesia con isoflurano. Luego de este período de habituación, las ratas fueron anestesiadas con 60 mg/kg quetamina i.m. y 21 mg/kg pentobarbital i.p., y fueron colocadas en decúbito prono sobre un lecho de calefacción. Luego de aplicar 70% etanol y betadine a todas las áreas expuestas de la piel, se administró ampicilina s.c. (0.2 ml de una solución de 125 mg/ml) y también se administró atropina s.c. (0.075 ml de una solución de 0.4 mg/ml). Luego se ensartó a través del muelle un catéter tygon estéril (18 de largo, 0.015 en ID, 0.030 OD) conectado a una jeringa que contenía solución de Ringer, así como una microsonda estéril de termodilución (22 cm de largo, F #1.5; Columbus Instruments, Columbus, OH USA). El catéter tygon fue ensartado posteriormente a través del agujero en el arnés y luego se insertó por vía subcutánea desde el punto medio entre ambos hombros a la pequeña incisión detrás de la oreja usando un trócar calibre 18.

[0090] El catéter de termodilución también se ensartó a través del ensamblaje del arnés y luego se insertó por vía subcutánea desde el punto medio entre las escápulas a la incisión en la piel en el margen costal izquierdo. El muelle fue luego unido de nuevo al arnés. La rata fue reposicionada sobre su espalda. Se hizo una incisión en la piel de 1.0 cm en la región inguinal izquierda. Se aisló la arteria ilíaca externa y se preparó para cateterización. El termopar se insertó por vía subcutánea saliendo en la incisión inguinal. El termopar se insertó luego en la arteria ilíaca externa en dirección rostral, de forma que pasó fácilmente en la arteria ilíaca interna y posteriormente en la aorta. A los 4.0 cm, el termopar estaba aproximadamente a 1.0 cm por debajo de la arteria renal izquierda. Luego se hizo una incisión horizontal de 2.0 cm sobre la tráquea, 1.0 cm por encima de la muesca cricoidea.

[0091] A través de esta incisión, se disecó un bolsillo subcutáneo en el cuello y encima del hombro izquierdo. Luego se aislaron la vena yugular y arteria carótida derechas y se prepararon para su cateterización, esto último facilitado colocando un pequeño rollo de gasa debajo del cuello para elevar esta estructura profunda. Usando el trócar calibre 18, se insertó el catéter tygon por vía subcutánea desde la pequeña incisión detrás de la oreja derecha fuera de la incisión del cuello. El catéter tygon se implantó en la vena yugular derecha a 3.0 cm, colocando así la punta del catéter en la confluencia de la vena cava anterior y el apéndice auricular derecho. La batería/transmisor de un catéter de presión estéril de ratón (TA11PA-C20; ca. F #1.2; Data Sciences International, St. Paul, MN USA) se insertó en el bolsillo subcutáneo. El catéter de presión de ratón se implantó luego en la carótida derecha 2.8 cm, colocando así la punta del catéter en la confluencia de la carótida derecha y el arco aórtico. Todas las heridas se cerraron con seda 4-0 o autoclips. Luego de instilar 0.05 ml de una solución de heparina en el catéter yugular y conectarlo con un pin recto, la rata fue colocada en la jaula de metabolismo y se le dio ampicilina en el agua de beber por 2 días (100 mg/50 ml con 2 cucharadas de dextrosa). El muelle y los catéteres que salían de la parte superior de la jaula se aseguraron.

[0092] Se administró terbutrol por vía s.c. para analgesia post-operatoria tan pronto como las ratas se recuperaron lo suficiente de la anestesia. Para la administración de dosis bajas de relaxina humana recombinante (4.0 $\mu\text{g/h}$ rhRLX) por 10 días, se insertaron dos minibombas osmóticas Alzet modelo 2002 (Durect Corporation, Curpertino, CA USA) por vía subcutánea en la espalda del animal bajo anestesia con isoflurano. Para la administración de dosis altas por 10 días (25 $\mu\text{g/h}$), se implantó una minibomba osmótica Alzet modelo 2ML2. Luego de completar la medición para el último punto de tiempo, la rata fue anestesiada con 60 mg/kg pentobarbital i.v. Se obtuvo sangre de la aorta abdominal para los niveles de rhRLX, osmolalidad y hematocrito. Se registró la posición del catéter yugular en relación con la aurícula derecha, la colocación del catéter de presión en relación con el arco aórtico y la posición del termopar en relación con la arteria renal izquierda.

Estudios *In vivo*: Hemodinámica y propiedades mecánicas arteriales sistémicas

[0093] Se realizaron primero estudios de control de tiempo en 5 ratas, para documentar la estabilidad de la hemodinámica sistémica en un período de 17 días después de la cirugía. Las mediciones se registraron los días 4-5, 7-8, 9-10, 13-14, y 16-17 después de la cirugía. Los protocolos con dosis baja y alta de rhRLX incluyeron 6 y 7 ratas, respectivamente. Además, se administró el vehículo para rhRLX (20mM acetato de sodio, pH 5.0) a otras 6 ratas. Luego de 2 mediciones basales de la hemodinámica sistémica los días 5 y 7 después de la cirugía, se administró la dosis baja o alta de rhRLX por minibomba osmótica. La hemodinámica sistémica se evaluó de nuevo los días 3, 6, 8 y 10 días después de iniciar la infusión de rhRLX o vehículo.

[0094] Cada medición consistió en 4 a 6 registros de ondas de gasto cardiaco y presión arterial que se obtuvieron cuando la rata estaba durmiendo o en reposo. Se permitieron al menos 10 min entre registros. Estas mediciones se obtuvieron entre las 9am y 3pm.

[0095] *Gasto cardiaco*. Para medir el gasto cardiaco, usamos la técnica de termodilución. Osborn et al. (1986) Am. J. Physiol. 251:H1365-H1372. Se inyectó solución de Ringer de volumen y temperatura conocidos en la vena cava anterior usando el Micro Injector 400 (Columbus Instruments). El gasto cardiaco se calculó a partir del cambio en temperatura de la sangre (Cardiotherm 400R, Columbus Instruments). El gasto cardiaco determinado por el Cardiotherm 400R se calculó como:

[0096] $CO = [(B_T - I_T) \cdot V_i] / f B_T(t)$ donde B_T es la temperatura de la sangre (registrada por el termopar implantado en la aorta abdominal), I_T es la temperatura del inyectado (temperatura ambiente), V_i es el volumen del inyectado (150 μL), y $B_T(t)$ es la temperatura de la sangre como función del tiempo.

[0097] *Presión arterial*. La presión aórtica instantánea se registró usando un sistema de telemetría de presión arterial (Data Sciences International, St. Paul, MN USA). Mills et al. (2000) J. Appl. Physiol. 88:1537-1544. La presión aórtica se registró con un catéter de presión implantado en el arco aórtico a través de la carótida derecha y transmitido a un receptor externo. La presión aórtica en estado estable se digitalizó en línea usando un sistema de adquisición de datos basado en PC con resolución de 16 bits y tasa de muestra de 2000 Hz y almacenado como archivos de texto para análisis fuera de línea. Cada medición consistía en una duración de muestra de 30 segundos.

[0098] *Análisis de presión aórtica*. El análisis de los datos adquiridos y cálculos de la AC glonal se realizó con un programa computarizado adaptado y desarrollado usando software MATLAB (MathWorks Inc., Natick, MA USA). En resumen, se seleccionaron latidos individuales (3 -15 ciclos) de los 10 segundos del registro de la presión aórtica, inmediatamente precedentes a la medición del gasto cardiaco. El ensamblaje se promedió como describieron Burattini et al. ((1985) Comput. Biomed. Res. 18:303-312) para rendir un solo latido representativo para cada latido. La presión arterial media (MAP), presión sistólica pico (P_s) y presión de fin de diástole (P_d) se calcularon a partir de este latido promedio. La presión de pulso (P_p) se calculó como $P_s - P_d$. La resistencia vascular sistémica (SVR) se calculó dividiendo la MAP por la CO.

[0099] *Distensibilidad arterial global*. Se calcularon dos medidas de distensibilidad arterial global. La primera (A_{area}) se calculó a partir del decaimiento diastólico de la onda de presión aórtica [$P(t)$] usando el método del área (2): $A_{area} = A_d / [SVR(P_1 - P_2)]$ donde P_1 y P_2 son las presiones al inicio y al final de la curva de decaimiento diastólico, respectivamente, y A_d es el área bajo la onda $P(t)$ en esta región. La segunda medida de distensibilidad arterial global se calculó como el cociente volumen latido-presión de pulso (Chemla et al. (1998) Am. J. Physiol. 274:H500-H505). El volumen latido se definió como CO/HR.

Estudios *in vitro*: Mecánica arterial pasiva

[0100] A ratas hembras no preñadas se les administró rhRLX (4 $\mu\text{g/h}$) o vehículo por minibombra osmótica por 5 días. Se removió un riñón y se colocó en hielo-solución fisiológica amortiguada HEPES fría (PSS, un amortiguador modificado de Krebs). La solución fisiológica HEPES estaba compuesta por (en mmol/L): cloruro de sodio 142, cloruro de potasio 4.7, sulfato de magnesio 1.17, cloruro de calcio 2.5, fosfato de potasio 1.18, HEPES 10, glucosa 5.5 y estaba a pH 7.4 a 37°C. Se usaron un estereomicroscopio de disección, fórceps pequeños y tijeras de iridectomía para aislar las arterias interlobares como describieron Gandley et al.

[0101] ((2001) Am. J. Physiol. 280:R1-R7) (diámetro interno no presurizado, 100-200 μm). Luego se transfirió un segmento arterial a un arteriógrafo isobárico (Living Systems Instrumentation, Burlington, VT USA) y se montó en 2 microcánulas de vidrio suspendidas en la cámara. Luego que se descargó la sangre residual del lumen de la arteria, se ocluyó la cánula distal para prevenir el flujo. La cánula proximal se unió a un transductor de presión, un servocontrolador de presión y una bomba peristáltica. El servocontrolador mantenía una presión intraluminal seleccionada que se cambió de forma escalonada. Un sistema electrónico de análisis de dimensiones obtenía las medidas de diámetro arterial.

