

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 017 482**

51 Int. Cl.:

A61K 38/29 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

A61K 31/522 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2017** **PCT/GB2017/053473**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2018** **WO18096319**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2017** **E 17817018 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2025** **EP 3544624**

54 Título: **Tratamientos para la insuficiencia cardíaca y la lesión por reperfusión isquémica cardíaca**

30 Prioridad:

24.11.2016 GB 201619861

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
13.05.2025

73 Titular/es:

NARODDEN, SALOMON (100.00%)
22 Pinnacle House Battersea Reach Juniper Drive
London SW18 1JE, GB

72 Inventor/es:

NARODDEN, SALOMON

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 3 017 482 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamientos para la insuficiencia cardíaca y la lesión por reperfusión isquémica cardíaca

- 5 La presente invención se refiere al uso de terapia de ondas de choque cardíacas extracorpóreas en el tratamiento o profilaxis de enfermedades cardíacas, particularmente insuficiencia cardíaca y lesión por reperfusión isquémica cardíaca. En particular, la invención se refiere a agentes, particularmente a inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (inhibidores de la DPP-4) y composiciones farmacéuticas comprendiendo dichos agentes, y su uso en combinación
- 10 con la terapia de ondas de choque para el tratamiento o la profilaxis de trastornos cardíacos, tales como insuficiencia cardíaca y lesión por reperfusión isquémica cardíaca. Los agentes pueden ser útiles solos o en combinación con otros agentes terapéuticamente activos, tales como agentes movilizadores de células madre, particularmente hormona paratiroidea, y células madre, tales como células mononucleares derivadas de médula ósea, particularmente células progenitoras hematopoyéticas.
- 15 La insuficiencia cardíaca afecta al 1-2 % de la población en el Reino Unido y es cada vez más frecuente con la edad (1 % de las personas con menos de 65, 6-7 % de las personas con 75-84, 12-22 % de las personas con más de 85 años). La principal causa de insuficiencia cardíaca en el Reino Unido se debe a la enfermedad de las arterias coronarias (aproximadamente el 70 % de los pacientes con insuficiencia cardíaca) con una esperanza de vida promedio de 3 años después del diagnóstico, que es peor que muchas formas de malignidad y aproximadamente el
- 20 14 % de los pacientes con insuficiencia cardíaca mueren dentro de los 6 meses posteriores al diagnóstico.
- La insuficiencia cardíaca representa el 5 % de los ingresos médicos y el 1-2 % del presupuesto del NHS. El síndrome no solo conlleva una carga sanitaria y económica significativa, sino que también tiene efectos adversos sobre la calidad de vida. A medida que la población envejece en los próximos 25 años, se estima que habrá un aumento del 50 % en
- 25 los ingresos hospitalarios con insuficiencia cardíaca.
- La enfermedad coronaria suele culminar en un infarto de miocardio (ataque cardíaco) y, si bien las angioplastias primarias y los stents para tratar a pacientes con ataques cardíacos han aumentado las posibilidades de su supervivencia, la prevalencia de la insuficiencia cardíaca en realidad está aumentando. Se cree que este aumento en
- 30 la prevalencia de insuficiencia cardíaca es en parte atribuible al hecho de que la lesión por reperfusión representa el 50 % del tamaño final del infarto y el 25 % de los casos de insuficiencia cardíaca aguda.
- A pesar del avance de las terapias médicas y las intervenciones electrofisiológicas, muchos pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (crónica) siguen siendo sintomáticos con una calidad de vida reducida y un pronóstico inaceptablemente malo. En algunos casos, se podría considerar un tratamiento radical, como el trasplante cardíaco o el implante de un dispositivo de asistencia circulatoria, pero existe una falta de órganos disponibles y una tasa de supervivencia a 10 años de solo alrededor del 50 % en pacientes con trasplante cardíaco.
- 35 En sujetos que sufren ataques cardíacos, un infarto de miocardio da como resultado una deficiencia grave de oxígeno en el tejido cardíaco y el tratamiento posterior (por ejemplo, eliminación o derivación del bloqueo) permite la reperfusión del tejido y la consiguiente reoxigenación de las células cardíacas. Sin embargo, cuando las células se exponen a una privación grave de oxígeno seguida de una reoxigenación, una proporción de células en el tejido superará un cierto umbral de estrés, lo que comienza un procedimiento irreversible de muerte celular programada conocido como apoptosis. Si bien las células pueden permanecer estructuralmente intactas, se eliminarán del cuerpo de forma
- 40 controlada porque ya no son viables. Por lo tanto, estas condiciones de "estrés" son comunes en sujetos que sufren ataques cardíacos y los cardiomiocitos en los músculos cardíacos que exceden el umbral de estrés por privación de oxígeno/reoxigenación se reemplazan con un tejido cicatricial, la llamada lesión por reperfusión isquémica cardíaca. La pérdida de tejido muscular cardíaco viable afecta a la capacidad del corazón para bombear y, en circunstancias extremas, provoca insuficiencia cardíaca. Como se señaló anteriormente, el pronóstico en estos pacientes es malo.
- 45 50 La homeostasis cardíaca se mantiene mediante células madre cardíacas multipotentes y esta capacidad de plasticidad del desarrollo es prometedora para la prevención y el tratamiento de la insuficiencia cardíaca en humanos mediante la reconstitución del tejido infartado con células progenitoras viables. De hecho, la terapia celular puede producir una mejora funcional después del infarto de miocardio. Por ejemplo, células madre se han administrado a corazones con
- 55 insuficiencia directamente a través de diversos procedimientos quirúrgicos, incluidas las inyecciones intravenosas, intracoronarias, transendocárdicas e intramiocárdicas. Sin embargo, las mejoras en la función cardíaca observadas hasta la fecha son menores. Esto puede deberse a una retención celular deficiente dentro del corazón, una supervivencia celular deficiente y/o al hecho de que una dosis única podría no ser suficiente para promover una mejora sostenida en la función ventricular izquierda. Además, estos procedimientos invasivos presentan numerosas
- 60 desventajas, entre ellas las complicaciones potencialmente fatales asociadas con la cirugía cardíaca invasiva. De hecho, la administración quirúrgica de células madre es costosa y requiere mucho tiempo, debido en parte al procedimiento de producción de células madre.
- Por lo tanto, existe la necesidad de un enfoque terapéutico novedoso para la insuficiencia cardíaca. En particular, los
- 65 procedimientos para anular la muerte de cardiomiocitos en pacientes con ataque cardíaco podrían ser beneficiosos