[0102] Los vasos se incubaron en el baño con 10^{-4} M papaverina y 10^{-2} M EGTA en HEPES PSS libre de calcio. Luego de un período de equilibrio de 30 min, la presión transmural aumentó en 14 pasos comenzando en 0 mmHg hasta 150mmHg. Los diámetros internos y externos así como el grosor de la pared se midieron luego de cada paso de presión cuando el vaso había alcanzado un estado estacionario. El radio medio de la pared (R_m) y el estrés circunferencial de la pared (σ) se calcularon a partir de estos datos como se describe antes (Cholley et al. (2001) J. Appl. Physiol. 90:2427-2438). Las propiedades elásticas de la pared vascular se cuantificaron en términos del módulo elástico incremental (E_{inc}), el cual se calculó a partir de la relación $\sigma-R_m$ (Pagani et al. (1979) Circ. Res. 44:420-429).

Mediciones séricas

[0103] La osmolalidad sérica se midió usando un osmómetro de instrumentación de depresión del punto de congelamiento (Model 3 MO; Advanced Instruments, Needham Heights, MA USA). Los niveles de rhRLX en suero se midieron con un inmunoensayo cuantitativo en emparedado como se describe previamente (Jeyabalan et al. (2003) Circ Res. 93(12):1249-57).

Preparación de rhRLX

[0104] Se usaron minibombas osmóticas modelo 2002 (Durect Corporation, Cupertino, CA USA) para administrar la rhRLX por 10 días a la dosis de 4 $\mu\text{g/h}$ lo cual produjo concentraciones de relaxina circulante similares a las medidas desde el inicio a la mitad de la gestación en las ratas. es decir, 10-20 ng/ml cuando la vasodilatación renal inducida por el embarazo es máxima en esta especie. Se usó una minibomba osmótica modelo 2ML2 para administrar la rhRLX a la dosis de 25 $\mu\text{g/h}$ por 10 días lo cual esperábamos que produjera concentraciones de hormona circulante comparables a las registradas desde mediados a finales de la gestación cuando se observan aumentos en el CO y descensos en la SVR en esta especie. La rhRLX (Connetics, Palo Alto, California USA) suministrada como una solución de 5.0 mg/ml en 20 mM acetato de sodio pH 5.0 se diluyó en el mismo amortiguador.

Análisis estadístico

[0105] Los datos se presentan como medias + SEM. Se usó ANOVA de medidas repetidas de uno o dos factores (Zar (1984) Biostatistical Analysis, Englewood Cliffs, NJ:Prentice Hall) para comparar los valores de las medias entre varios grupos. Si se observaban efectos o interacciones principales significativos, se realizaban comparaciones entre los grupos usando LSD de Fisher o prueba de Dunnett. Se usó la prueba 't' apareada de Student para comparar las medias compuestas durante la infusión de rhRLX (*i.e.*, valores promediados en todos los puntos de tiempo durante la infusión de rhRLX) con los basales. Se realizó un análisis de regresión de cuadrados mínimos sobre las relaciones de $\sigma-R_m$ y $E_{inc}-R_m$. Se usó el análisis de varianza en exceso (o suma extra de cuadrados) para comparar estas relaciones entre los grupos tratados con vehículo y con relaxina. Una $p < 0,05$ se tomó como significativa.

RESULTADOS

Estudios in vivo

[0106] *Control del tiempo.* La estabilidad de la hemodinámica arterial sistémica y carga sobre un período de 17 días después de la cirugía en ratas control (Tabla 1). La frecuencia cardiaca declinó significativamente debido a un efecto del entrenamiento como previamente se reportó (Conrad and Russ (1992) Am. J. Physiol. 31:R472-477). El volumen latido aumentó de forma recíproca, de forma que el CO no cambió. Las otras variables no cambiaron significativamente en el período de 17 días después de la cirugía, así puede usarse este modelo de rata conciente para obtener datos significativos bajo las condiciones experimentales descritas a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Ratas de Control de Tiempo

	Tiempo después de la cirugía (días)	ΔT (°C)	CO (mL/min)	HR* (bpm)	SV* (mL)	AC _{area} (μ l/mmHg)	SVR (mmHg.s/mL)	MAP (mmHg)
5	4-5	0.37 \pm 0.01	119 \pm 3	428 \pm 7	0.28 \pm 0.01	6.8 \pm 0.3	57 \pm 2	107.6 \pm 0.8
	7-8	0.37 \pm 0.01	121 \pm 3	378 \pm 8	0.32 \pm 0.01	7.2 \pm 0.3	55 \pm 2	107.3 \pm 1.5
	9-10	0.38 \pm 0.01	120 \pm 4	382 \pm 8	0.31 \pm 0.01	6.9 \pm 0.3	55 \pm 2	108.1 \pm 1.5
	13-14	0.35 \pm 0.01	115 \pm 4	354 \pm 5	0.32 \pm 0.01	7.3 \pm 0.3	58 \pm 2	107.0 \pm 1.5
10	16-17	0.32 \pm 0.02	122 \pm 3	349 \pm 7	0.36 \pm 0.01	8.0 \pm 0.4	52 \pm 2	103.7 \pm 2.2

15 **[0107]** Media \pm SEM. N=5 ratas. \otimes_T , cambio en la temperatura de la sangre luego de la inyección de la solución de Ringer en las cámaras cardíacas derechas; CO, gasto cardíaco; HR, frecuencia cardíaca; SV, volumen latido; A_{area}, distensibilidad arterial global calculada usando el método del área; SVR, resistencia vascular sistémica; MAP, presión arterial media. *P < 0.05 por ANOVA de medidas repetidas de un solo factor.

20 **[0108]** *Ratas a las que se les administró el vehículo (para rhRLX)*. Estos resultados se derivaron de 3 ratas que recibieron el vehículo para rhRLX a la tasa de infusión de 1 μ l/h, y de otras 3 ratas que recibieron el vehículo para rhRLX a la tasa de infusión de 5 μ l/h. (Éstas corresponden a las tasas para la administración de dosis baja y alta de rhRLX, respectivamente.) Los resultados eran comparables, y por tanto, se combinaron. Las Figs. 1 y 2 muestran el cambio porcentual desde el basal para la hemodinámica sistémica y otras variables. Similar a los estudios de control de tiempo, hubo un descenso significativo en la frecuencia cardíaca, el cual fue compensado un aumento insignificante en el volumen latido, de forma que el CO permaneció sin cambios. Las otras variables permanecieron relativamente constantes. Combinar todos los puntos de tiempo durante la administración del vehículo produjo cambios globales en el CO, AC global y SVR de -1.4 + 1.3, 2.2 + 4.6, y 0.4 + 3.4 % (SIC) de los basales, respectivamente (todas la p NS vs basales). Como era de esperarse, no había rhRLX medible en el suero, y la osmolalidad era 309 +(SIC) 6 mOsm/kg agua.

30 **[0109]** *Rats que recibieron dosis bajas de rhRLX (4 mg/h)*. Los valores absolutos para la hemodinámica sistémica y otros parámetros se muestran en la Tabla 2, mientras que las Figs. 1 y 2 muestran el patrón temporal del cambio porcentual desde el basal.

35 Tabla 2. Ratas que recibieron dosis bajas de rhRLX (4mg/h)

	Días después de la minibomb	ΔT (°C)	CO* (mL/min)	HR (bpm)	SV* (mL)	AC _{area} * (μ l/mmHg)	SVR* (mmHg.s/mL)	MAP (mmHg)
40	Linea de base	0.34 \pm 0.02	128 \pm 2	417 \pm 6	0.31 \pm 0.01	6.2 \pm 0.3	51 \pm 2	111.6 \pm 3.7
	2-3	0.31 \pm 0.01	151 \pm 6	436 \pm 9	0.35 \pm 0.01	7.2 \pm 0.3	43 \pm 3	110.2 \pm 4.9
	6	0.31 \pm 0.01	149 \pm 7	419 \pm 6	0.36 \pm 0.02	7.1 \pm 0.5	46 \pm 3	116.9 \pm 3.8
	8	0.31 \pm 0.01	159 \pm 7	427 \pm 11	0.37 \pm 0.02	7.4 \pm 0.5	44 \pm 2	112.1 \pm 2.8
	10	0.31 \pm 0.01	153 \pm 5	418 \pm 10	0.37 \pm 0.01	7.7 \pm 0.5	44 \pm 2	115.2 \pm 5.8

50 **[0110]** Media \pm SEM. N=6 ratas. Se hicieron dos mediciones basales los días 5 y 7 después de la cirugía. Estos resultados se promediaron para cada rata. Para las abreviaturas, ver Tabla 1.

55 **[0111]** Las dosis bajas de rhRLX aumentaron significativamente el CO en relación con el basal y con la infusión de vehículo (Fig. 1A). La infusión de rhRLX previno el descenso normalmente observado en la HR (c.f. vehículo, Fig. 1B), y la hormona aumentó significativamente la SV (Fig. 1C). Así, los aumentos en la SV y HR se combinaron para aumentar el CO en relación con las ratas a las que se les hizo infusión de vehículo. La hemodinámica vascular sistémica cayó significativamente en relación con la basal y la infusión de vehículo (Fig. 2A), mientras que la MAP permaneció sin cambios (Fig. 2B).