para reducir la probabilidad de insuficiencia cardíaca y mejorar el pronóstico de los pacientes con, o en riesgo de, insuficiencia cardíaca.

5 Ito y col. (Coronary Artery Disease, 2010, vol. 21(5), pp. 304-311) describe un estudio sobre los efectos de la terapia extracorpórea con ondas de choque cardíacas después de una lesión de I/R miocárdica en cerdos.

El documento EE.UU. 2009/297470 describe el uso de movilizadores de células madre, particularmente hormona paratiroidea y G-CSF, para reclutar células madre en tejido que padece isquemia. Indica que los inhibidores de DPP-IV pueden potenciar los efectos de dichos movilizadores de células madre.

10 En el trabajo previo a la presente invención, se determinó sorprendentemente que es posible rescatar cardiomiocitos hipóxicos de la apoptosis exponiendo las células a ondas de choque de baja energía. En particular, el inventor ha establecido que el tratamiento de cardiomiocitos hipóxicos con ondas de choque aumenta la fosforilación, es decir, la activación, de la proteína cinasa B (también conocida como Akt). La Akt es un regulador clave de la apoptosis y la Akt
15 activada fosforila e inhibe varias proteínas proapoptóticas, incluidos los miembros de la familia Bcl-2 Bad, Bax, caspasa-9, GSK-3 y FoxO1. Sin embargo, la aplicación de un inhibidor de la vía de PI3K/Akt (LY294002) no afectó el efecto antiapoptótico causado por la aplicación de ondas de choque, es decir, el efecto antiapoptótico del tratamiento con ondas de choque es independiente de la vía de PI3K/Akt (véase el Ejemplo 5). Además, el inventor ha demostrado que la expresión de SDF1, que se sabe que es antiapoptótica, no aumenta en los cardiomiocitos expuestos a ondas
20 de choque. Sin embargo, de manera interesante, el tratamiento con ondas de choque de todo el tejido cardíaco da como resultado un aumento de varias proteínas antiapoptóticas, que incluyen SDF1, MCP1, ANG1, VEGF-A, NOS3 y TAC-1. Estos hallazgos han llevado al inventor a proponer nuevas terapias para el tratamiento de diversos trastornos cardíacos utilizando terapias de ondas de choque, particularmente en el tratamiento del daño causado por hipoxia seguida de normoxia, es decir, lesiones por reperfusión isquémica cardíaca.

25 Por lo tanto, en esta invención se describen procedimientos y agentes para reducir o minimizar la apoptosis (es decir, la muerte celular) de células en el tejido cardíaco (por ejemplo, cardiomiocitos). Más específicamente, en esta invención se describe el uso de terapia de ondas de choque (es decir, terapia de ondas de choque cardíacas extracorpóreas) sola o en combinación con otras terapias, particularmente terapias farmacéuticas o farmacológicas
30 (denominadas en esta invención terapias de combinación o terapias combinadas), para inhibir, prevenir o minimizar la apoptosis de células cardíacas, particularmente cardiomiocitos. Dichos procedimientos terapéuticos y agentes farmacéuticos se pueden combinar con terapias celulares para reparar y/o restaurar el tejido y la función cardíaca.

35 Por ejemplo, en esta solicitud se describen procedimientos para tratar sujetos que sufren de infarto agudo de miocardio mediante la administración de terapia extracorpórea de ondas de choque cardíacas, particularmente como un tratamiento adyuvante junto con angioplastia coronaria y colocación de stent. Resulta ventajoso comenzar la terapia extracorpórea con ondas de choque cardíacas tan pronto como sea posible después de un infarto de miocardio. Sin embargo, para los pacientes ingresados en el hospital después de un retraso y que no califican para la revascularización aguda o tienen contraindicaciones para el procedimiento, la terapia con ondas de choque cardíacas
40 extracorpóreas puede usarse sola. Si bien no se desea limitarse a la teoría, se cree que la terapia con ondas de choque cardíacas extracorpóreas puede retrasar la pérdida progresiva de los cardiomiocitos restantes a través de la prevención de la apoptosis, lo que puede ser particularmente ventajoso en pacientes con infartos establecidos, es decir, para prevenir, reducir o minimizar la probabilidad de insuficiencia cardíaca.

45 Como se señaló anteriormente, se ha descubierto que la terapia con ondas de choque es eficaz como terapia antiapoptótica para cardiomiocitos *in vitro*, por ejemplo, para prevenir, reducir o minimizar la apoptosis de cardiomiocitos *in vitro*. Por consiguiente, en esta solicitud se describen procedimientos y medios para prevenir, reducir o minimizar la apoptosis de cardiomiocitos *in vitro* (por ejemplo, en cultivo, tal como en el cultivo de cardiomiocitos para la producción de tejidos artificiales o sintéticos) o *ex vivo* (por ejemplo, en tejido cardíaco extraído de un sujeto,
50 por ejemplo, en un corazón o tejido cardíaco, por ejemplo, válvula, para trasplante).

Como se mencionó anteriormente, el inventor ha establecido que la exposición del tejido cardíaco a las ondas de choque aumenta la secreción de varias quimiocinas, particularmente quimiocinas prosupervivencia tales como SDF-1 (factor derivado de células estromales 1, también conocido como quimiocina de motivo C-X-C 12 (CXCL12), MCP1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1, también conocida como CCL2), sustancia P e IGF1 (factor de crecimiento similar a la insulina 1), es decir, las ondas de choque aumentan el "secretoma" prosupervivencia en el tejido cardíaco. En particular, se cree que el secretoma puede tener la forma de uno o más exosomas, por ejemplo, vesículas derivadas de células que contienen una o más quimiocinas. Si bien el aumento del secretoma (o exosomas) prosupervivencia no explica el efecto antiapoptótico de las ondas de choque en los cardiomiocitos, se cree que el aumento de estas
60 quimiocinas prosupervivencia puede mejorar la supervivencia de las células cardíacas expuestas a las condiciones de estrés asociadas con la isquemia cardíaca y la reperfusión. Sin embargo, el rápido recambio de quimiocinas significa que el aumento del secretoma prosupervivencia causado por la terapia con ondas de choque puede ser transitorio, lo que significa que podrían ser necesarios tratamientos repetidos con ondas de choque para maximizar los efectos de la terapia con ondas de choque descrita anteriormente. Sin embargo, en algunos casos, la terapia con ondas de choque repetidas puede ser o volverse poco práctica. En general, es preferible evitar la necesidad de visitas repetidas
65

y regulares a la clínica, ya que esto crea una carga tanto para el paciente como para los profesionales de la salud. Además, los tratamientos repetidos con ondas de choque pueden causar molestias que resulten en tratamientos omitidos, lo que puede reducir la eficacia general del tratamiento.