60 **[0112]** La AC global aumentó significativamente en relación con la basal y la infusión de vehículo (Fig. 2C). No hubo cambio significativo en la presión de pulso; sin embargo, el cociente de volumen latido a presión de pulso, otro índice de distensibilidad arterial, aumentó significativamente durante la infusión de dosis bajas de rhRLX en relación con el basal y con la infusión de vehículo (Fig. 2D). Se examine el curso en el tiempo de los cambios en las variables que mostraron un cambio significativo con la administración de dosis bajas de rhRLX (*i.e.*, valor significativo de F

para relaxina y/o interacción). Por comparaciones apareadas *post hoc* de los datos en diferentes puntos de tiempo (LSD de Fisher). El CO y la SV eran significativamente que los basales el día 3. Mientras que la SV continuó aumentando hasta el día 8 ($p < 0.05$, día 8 vs día 3) (Fig. 1C), no hubo cambios significativos con el tiempo en el CO más allá del día 3 (Fig. 1A). Esto fue resultado de una caída pequeña, pero insignificante, en la HR desde el día 3 al día 8 (Fig. 1B).

[0113] La SVR y ambas medidas de AC global se alteraron significativamente el día 3; luego de ello no hubo cambios significativos posteriores (Fig. 2). En general, los cambios máximos en la hemodinámica arterial y propiedades mecánicas luego de la administración de dosis bajas de rhRLX se observaron en el punto de tiempo más temprano (día 3), sin alteraciones temporales posteriores. Combinar todos los puntos de tiempo durante la administración de dosis bajas de rhRLX produjo un aumento global en el CO y en la AC global de 19.2 ± 4.8 and 21.4 ± 3.6 % por encima del basal, respectivamente, y un descenso global en la SVR de 15.5 ± 2.4 % por debajo del basal (todas las $p < 0.01$ vs basal). La rhRLX sérica y osmolalidad fueron 14 ± 2 ng/ml y 284 ± 2 mOsm/kg agua, respectivamente. Esta última disminuyó significativamente comparada con la infusión de vehículo.

[0114] *Ratas que recibieron dosis altas de rhRLX (25 mg/h)*. Los valores absolutos para la hemodinámica sistémica y otras variables se presentan en la Tabla 3, y las Figs. 1 y 2 muestran el cambio porcentual a partir del basal. Los resultados para la infusión de dosis altas fueron comparables a la administración de dosis bajas en dirección, pero algo menores en magnitud.

Tabla 3. Ratas que recibieron dosis altas de rhRLX (25µg/h)

Días después de la minibomba	ΔT (°C)	CO* (mL/min)	HR (bpm)	SV (mL)	ACarea* (µl/mmHg)	SVR* (mmHg.s/mL)	MAP (mmHg)
Línea de base	0.37 ± 0.02	129 ± 6	438 ± 10	0.30 ± 0.02	7.7 ± 0.7	53 ± 3	111.6 ± 3.7
2-3	0.33 ± 0.02	141 ± 7	454 ± 13	0.31 ± 0.02	8.5 ± 0.8	49 ± 4	110.2 ± 4.9
6	0.35 ± 0.02	147 ± 4	432 ± 10	0.34 ± 0.01	8.1 ± 0.4	48 ± 2	116.9 ± 3.8
8	0.35 ± 0.03	150 ± 5	451 ± 9	0.33 ± 0.01	9.4 ± 0.7	45 ± 2	112.1 ± 2.8
10	0.34 ± 0.02	146 ± 9	442 ± 6	0.33 ± 0.02	9.2 ± 1.0	48 ± 3	115.2 ± 5.8

[0115] Mean \pm SEM. N=7 ratas. Se hicieron dos mediciones basales los días 5 y 7 después de la cirugía. Estos resultados se promediaron para cada rata. Para las abreviaturas, ver Tabla 1.

[0116] El análisis temporal de los cambios en las variables individuales con dosis altas de rhRLX se realizó de forma similar a las dosis bajas de rhRLX. Una vez más, el CO (Fig. 1A), SV (Fig. 1C), SVR (Fig. 2A) y AC global (método SV/PP) (Fig. 2D) se alteraron máximamente en el punto de tiempo más temprano examinado (día 3), sin otros cambios significativos después. La respuesta temporal de la AC global calculada por el método del área (Fig. 2C) se desvió ligeramente de este patrón general - el ACarea el día 6 no era diferente del basal. Ésta es probablemente una medición aberrante porque la segunda medida de la AC global en todos los puntos de tiempo (Fig. 2D) y ACarea los días 3, 8 y 10 (Fig. 2C) eran significativamente mayores que los basales. Combinar todos los puntos de tiempo durante la administración de dosis altas de rhRLX produjo un aumento global en el CO y la AC global de 14.1 ± 3.2 y 15.6 ± 4.7 % por encima de los basales, respectivamente, y un descenso global en la SVR de 9.7 ± 2.4 % por debajo del basal (todas las $p < 0.02$). La relaxina sérica y osmolalidad fueron 36 ± 3 ng/ml y 287 ± 1 mOsm/kg de agua, respectivamente. Esta última disminuyó significativamente comparada con la infusión de vehículo.

[0117] Ondas de la presión arterial. Las ondas arteriales representativas de una sola rata basales y luego de la administración de rhRLX se muestran en la Fig. 3A. Ilustran que el catéter de presión del ratón (TA11PA-C20) proporciona registros de alta fidelidad necesarios para determinar la AC global. El ensamblaje de las ondas promedio de presión arterial, derivadas usando la metodología propuesta por Burattini et al. (supra) se muestran en la Fig. 3B para los 3 grupos de ratas el día 10 de infusión. Como se discute antes, la SV aumentó significativamente y la SVR disminuyó significativamente luego de la administración de rhRLX (Tablas 2 y 3). Si éstas fueran las únicas alteraciones, esperaríamos ver un cambio claro en la morfología de la onda de presión: aumento de la presión de pulso y un decaimiento diastólico apresurado de la presión arterial. Sin embargo, como se ilustra en la Fig. 3B, la administración de rhRLX no afectó significativamente la morfología de la onda de presión arterial, como lo indica la presión de pulso sin cambio y el decaimiento diastólico. Esta invariable morfología de la onda de presión, en presencia de una SV aumentada y una SVR disminuida, es consistente con un aumento simultáneo en la AC global.

Estudios in vitro

[0118] Mecánica arterial pasiva. Estos experimentos in vitro se realizaron para examinar los efectos de la administración de rhRLX sobre las propiedades mecánicas pasivas (es decir, en ausencia de un tono muscular liso

activo) de la pared vascular. Como se menciona antes (sección de Métodos), las mediciones primarias consistían en los diámetros interiores y exteriores de los vasos a varios niveles de presión intraluminal. El estrés circunferencial de la pared (σ) y radio medio de la pared (R_m) se calcularon a partir de estas mediciones primarias y la relación σ - R_m se usó para cuantificar la conducta elástica de la pared del vaso (e.g., módulo elástico incremental, E_{inc}). Las relaciones de σ - R_m (Fig. 4A) y E_{inc} - R_m (Fig. 4B) para las arterias renales menores eran significativamente diferentes entre los dos grupos ($p < 0.001$ por análisis de varianza en exceso) de forma que σ y E_{inc} eran menores para un R_m dado en el grupo tratado con relaxina. Por el contrario, el R_m sin estrés, R_{m0} (es decir, R_m a $\sigma = 0$), no era diferente entre los dos grupos (tratados con relaxina: 10565 mm; tratados con vehículo: 9866 mm). Así, el eje R_m puede considerarse como tensión circunferencial de la pared. Estos datos indican que el tratamiento con relaxina redujo significativamente la rigidez de la pared vascular (E_{inc}) a valores apareables de R_m (tensión). Esta rigidez pasiva reducida de la pared contribuye a la AC global elevada que se ve en los animales concientes con tratamiento con relaxina (*vide supra*).

Ejemplo 2: Efectos de relaxina sobre la hemodinámica arterial sistémica y propiedades mecánicas en ratas concientes: dependencia del sexo y respuesta de dosis

MÉTODOS

Animales

[0119] Se adquirieron ratas Long-Evans machos y hembras de 12-14 semanas en Harlan Sprague-Dawley (Frederick, Maryland USA). Se les proporcionó dieta PROLAB RMH 2000 que contenía 0.48% sodio (PME Feeds Inc., St. Louis, MO USA) y agua ad libitum. Las ratas fueron mantenidas en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h. Esta investigación está conforme con la Guía para la atención y uso de animales de laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud de EEUU (Publicación de los NIH No. 85-23, revisada en 1996).

Administración de relaxina humana recombinante (rhRLX)

[0120] La rhRLX (BAS, Palo Alto, California USA) se proporcionó como una solución de 5.0 mg/ml en un amortiguador (20 mM acetato de sodio, pH 5.0). Se diluyó cuando fue necesario en el mismo amortiguador. Para el protocolo de infusión de dosis bajas, se usaron dos minibombas osmóticas modelo 2002 (Durect Corporation, Cupertino, CA USA) para administrar la rhRLX por 10 días a la dosis de 4 mg/h. Esta dosis se designó para producir concentraciones de relaxina circulante similares a las medidas durante el inicio a la fase media de la gestación en las ratas, es decir, 10-20 ng/ml (Sherwood OD, Endocrinol Rev 25(2): 205-234, 2004). Para el protocolo de infusión de dosis altas se usó una minibomba osmótica modelo 2ML2 para administrar la rhRLX a 50 μ g/h por 6 días, la cual se espera produce concentraciones séricas comparables a las registradas a finale de la gestación (Sherwood OD, Endocrinol Rev 25(2): 205-234, 2004) cuando se observan aumentos en el CO y descensos en la SVR en esta especie (Gilson et al., Am J Physiol 32: H1911-H1918, 1992; Slangen et al., Am J Physiol 270: H1779-1784, 1996). Finalmente, en un tercer protocolo, se administró rhRLX por bolus i.v. por 3 min (13.4 μ g/ml) seguido por una infusión i.v. continua por 4 horas.