La rápida renovación de las quimiocinas es el resultado de su degradación y/o inactivación. Varias enzimas están involucradas en la degradación de quimiocinas *in vivo*, como la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV o DPP-4), que también se conoce como proteína complejante de adenosina desaminasa 2 o grupo de diferenciación 26 (CD26). DPP-4 es una enzima antigénica expresada en la superficie de la mayoría de los tipos de células. Es una glicoproteína de membrana intrínseca y una serina exopeptidasa que escinde los dipéptidos de X-prolina del extremo N de los polipéptidos. Por lo tanto, DPP-4 tiene una amplia gama de sustratos, que incluyen SDF-1, MCP1, sustancia P e IGF1.

Por consiguiente, el inventor ha determinado que la terapia de ondas de choque puede combinarse ventajosamente con uno o más inhibidores de proteasa para reducir, prevenir o minimizar la degradación y/o inactivación de quimiocinas inducidas por la terapia de ondas de choque, es decir, para prolongar la semivida del secretoma prosupervivencia (que puede estar en forma de uno o más exosomas) del tejido cardíaco resultante de la terapia de ondas de choque (denominada en esta solicitud terapia de combinación o terapia combinada). Por ejemplo, los inhibidores de DPP-4 son bien conocidos en la técnica y se pueden combinar fácilmente con los procedimientos y usos de terapia de ondas de choque descritos anteriormente.

Por lo tanto, los inhibidores de DPP-4 pueden potenciar el efecto de la terapia de ondas de choque en los procedimientos y usos descritos anteriormente, es decir, pueden potenciar o mejorar el efecto antiapoptótico de las ondas de choque en el tejido cardíaco, particularmente los cardiomiocitos, mejorando así el tratamiento de la lesión por reperfusión isquémica cardíaca o minimizando o previniendo el daño del tejido cardíaco, particularmente el músculo cardíaco, causado por la isquemia cardíaca y la reperfusión, por ejemplo, mejorando aún más el pronóstico de un sujeto con, o en riesgo de, insuficiencia cardíaca. En particular, la terapia combinada (terapia de combinación) puede funcionar para reducir el tamaño del infarto final y/o prevenir, retrasar o retardar la progresión a insuficiencia cardíaca.

Por consiguiente, la invención proporciona un inhibidor de DPP-4, o una composición farmacéutica que contiene dicho inhibidor, para su uso en:

- (a) tratamiento o prevención de la insuficiencia cardíaca; o
- (b) tratamiento de la lesión por reperfusión isquémica cardíaca,

en un sujeto, donde a dicho sujeto se le ha administrado terapia extracorpórea de ondas de choque cardíacas y donde dicho inhibidor o composición es para la administración antes, simultáneamente y/o después de la administración de dicha terapia de ondas de choque.

Por lo tanto, se describe en esta invención un inhibidor de DPP-4, o una composición farmacéutica que contiene dicho inhibidor, para su uso en la mejora del pronóstico de un sujeto con, o en riesgo de, insuficiencia cardíaca, donde a dicho sujeto se le ha administrado terapia de ondas de choque cardíacas extracorpóreas y donde dicho inhibidor o composición es para su administración antes, simultáneamente y/o después de la administración de dicha terapia de ondas de choque.

De manera ventajosa, el inventor también ha determinado que la combinación de tratamiento con ondas de choque y terapia con inhibidor de DPP-4 también funciona para promover la angiogénesis en el tejido cardíaco, lo que puede ser particularmente beneficioso en el tratamiento de sujetos con insuficiencia cardíaca (por ejemplo, cardiopatía isquémica crónica o isquemia miocárdica crónica) o lesión por reperfusión isquémica cardíaca.

Por lo tanto, se describe en esta invención un inhibidor de DPP-4, o una composición farmacéutica que contiene dicho inhibidor, para su uso en la inducción de la angiogénesis en el tejido cardíaco de un sujeto (por ejemplo, un sujeto con insuficiencia cardíaca (por ejemplo, enfermedad cardíaca isquémica crónica o isquemia miocárdica crónica) o lesión por reperfusión isquémica cardíaca), donde a dicho sujeto se le ha administrado terapia de ondas de choque cardíacas extracorpóreas y donde dicho inhibidor o composición es para su administración antes, simultáneamente y/o después de la administración de dicha terapia de ondas de choque. Por lo tanto, la invención proporciona un inhibidor de DPP-4, o una composición farmacéutica que contiene dicho inhibidor, para su uso en el tratamiento o la prevención de la insuficiencia cardíaca (por ejemplo, cardiopatía isquémica crónica o isquemia miocárdica crónica) o el tratamiento de una lesión por reperfusión isquémica cardíaca en un sujeto induciendo la angiogénesis en el tejido cardíaco de dicho sujeto, donde a dicho sujeto se le ha administrado una terapia de ondas de choque cardíacas extracorpóreas y donde dicho inhibidor o composición es para su administración antes, simultáneamente y/o después de la administración de dicha terapia de ondas de choque.