Preparación quirúrgica

[0121] Como en el Ejemplo 1, las ratas fueron anestesiadas por 60 mg/kg ketamina i.m. y 21 mg/kg pentobarbital i.p. Luego fueron instrumentadas, usando una técnica estéril, como sigue: (i) un catéter tygon implantado en la vena yugular derecha con la punta en la unión de la vena cava anterior y aurícula derecha, (ii) una microsonda de termodilución (36 cm de largo, F#1.5; Columbus Instruments, Columbus, OH USA) implantada en la aorta abdominal a través de la arteria femoral izquierda con la punta a 1.0 cm por debajo de la arteria renal izquierda, y (iii) un catéter de presión de ratón (TA11PA-C20, F#1.2; Data Science International, St. Paul, MN USA) implantado en la carótida derecha con la punta en la unión de la carótida derecha y el arco aórtico. Para la administración aguda de la rhRLX, se implantó otro catéter tygon en la vena cava inferior a través de la vena femoral izquierda de forma que la punta estaba a 1.0 cm por debajo de la arteria renal derecha.

[0122] Luego de instilar 0.05 ml de una solución de heparina en el catéter yugular y conectarlo a un pin recto, las ratas recibieron ampicilina en el agua de beber por 2 días (100 mg/50 ml (SIC) con 2 cucharadas de dextrosa). Se administró terbutrol s.c. para la analgesia postoperatoria.

[0123] Para la administración crónica de dosis bajas de relaxina humana recombinante (4.0 μ g/h rhRLX) en las ratas macho por 30 días, se insertaron dos minibombas osmóticas Alzet modelo 2002 (Durect Corporation, Curpertino, CA USA) por vía subcutánea en la espalda del animal bajo anestesia con isoflurano. Para la administración crónica de dosis altas en las ratas hembras por 6 días (80 μ g/h), se implantó una miniomba osmótica Alzet modelo 2ML2. También se administraron dosis altas de rhRLX a otro grupo de ratas hembras de forma aguda por bolus intravenoso por 3 min (13.4 μ g/ml) seguido por una infusión continua por 4h.

[0124] Luego de completar la medición para el último punto de tiempo, las ratas fueron anestesiadas con 60 mg/kg pentobarbital i.v. Se obtuvo sangre de la aorta abdominal para las mediciones de los niveles plasmáticos de rhRLX.

Se registró la posición del catéter yugular en relación con la aurícula derecha, la colocación del catéter de presión en relación con el arco aórtico y la posición del termopar en relación con la arteria renal izquierda.

Hemodinámica y propiedades mecánicas arteriales sistémicas

[0125] Los protocolos de dosis bajas y altas de rhRLX incluyeron 7 ratas machos y 9 hembras, respectivamente. Luego de dos mediciones basales de la hemodinámica sistémica los días 5 y 7 después de la cirugía, se administraron las dosis bajas o altas de rhRLX por la minibomba osmótica. La hemodinámica sistémica se evaluó de nuevo los días 3, 6, 8 y 10 después de iniciar la infusión de relaxina para las ratas macho a dosis baja y los días 3 y 6 para las ratas hembras a dosis alta. Cada medición consistió en 4 a 8 registros del gasto cardiaco y las ondas de presión arterial obtenidos cuando la rata estaba durmiendo o reposando. Se permitieron siete a 10 minutos entre los registros. Estas mediciones se obtuvieron entre las 9 AM y 3 PM. [0126] Para la administración aguda de dosis altas de rhRLX, se usaron 5 ratas hembras. Se obtuvieron mediciones basales de la hemodinámica sistémica seguidas por la infusión intravenosa de dosis altas de rhRLX por 4 horas. La hemodinámica sistémica se evaluó continuamente durante las 4 horas de infusión.

[0127] Usamos la técnica de termodilución (Osborn et al., Am JPhysiol 251: H1365-H1372,1986) para medir el gasto cardiaco. Las ondas instantáneas de presión aórtica se registraron usando un sistema de telemetría de presión arterial (Data Sciences International, St. Paul, MN USA) (Mills et al., JAppl Physiol 88: 1537-1544, 2000). La presión aórtica registrada por el catéter de presión implantado en el arco aórtico se transmitió a un receptor externo. La presión aórtica en estado estacionario se digitalizó en línea usando un sistema de adquisición de datos basado en PC con 16 bits de resolución y una tasa de muestra de 2000 Hz y se almacenaron como archivos de texto para su análisis fuera de línea. Cada medición consistía en una duración de muestra de 30 segundos.

[0128] El análisis de los datos adquiridos y el cálculo de la AC global se realizó usando un programa de computadora ajustable desarrollado usando software Matlab (MathWorks Inc., Natick, MA USA). En resumen, se seleccionaron latidos individuales (3 - 15 ciclos) de los 10 segundos del registro de presión aórtica, inmediatamente precedentes a la medición del gasto cardiaco. El ensamblaje se promedió como describieron Burattini et al. (2) para producir un solo latido representativo para cada latido. Se calcularon la presión arterial media (MAP), presión sistólica pico (Ps) y presión de fin de diástole (Pd) a partir de este latido promediado. La presión de pulso (PP) se calculó como Ps-Pd. La resistencia vascular sistémica (SVR) se calculó dividiendo la MAP por la CO.

[0129] Se calcularon dos medidas de distensibilidad arterial global. La primera (AC_{area}) se calculó a partir del decaimiento diastólico de la onda de presión aórtica [P(t)] usando el método del área (18):

$$AC_{area} = A_d/[SVR(P_1 - P_2)]$$

donde P_1 y P_2 son las presiones al inicio y al final de la curva de decaimiento diastólico, respectivamente, y A_d es el área bajo la curva de la onda de P(t) en esta región. La segunda medida de distensibilidad arterial global se calculó como el cociente volumen latido-presión de pulso, SV/PP (Chemla et al., Am J Physiol 274: H500-H505, 1998). El volumen latido se definió como CO/HR.

Mediciones séricas

[0130] La osmolalidad sérica se midió usando un osmómetro de instrumentación de depresión del punto de congelamiento (Model 3 MO; Advanced Instruments, Needham Heights, MA USA). Los niveles de rhRLX en suero se midieron con un inmunoensayo cuantitativo en emparedado como se describe previamente (Jeyabalan et al., Circ Res 93: 1249-1257,2003).

Análisis estadístico

[0131] Los datos se presentan como medias \pm SEM. Para su comparación se incluyen los datos de un estudio previo (Conrad et al., Endocrinology 145(7): 3289-3296,2004; Ejemplo 1) donde se administraron dosis bajas y medias de rhRLX a ratas hembras. Se usó ANOVA de medidas repetidas de dos factores (Zar JH, Biostatistical Analysis. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1984) para comparar los valores medios entre las ratas machos y hembras con dosis bajas en varios puntos de tiempo. El mismo análisis se realizó para comparar los valores medios entre las dosis bajas, medias y altas de rhROX en las ratas hembras en varios puntos de tiempo. Se usó ANOVA de medidas repetidas de un factor (Conrad et al., Endocrinology 145(7): 3289-3296,2004) para comparar los valores medios en varios puntos de tiempo luego de iniciar la infusión aguda de dosis altas de rhRLX con los valores basales. Si se observaban efectos principales significativos o interacciones, se realizaban comparaciones apareadas entre los grupos usando la prueba de LSD de Fisher. Se usó la prueba 't' apareada de Student para comparar los valores medios compuestos (definidos luego) durante la infusión crónica de rhRLX con los basales. Una $p < 0,05$ se tomó como significativa. Finalmente, se usó regresión lineal para analizar las relaciones entre las magnitudes del cambio en cada propiedad arterial de las ratas individuales en respuesta a la infusión de relaxina y los valores basales de

esa propiedad. Las diferencias grupales en los parámetros de regresión lineal se examinaron usando ANCOVA, implementado como regresión lineal múltiple con variables ficticias (Gujarati D, Am Statistician 24: 18-22, 1970).

RESULTADOS

[0132] Ratas machos que recibieron dosis bajas de rhRLX (4 µg/h). Los patrones temporales de varias variables hemodinámicas sistémicas, expresadas como un porcentaje de los valores basales, se ilustran en la Fig. 5 y los valores absolutos de estas variables se presentan en la Tabla 4. Para propósitos de comparación, los datos de nuestro estudio previo (Conrad et al., Endocrinology 145(7): 3289-3296,2004) examinando los efectos de la infusión de rhRLX a 4 µg/h en ratas hembra también se presentan en la Fig. 5. La dosis baja de rhRLX aumentó significativamente el CO en relación al basal en las ratas machos. Hubo un aumento ligero (~6%), pero estadísticamente significativo, en la HR en las ratas machos tratadas con relaxina (Fig. 5A). Sin embargo, hubo un mayor aumento en la SV (Fig. 5B) indicando que la elevación en el CO resultó principalmente por un aumento en la SV, y en menor grado por un aumento en la HR. La presión arterial media no cambió significativamente durante la infusión de rhRLX (Fig. 5D). En el punto de tiempo final (es decir, día 10 después del inicio de la infusión de rhRLX), no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los efectos de la administración de rhRLX sobre la hemodinámica sistémica en las ratas machos y hembras.

[0133] Los efectos temporales de la infusión de rhRLX sobre las propiedades arteriales sistémicas en ratas machos, expresados como un porcentaje de los valores basales, se muestran en la Fig. 6. Una vez más, los valores absolutos para estas variables se presentan en la Tabla 4 y los datos de las ratas hembras también se muestran en la Fig. 6 para comparación. La resistencia vascular sistémica cayó significativamente en relación con la basal (Fig. 6A), mientras que ambas medidas de distensibilidad arterial (AC_{area} y SV/PP) aumentaron significativamente (Figs. 2B y 2C). En el punto de tiempo final (es decir, día 10 después del inicio de la infusión de rhRLX), los cambios en las propiedades arteriales no eran estadísticamente diferentes entre las ratas machos y hembras.