Será evidente que los usos descritos anteriormente para inducir la angiogénesis en el tejido cardíaco de un sujeto también se pueden usar para mejorar el pronóstico de un sujeto con, o en riesgo de, insuficiencia cardíaca.

También se sabe que las células madre secretan factores paracrinos que tienen efectos antiapoptóticos que podrían ser beneficiosos en pacientes que padecen ataques cardíacos y/o insuficiencia cardíaca, particularmente insuficiencia cardíaca causada por una lesión por reperfusión isquémica. Sin embargo, como se ha analizado anteriormente, la administración de células madre al corazón es muy invasiva, costosa y está asociada con una retención celular deficiente. Además, si bien las terapias de ondas de choque descritas anteriormente (incluida la terapia combinada) pueden minimizar el daño al tejido cardíaco causado por un infarto de miocardio, por ejemplo, una lesión por reperfusión isquémica cardíaca, no proporcionan ningún beneficio funcional para el corazón en términos de la mejora de la fracción de eyección, es decir, las terapias de ondas de choque descritas anteriormente no restauran la función del corazón ni reparan el daño causado por un infarto de miocardio, por ejemplo, una lesión por reperfusión isquémica cardíaca.

Por lo tanto, el inventor ha determinado además que los usos descritos anteriormente pueden mejorarse adicionalmente proporcionando a los sujetos células madre o células progenitoras que pueden reemplazar las células cardíacas, particularmente los cardiomiocitos, que murieron como consecuencia de las afecciones de estrés asociadas con el infarto de miocardio, por ejemplo, lesión por reperfusión isquémica. A este respecto, se cree que el secretoma a favor de la supervivencia (que puede estar en forma de uno o más exosomas) inducido en el tejido cardíaco tras la exposición a ondas de choque puede funcionar para atraer o reclutar células madre al tejido dañado, mejorando así la retención de las células dentro del corazón y permitiendo la reparación efectiva del tejido dañado (es decir, restaurando, al menos parte, de la función cardíaca perdida). En otras palabras, se puede ver que la terapia de ondas de choque proporciona un entorno que facilita o potencia la retención de células madre dentro del tejido cardíaco y el posterior injerto de dichas células dentro del tejido cardíaco. Si bien las células madre pueden administrarse al tejido cardíaco directamente, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intracoronaria, transendocárdica y/o intramiocárdica como se describió anteriormente, será evidente a partir de la discusión a continuación que la presente invención elimina la necesidad de administración invasiva de células madre.

A este respecto, además de proporcionar un entorno que facilita o potencia la retención de células madre dentro del tejido cardíaco, el secretoma del tejido cardíaco (que puede estar en forma de uno o más exosomas) inducido por la terapia de ondas de choque puede funcionar para atraer o reclutar células madre de sitios distintos del corazón, por ejemplo, células madre que están presentes en la sangre. En otras palabras, la terapia descrita en esta solicitud puede facilitar la migración de células madre al corazón. Esto puede permitir que las células madre se administren de forma no invasiva, es decir, mediante inyección en un sitio que no sea el corazón, por ejemplo, inyección en la circulación sanguínea periférica. Por lo tanto, la presente invención obvia la necesidad de cirugía a corazón abierto y la inyección directa de células madre al tejido cardíaco, por ejemplo, usando catéteres en el suministro de sangre coronaria, no es necesaria.

De manera ventajosa, la presente invención apoya el uso de células madre endógenas, por ejemplo, células madre que están presentes en la sangre del sujeto a tratar. Por lo tanto, la terapia de ondas de choque puede dar como resultado la orientación no invasiva (es decir, reclutamiento y posterior injerto) de células madre en la circulación periférica al tejido cardíaco. A este respecto, puede ser útil aumentar la cantidad de células madre presentes en la sangre, por ejemplo, utilizando un movilizador farmacológico de células madre, como la hormona paratiroidea, como se analiza con más detalle a continuación.

Así, en algunas realizaciones, el inhibidor de DPP-4 o la composición farmacéutica comprendiendo dicho inhibidor se proporciona como una preparación combinada con un movilizador farmacológico de células madre, por ejemplo, hormona paratiroidea o un fragmento de la misma, para uso o administración separada, simultánea o secuencial al sujeto (una llamada terapia de combinación).