Tabla 4. Ratas machos que recibieron dosis bajas de rhRLX (4mg/h)

Días después	Δ_T (°C)	CO*	HR	SV* (mL)	AC _{area} *	SVR*	MAP
minibomba		(mL/min)	(bpm)		(µl/mmHg)	(mmHg.s/mL)	(mmHg)
Linea de base	0.32 ± 0.03	148 ± 9	416 ± 12	0.36 ± 0.03	7.5 ± 0.6	49 ± 3	115.8 ± 2.4
3	0.31 ± 0.01	160 ± 6	440 ± 8	0.36 ± 0.01	7.6 ± 0.5	46 ± 1	121.3 ± 3.6
6	0.29 ± 0.02	169 ± 4	441 ± 6	0.38 ± 0.01	7.9 ± 0.3	43 ± 1	119.9 ± 1.7
8	0.27 ± 0.02	178 ± 6	445 ± 4	0.40 ± 0.01	8.7 ± 0.4	41 ± 1	118.8 ± 2.0
10	0.28 ± 0.02	183 ± 11	442 ± 5	0.41 ± 0.02	8.8 ± 0.5	41 ± 2	121.6 ± 2.6

[0134] Media ± SEM. N=7 ratas. Δ_T , cambio en la temperatura corporal luego de la inyección de la solución de Ringer en las cavidades cardíacas derechas; CO, gasto cardíaco; HR, frecuencia cardíaca; SV, volumen latido, AC_{area}, distensibilidad arterial global calculada usando el método del área; SVR, resistencia vascular sistémica; MAP, presión arterial media. *P < 0.05 por ANOVA de medidas repetidas de un solo factor.

[0135] Calculamos un cambio medio compuesto a partir del basal para cada variable promediando los valores en todos los puntos de tiempo sucesivos durante la infusión de rhRLX que se caracterizaron por un cambio significativo a partir del basal y no eran significativamente diferentes entre sí (es decir, la fase de plató). Esto produjo aumentos globales en el CO y la AC global de 20.5 ± 4.2% y 19.4 ± 6.9% a partir de los basales, respectivamente, y un descenso global en la SVR de 12.7 ± 3.9% a partir del basal (todas las p < 0.05 vs. basal). No hubo diferencia estadística entre estos resultados en ratas machos y los reportados para las ratas hembras (Ejemplo 1). La rhRLX sérica fue 17.7 ± 1.1 ng/ml, un valor similar al previamente observado en ratas hembras que recibieron el mismo régimen de rhRLX, 14.0 ± 2.0 ng/ml.

[0136] Ratas hembras que recibieron dosis altas de rhRLX (50 µg/h). Los valores absolutos de la hemodinámica sistémica y propiedades arteriales se enumeran en la Tabla 5 y sus patrones temporales luego de iniciar la infusión de rhRLX se muestran en las Figs. 3 y 4. Para propósitos de comparación, los datos del Ejemplo 1 que examinan los efectos de la dosis baja (concentración sérica = 14 ± 2 ng/ml) y media (concentración sérica = 36 ± 3 ng/ml) de infusión de rhRLX en ratas hembras también se muestran en las Figs. 3 y 4. La infusión de dosis baja y media de rhRLX aumentó significativamente el CO, principalmente aumentando el SV. Ambas dosis también redujeron significativamente la SVR y aumentaron la AC (Conrad et al., Endocrinology 145(7): 3289-3296,2004). Estas alteraciones se observaron en el punto de tiempo más temprano estudiado - 3 días después del inicio de la administración de rhRLX. La concentración sérica de rhRLX para la infusión de dosis altas en el presente estudio fue 71.5 ± 1.6 ng/ml. Sin embargo, no hubo cambio a partir del basal en ninguna de las hemodinámicas sistémicas ni propiedades arteriales (Figs. 3 y 4). Así, los efectos de la rhRLX sobre la hemodinámica sistémica y propiedades arteriales aparentemente son bifásicos.

Tabla 5. Ratas hembras que recibieron dosis altas de rhRLX (50mg/h)

Días después de la minibomba	Δ_T (°C)	CO (mL/min)	HR (bpm)	SV (mL)	AC _{area} (μ /mmHg)	SVR (mmHg.s/mL)	MAP* (mmHg)
Línea de base	0.34 \pm 0.02	134 \pm 5	425 \pm 14	0.32 \pm 0.02	7.0 \pm 0.4	53 \pm 2	115.9 \pm 2.7
3	0.32 \pm 0.02	141 \pm 6	438 \pm 6	0.32 \pm 0.01	7.2 \pm 0.3	52 \pm 2	120.2 \pm 3.3
6	0.31 \pm 0.01	146 \pm 6	437 \pm 8	0.33 \pm 0.02	7.4 \pm 0.4	51 \pm 3	121.1 \pm 2.8

[0137] Media \pm SEM. N=8 ratas. Δ_T , cambio en la temperatura de la sangre luego de la inyección de la solución de Ringer en las cámaras cardíacas derechas; CO, gasto cardíaco; HR, frecuencia cardíaca; SV, volumen latido; AC_{area}, distensibilidad arterial global calculada usando el método del área; SVR, resistencia vascular sistémica; MAP, presión arterial media. *P < 0.05 por ANOVA de medidas repetidas de un solo factor.

[0138] Para determinar si habrían alteraciones significativas en la hemodinámica sistémica y propiedades arteriales en respuesta a las dosis altas del tratamiento con rhRLX en un punto de tiempo antes de los 3 días después del inicio de la administración de rhRLX, se trataron 5 ratas hembras concientes adicionales con infusión i.v. aguda de rhRLX por 4 horas. La concentración sérica de rhRLX fue 64.1 \pm 1.0 ng/ml. Los efectos temporales de la dosis alta a corto plazo de la infusión de rhRLX sobre la hemodinámica sistémica y propiedades arteriales en las ratas hembras, expresados como un porcentaje de los valores basales, se muestran en las Figs. 5 y 6. La frecuencia cardíaca aumentó significativamente (~13%) en los puntos de tiempo de 2 y 4 horas (Fig. 9A). Este aumento en la HR se compensó por un descenso (aunque estadísticamente insignificante) en el SV (Fig. 9B), resultando en ningún cambio significativo en el CO (Fig. 9C). Hubo un aumento pequeño (~8%), pero estadísticamente significativo, en la MAP (Fig. 9D). No hubo cambios estadísticamente significativos a partir de los basales en ninguna de las propiedades arteriales sistémicas (Fig. 9).

[0139] Los datos antes descritos sugieren que la magnitud del cambio en las propiedades arteriales de las ratas individuales (machos o hembras) en respuesta a la infusión de dosis bajas de rhRLX dependía del valor basal de esa propiedad particular. Para validar esta tendencia, se analizó la relación entre los valores basales de SVR, AC_{area} y SV/PP y sus cambios porcentuales compuestos respectivos a partir de los basales durante la infusión de rhRLX. El análisis de la regresión lineal reveló que el efecto de la infusión de rhRLX (es decir, el cambio porcentual a partir del basal) sobre la SVR (Fig. 9A) y la AC, medida por AC_{area} (Fig. 9B) y SV/PP (Fig. 9C), dependían altamente de sus valores basales. Específicamente, las ratas con baja AC basal se caracterizaron por un mayor aumento en la AC en respuesta al tratamiento con relaxina. Similarmente, las ratas que tenían SVR basal respondieron a la relaxina con un mayor descenso en la SVR. El análisis posterior (ANCOVA) indicó que estas relaciones lineales no eran diferentes entre las ratas machos y hembras.

[0140] Los resultados anteriores muestran que la relaxina induce efectos similares sobre la hemodinámica sistémica y propiedades arteriales en las ratas machos y hembras aunque tradicionalmente se considera que a relaxina es una hormona femenina y no se cree que circule en ratas machos (Sherwood OD, Endocrinol Rev 25(2): 205-234, 2004).

Reivindicaciones

- 5 **1.** Relaxina H2 para el uso en un método para aumentar la distensibilidad arterial en un ser humano, donde el sujeto tiene una disminución de la distensibilidad arterial global en relación con la distensibilidad arterial global en un sujeto sano, donde el sujeto tiene uno o más padecimientos seleccionados a partir del grupo consistente en: aterosclerosis, coronariopatía, disfunción diastólica, hipercolesterolemia, hipertrofia ventricular izquierda, rigidez arterial asociada con el tabaquismo de larga data, rigidez arterial asociada con la obesidad, rigidez arterial asociada con la edad y lupus eritematoso sistémico.
- 10
- 15 **2.** Relaxina H2 para el uso en un método para aumentar la distensibilidad arterial en un ser humano, donde el sujeto tiene una disminución de la distensibilidad arterial global en relación con la distensibilidad arterial global en un sujeto sano, donde el sujeto tiene uno o más padecimientos seleccionados a partir del grupo consistente en: aterosclerosis, coronariopatía, disfunción diastólica, hipercolesterolemia, hipertrofia ventricular izquierda, rigidez arterial asociada con el tabaquismo de larga data, rigidez arterial asociada con la obesidad, rigidez arterial asociada con la edad, y lupus eritematoso sistémico.
- 20 **3.** Relaxina H2 para el uso en un método para aumentar la distensibilidad arterial en un ser humano, donde el sujeto tiene una disminución de la distensibilidad arterial global en relación con la distensibilidad arterial global en un sujeto sano, donde el sujeto tiene uno o más padecimientos seleccionados a partir del grupo consistente en: aterosclerosis, coronariopatía, disfunción diastólica, hipercolesterolemia, hipertrofia ventricular izquierda, rigidez arterial asociada con el tabaquismo de larga data, rigidez arterial asociada con la obesidad, rigidez arterial asociada con la edad, y lupus eritematoso sistémico.
- 25 **4.** La relaxina H2 para su uso de acuerdo con la declaración 1, donde la distensibilidad arterial global se mide a partir del decaimiento diastólico de la onda de presión aórtica usando el método del área.
- 30 **5.** La relaxina H2 para su uso de acuerdo con la declaración 1, donde la distensibilidad arterial global se calcula como el cociente volumen latido-presión de pulso, y donde dicho volumen latido se define como el cociente del gasto cardiaco a la frecuencia cardiaca.
- 35 **6.** La relaxina H2 para su uso de acuerdo con la declaración 3, donde la distensibilidad arterial regional se mide usando la velocidad de la onda de pulso.
- 40 **7.** La relaxina H2 para su uso de acuerdo con cualquier declaración precedente, donde la relaxina H2 se administra al sujeto a una tasa predeterminada para mantener una concentración sérica de relaxina H2 entre 0.5 y 80 ng/ml.
- 45 **8.** La relaxina H2 para su uso de acuerdo con cualquier declaración precedente, donde la relaxina H2 es relaxina H2 recombinante.
- 50 **9.** La relaxina H2 para su uso de acuerdo con cualquier declaración precedente, donde la relaxina H2 se administra diariamente.
- 55 **10.** La relaxina H2 para su uso de acuerdo con cualquier declaración precedente, donde la relaxina H2 se administra en una formulación inyectable, una formulación de liberación sostenida o una formulación administrable por infusión continua.
- 60 **11.** La relaxina H2 para su uso de acuerdo con cualquier declaración precedente, donde el sujeto es una mujer premenopáusica, una mujer menopáusica o una mujer posmenopáusica.
- 65 **12.** La relaxina H2 para su uso de acuerdo con cualquier declaración precedente, donde la mujer posmenopáusica ha cesado su menstruación como resultado de histerectomía u ooforectomía.