En algunos sujetos (es decir, pacientes), puede ser beneficioso recoger células madre del sujeto (por ejemplo, antes del inicio del tratamiento) y administrar dichas células al sujeto (por ejemplo, mediante inyección en la circulación periférica) en el momento más apropiado, por ejemplo, antes de la terapia con ondas de choque como se analiza con más detalle a continuación. Por ejemplo, puede ser necesario recoger u obtener células madre de un sujeto si el sujeto no responde a los agentes utilizados para movilizar las células madre, por ejemplo, la hormona paratiroidea, o si dichos agentes están contraindicados. Puede ser útil expandir la población de células madre *in vitro* (es decir, para cultivar las células madre endógenas del sujeto *in vitro*) antes de la administración. Dichos procedimientos de expansión son bien conocidos en la técnica.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el inhibidor de DPP-4 o la composición farmacéutica comprendiendo dicho inhibidor se proporciona como una preparación combinada con células madre para su uso o administración separada, simultánea o secuencial a un sujeto (una denominada terapia de combinación).

Por lo tanto, en algunas realizaciones, las células madre se obtienen de dicho sujeto y opcionalmente se expanden *in vitro* antes de la administración. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las células madre son células madre exógenas, por ejemplo, células madre autogénicas.

En otras realizaciones, las células madre se pueden usar en combinación con agentes farmacológicos adecuados

para movilizar las células madre, como la hormona paratiroidea o un fragmento de la misma (la llamada terapia de combinación).

En algunos casos, puede ser deseable o necesario usar células madre de un sujeto donante. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las células madre son células madre de donantes exógenos, es decir, células madre alogénicas.

Será evidente que las células madre obtenidas o recogidas de un sujeto pueden no ser adecuadas para la administración inmediata, es decir, puede ser necesario o ventajoso modificar las células madre antes de la administración. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, puede ser útil expandir o cultivar las células madre *in vitro* para aumentar la cantidad de células madre para la administración. De manera adicional o alternativa, puede ser útil aislar o separar diferentes tipos de células madre antes de la administración. Además, en algunas realizaciones, las células madre pueden tratarse para diferenciar las células para hacerlas más adecuadas para su uso, por ejemplo, para diferenciar las células en tipos de células que pueden ser particularmente ventajosas en las terapias de la invención, por ejemplo, células de macrófagos M2c como se analiza a continuación. Por ejemplo, la recogida u obtención de células madre puede implicar el aislamiento de células progenitoras sanguíneas de un sujeto (por ejemplo, el sujeto a tratar o un sujeto donante), tales como células mononucleares derivadas de médula ósea, y el cultivo de dichas células *in vitro* en condiciones adecuadas para las células madre o poblaciones de células madre preferidas descritas con más detalle a continuación. Sin embargo, en algunas realizaciones, las células progenitoras sanguíneas no experimentan diferenciación *in vitro*, es decir, en algunas realizaciones las células madre para la administración son células progenitoras sanguíneas, por ejemplo, células mononucleares derivadas de médula ósea.

Como se analiza con más detalle en los Ejemplos a continuación, el inventor ha determinado que la exposición de las células endoteliales vasculares a las ondas de choque da como resultado el aumento rápido y transitorio de la expresión génica de SDF-1. La expresión máxima de SDF-1 se observa entre 2-6 horas, es decir, aproximadamente 4 horas, después de la exposición a ondas de choque, volviendo a los niveles iniciales en el punto de tiempo de 24 horas. Se observó un patrón de expresión similar para VEGFA y MCP1 en fibroblastos cardíacos, donde la expresión máxima se observa alrededor de 3 horas después de la exposición a ondas de choque. Sin embargo, si bien la exposición a ondas de choque aumenta la expresión de SDF-1 en fibroblastos, existe un retraso en la expresión de modo que la expresión máxima no se observa hasta al menos aproximadamente 24 horas después de la exposición a ondas de choque.

Como se discutió anteriormente, se cree que el secretoma (que puede estar en forma de uno o más exosomas) inducido por la terapia con ondas de choque puede actuar para reclutar células madre al tejido cardíaco y potenciar su retención en dicho tejido. Por consiguiente, en algunas realizaciones puede ser ventajoso administrar células madre y/o un movilizador farmacológico de células madre antes de la terapia con ondas de choque. Por ejemplo, las células madre y/o un movilizador farmacológico de células madre pueden administrarse (es decir, para administración) al menos 8 horas antes de la terapia con ondas de choque, por ejemplo, al menos 12, 16, 20, 24 horas antes de la terapia con ondas de choque. En algunas realizaciones, las células madre y/o un movilizador farmacológico de células madre pueden administrarse (es decir, para la administración) al menos 24, 30, 36, 42 o 48 horas antes de la terapia con ondas de choque.

En algunas realizaciones puede ser útil administrar células madre y/o un movilizador farmacológico de células madre inmediatamente después de la terapia con ondas de choque, es decir, tan pronto como sea posible después de la terapia con ondas de choque. Esto puede ser además de la administración previa descrita anteriormente o como una realización alternativa, es decir, en algunas realizaciones, las células madre y/o un movilizador farmacológico de células madre no se administran antes de la terapia con ondas de choque. La administración inmediatamente o tan pronto como sea posible después de la terapia con ondas de choque significa dentro de los minutos u horas posteriores a que se haya completado la terapia con ondas de choque, por ejemplo, dentro de los 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos posteriores a la finalización de la terapia con ondas de choque, es decir, la finalización de una dosis de terapia con ondas de choque, por ejemplo, 500-2000 pulsos. Por ejemplo, la administración puede ser dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 horas de la finalización de la terapia con ondas de choque. Como se analiza más adelante, en algunas realizaciones, la dosis de terapia de ondas de choque (por ejemplo, 500-2000 pulsos) puede administrarse durante más de una sesión, es decir, la administración de la dosis puede interrumpirse. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las células madre y/o un movilizador farmacológico de células madre se pueden administrar durante la terapia de ondas de choque, por ejemplo, durante una interrupción en la administración de una dosis de ondas de choque.

Los términos "terapia de ondas de choque" y "terapia de ondas de choque extracorpóreas" (ESWT - *Extracorporeal Shockwave Therapy*) se usan indistintamente en esta invención y se refieren a la administración de pulsos de alta amplitud de energía mecánica (ondas de presión acústica), similares a las ondas sonoras, típicamente generadas por una bobina electromagnética. En particular, la ESWT se refiere al uso de ondas de choque de "baja energía". A este respecto, las ondas de choque de "alta energía" pueden definirse como las utilizadas en la "litotricia por ondas de choque extracorpóreas" (ESWL - *Extracorporeal Shockwave Lithotripsy*), que es un tratamiento no invasivo de los cálculos renales. Por lo tanto, las ondas de choque de "baja energía" para su uso en la presente invención son distintas de las ondas de choque utilizadas en ESWL.

Por lo tanto, las ondas de choque de baja energía se pueden definir como ondas de choque que tienen una energía de aproximadamente 0,01-0,50 mJ/mm² (aproximadamente 0,1-5 Bar). Por el contrario, las ondas de choque de alta energía pueden definirse como ondas de choque que tienen una energía de al menos 0,85 mJ/mm² (aproximadamente 8,5 Bar). Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, las ondas de choque de baja energía para su uso en la presente invención tienen una energía de aproximadamente 0,01-0,45 mJ/mm², por ejemplo, 0,02-0,40, 0,03-0,35, 0,04-0,30 o 0,05-0,25 mJ/mm² (aproximadamente 0,1-4,5 Bar, por ejemplo, 0,2-4, 0,3-3,5, 0,4-3,0 o 0,5-2,5 Bar). Por ejemplo, las ondas de choque de baja energía para su uso en la presente invención tienen una energía de alrededor de 0,05, 0,10, 0,15, 0,2 o 0,25 mJ/mm² (aproximadamente 0,5, 1, 1,5, 2 o 2,5 Bar).

Las ondas de choque de baja energía pueden administrarse usando cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la terapia de ondas de choque puede administrarse usando un litotriptor de ondas de choque extracorpóreo electrohidráulico, tal como un litotriptor DUOLITH® SD1.

Los Ejemplos describen la administración de ondas de choque *in vitro* utilizando un aparato que genera ondas de choque radiales. Las ondas de choque radiales se extienden sobre una gran área de superficie y, por lo tanto, no penetran en el tejido profundo. Como tal, las ondas de choque radiales generalmente encuentran utilidad en el tratamiento de patologías cercanas a la superficie, como los síndromes de dolor miofascial. En consecuencia, las ondas de choque radiales son particularmente adecuadas para experimentos *in vitro*, donde no se requiere una penetración profunda. Por el contrario, los usos de la invención típicamente usan aparatos capaces de generar ondas de choque enfocadas, que son capaces de penetrar en el tejido profundo, tal como el corazón. Las ondas de choque enfocadas tienen un pequeño punto focal que permite dirigirse a un área específica del tejido. Tanto las ondas de choque radiales como las focalizadas son "ondas de presión" que generan respuestas biológicas similares, es decir, respuestas similares en células y tejidos. Por lo tanto, la diferencia principal entre las ondas de choque radiales y enfocadas en el contexto de la presente invención se refiere a la profundidad de penetración en el tejido. Por consiguiente, en un aspecto preferido de la invención, las ondas de choque utilizadas en los usos de la invención son ondas de choque enfocadas.