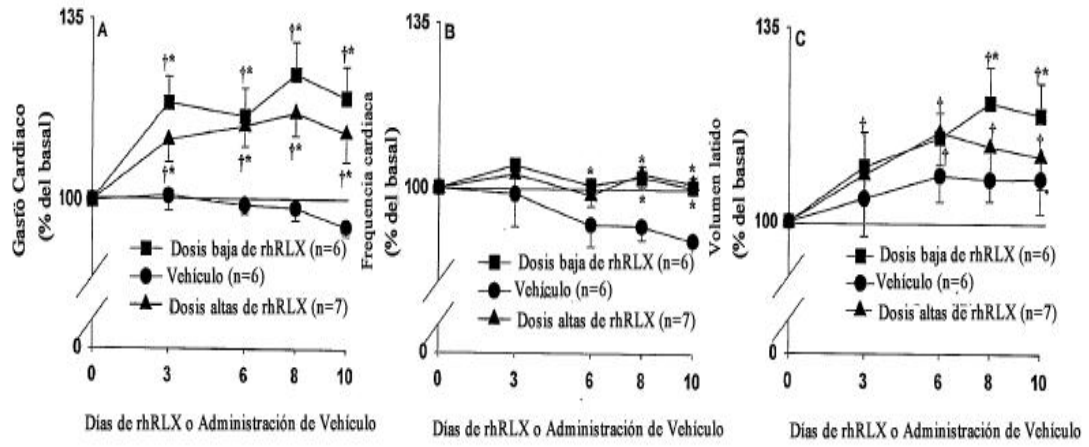


Fig. 1

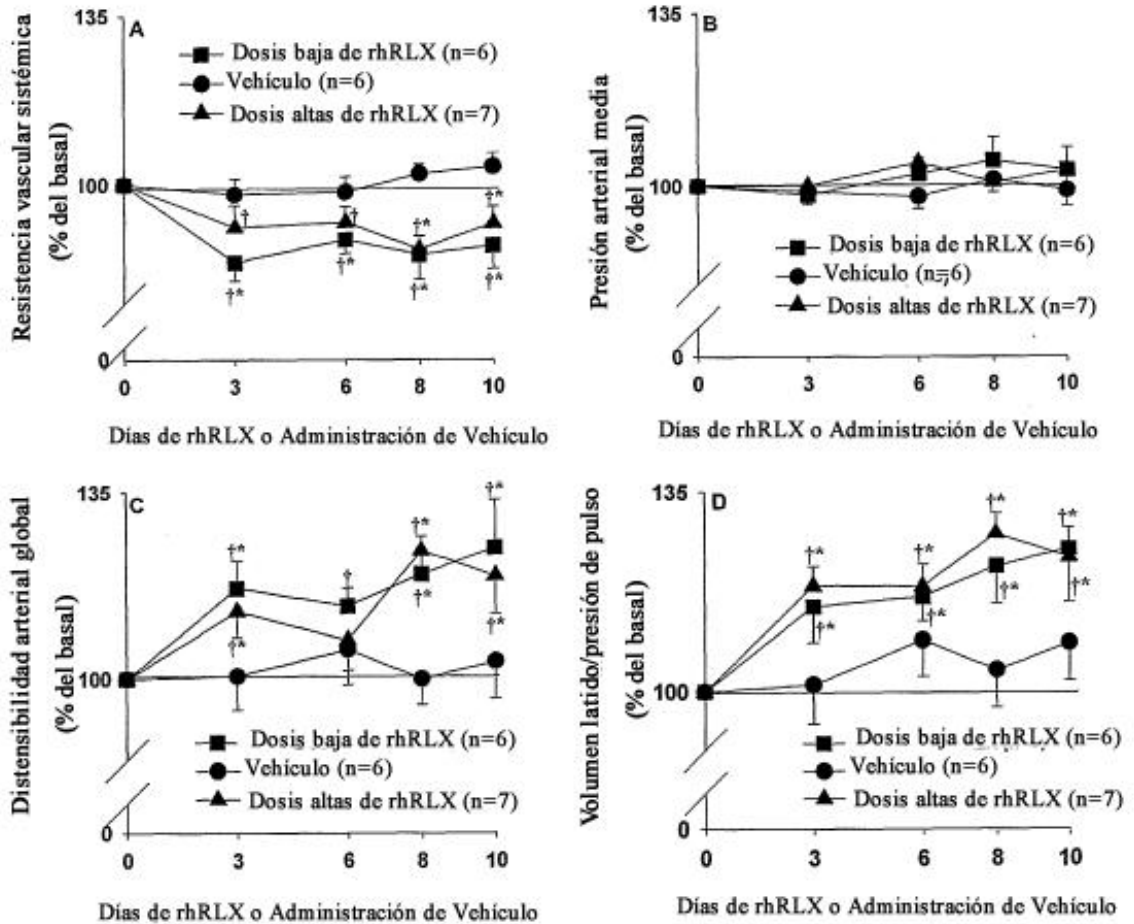


Fig. 2

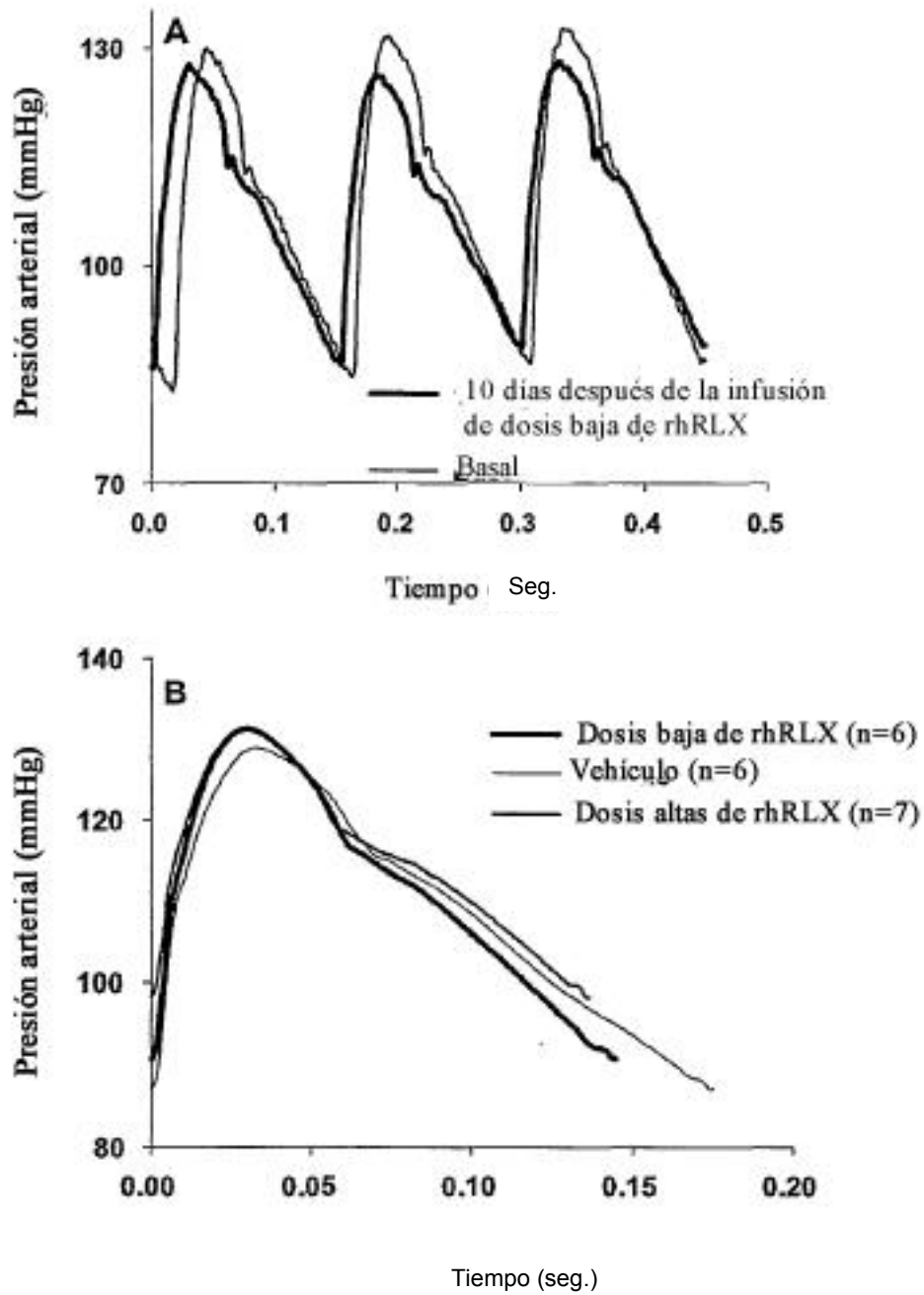


Fig. 3

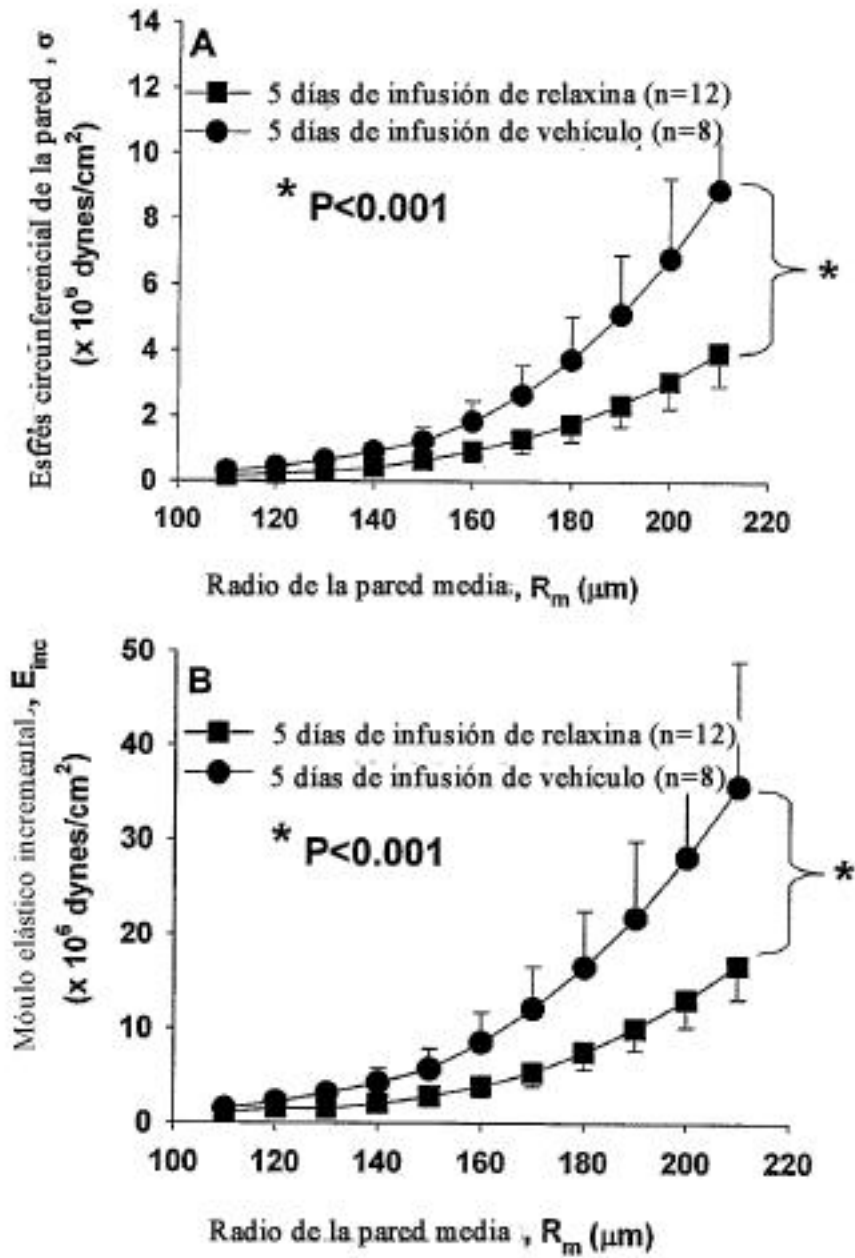


Fig. 4

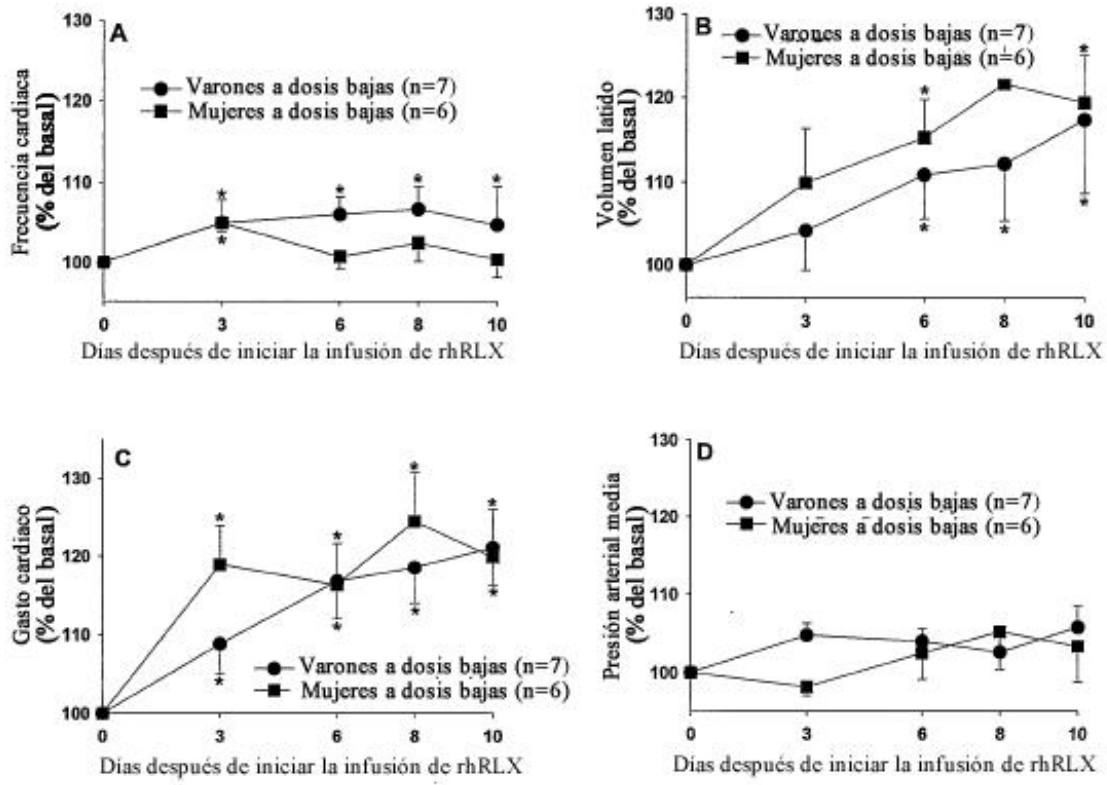


Fig. 5

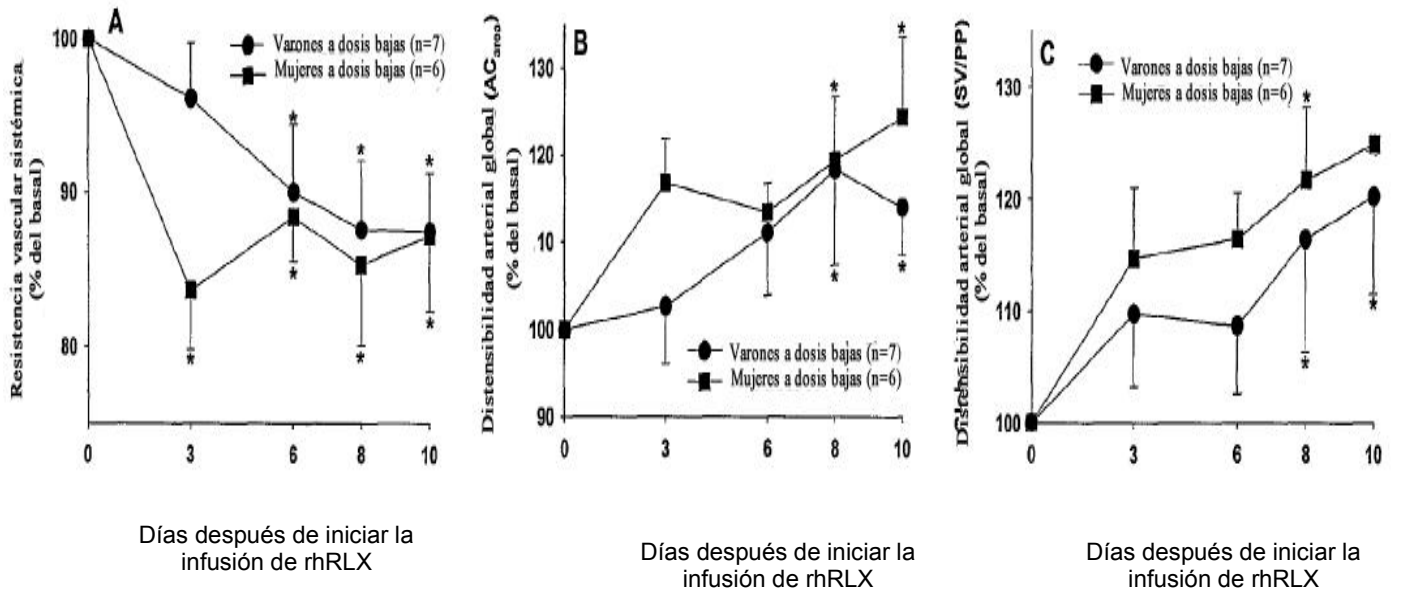


Fig. 6

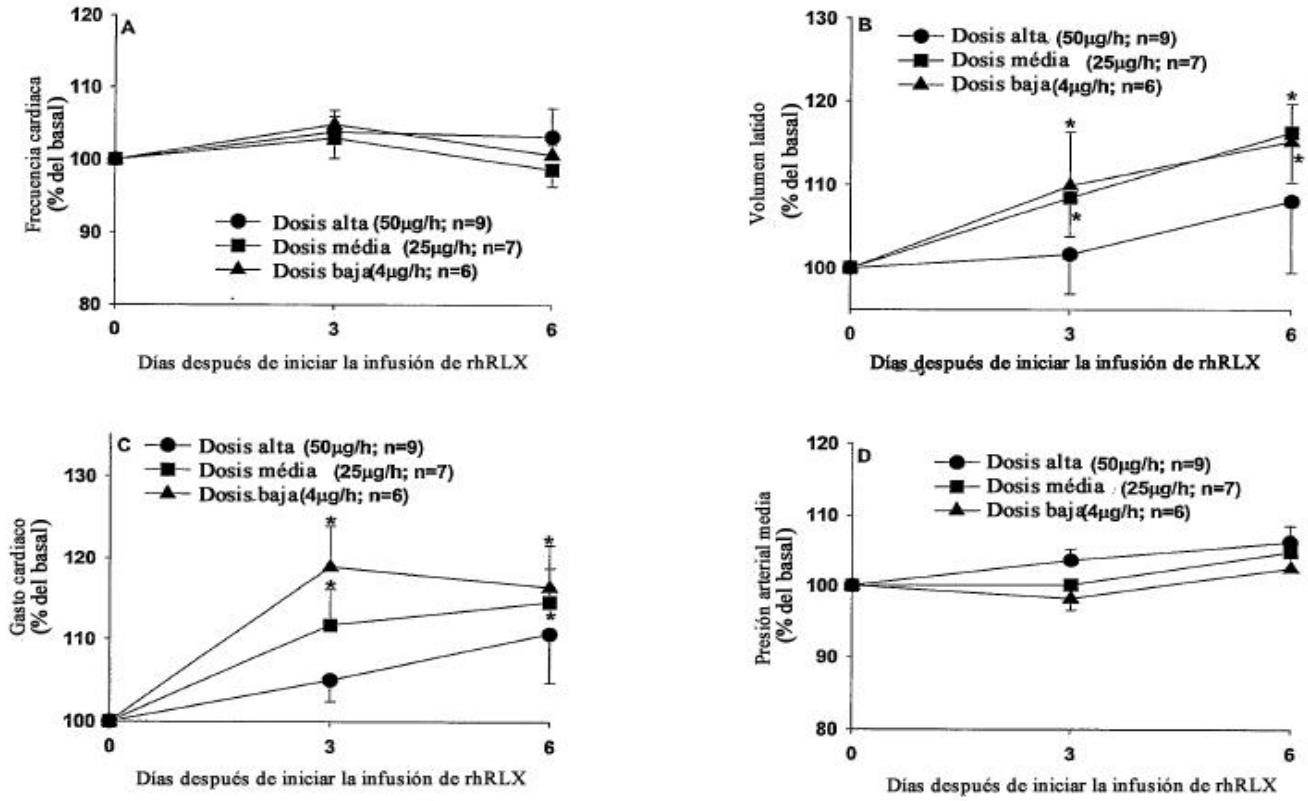


FIG. 7

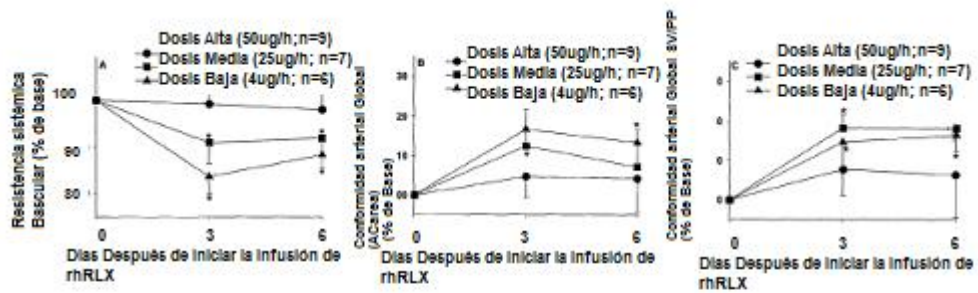


Fig. 8

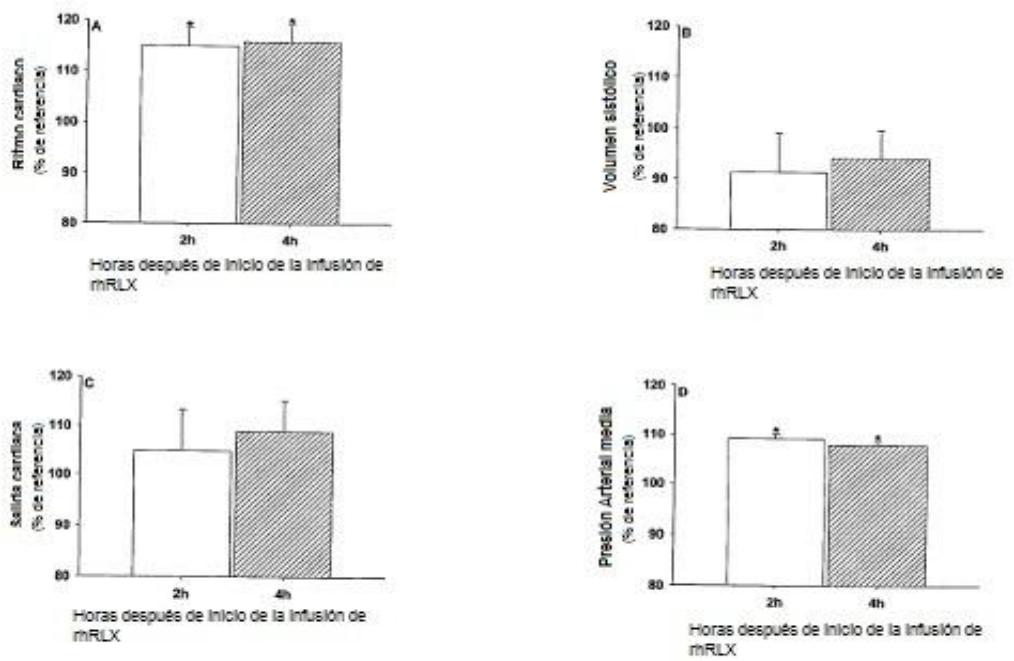


Fig. 9

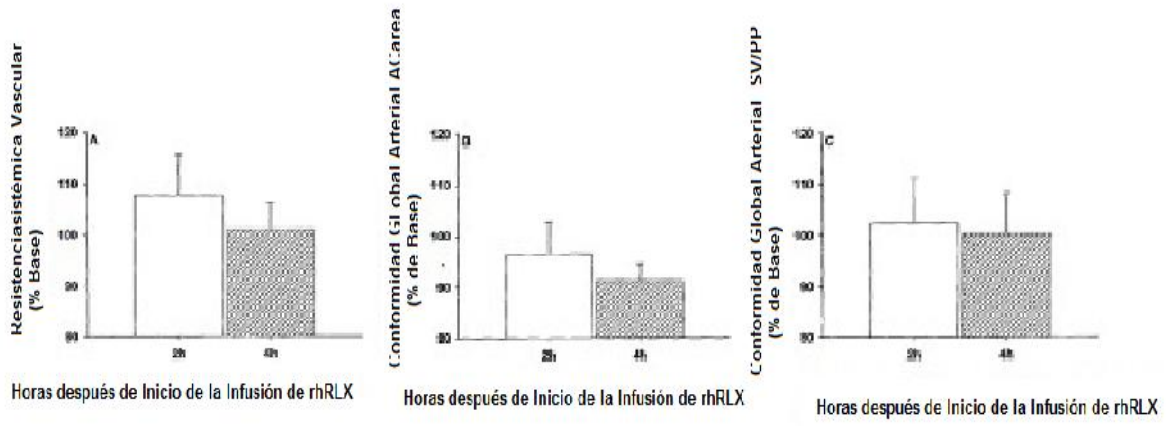


Fig. 10

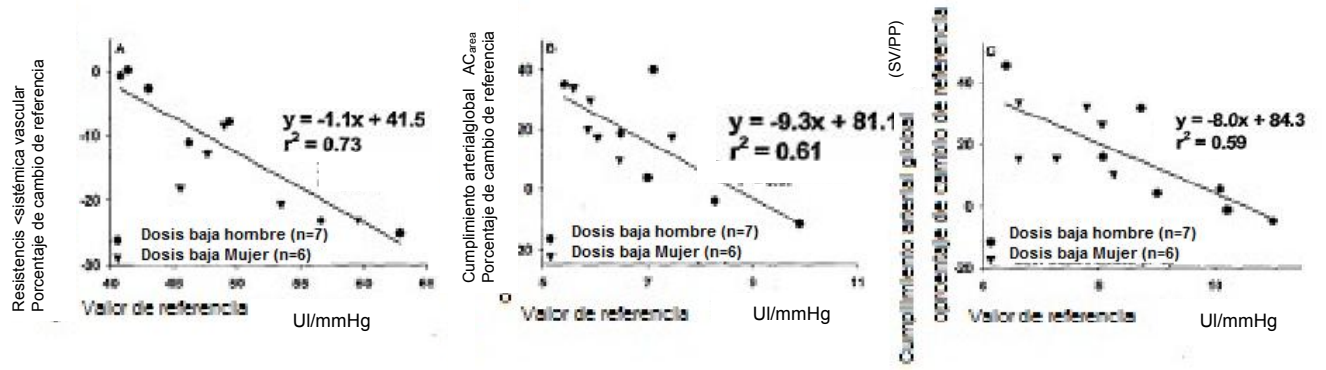


Fig. 11