El término "extracorpóreo" significa que las ondas de choque se generan externamente al cuerpo y se transmiten, por ejemplo, desde una almohadilla, a través de la piel.

La terapia de ondas de choque implica la administración de múltiples pulsos de ondas de choque de baja energía. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la terapia de ondas de choque (es decir, una dosis de ondas de choque de baja energía) comprende la administración de al menos aproximadamente 500 pulsos de ondas de choque, tales como al menos 750, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 pulsos de ondas de choque. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la terapia con ondas de choque comprende la administración de aproximadamente 500-2000 pulsos, por ejemplo, 600-1900, 700-1800, 800-1700, 900-1600 o 1000-1500 pulsos.

La terapia de ondas de choque para su uso en la presente invención es terapia de ondas de choque cardíacas extracorpóreas, lo que significa que las ondas de choque se centran en el tejido cardíaco, como se describe con más detalle a continuación. En particular, los pulsos de onda de choque se suministran (es decir, se administran) durante los períodos de contracción isovolúmica y/o relajación isovolúmica del ciclo cardíaco. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la terapia con ondas de choque comprende la administración de pulsos de ondas de choque (es decir, uno o más pulsos) durante la contracción isovolúmica y/o el período de relajación isovolúmica del corazón.

El período de contracción isovolumétrica (isovolumétrica) es el tiempo en la sístole temprana durante el cual los ventrículos se contraen sin cambio de volumen (isovolumétricamente). Esta parte de corta duración de su contracción tiene lugar durante un momento en que las válvulas cardíacas están todas cerradas.

El período de tiempo de relajación isovolúmica (IVRT - *Isovolumic Relaxation Time*) se refiere a un intervalo en el ciclo cardíaco desde el cierre de la válvula aórtica hasta el inicio del llenado mediante la apertura de la válvula mitral.

Será evidente que, dependiendo de la frecuencia cardíaca, se puede administrar más de un pulso de onda de choque durante cada contracción isovolúmica y/o período de relajación isovolúmica. En consecuencia, la duración del tratamiento (es decir, la cantidad de tiempo requerido para administrar (administrar) como dosis de ondas de choque, por ejemplo, 500-2000 pulsos) dependerá de la frecuencia cardíaca del sujeto a tratar. Sin embargo, en algunas realizaciones, se prefiere que todos los pulsos de onda de choque (por ejemplo, 500-2000 pulsos) se administren dentro de un periodo de 4 horas, preferentemente dentro de un periodo de 3 horas o un periodo de 2 horas, por ejemplo, dentro de 1 hora. En algunos casos, puede no ser posible administrar todos los pulsos de onda de choque (es decir, una dosis de pulsos de onda de choque) en una sola sesión, por ejemplo, debido a la incomodidad del paciente. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los pulsos de onda de choque se administran en más de una sesión, es decir, los 500-2000 pulsos se administran en múltiples sesiones. Preferentemente, todas las sesiones se encuentran dentro del periodo de tiempo mencionado anteriormente, es decir, dentro de un periodo de 4 horas.

Los pulsos de onda de choque se suministran (es decir, se administran) a los segmentos o áreas enfermas del corazón

(por ejemplo, el tejido infartado) y su tejido cardíaco circundante. En algunas realizaciones, el punto focal de los pulsos de onda de choque puede dirigirse a una región específica del tejido cardíaco, es decir, los segmentos enfermos.

En algunas circunstancias, por ejemplo, en el caso de una situación aguda, como un sujeto que experimenta un infarto de miocardio, puede no haber tiempo suficiente para determinar la ubicación precisa de los segmentos enfermos (infartados), es decir, para mapear los segmentos enfermos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la ubicación de los segmentos enfermos o afectados (por ejemplo, infartados) puede determinarse generalmente utilizando reconocimiento de patrones de electrocardiograma (ECG) y/o visualización de ecocardiografía (eco) (es decir, un eco cardíaco, que es un sonograma del corazón). Por lo tanto, en algunas realizaciones, la región del corazón (es decir, tejido cardíaco) a la que se dirige la terapia con ondas de choque (es decir, la región donde se dirige el punto focal de los pulsos de ondas de choque) se determina mediante visualización por ecocardiografía (eco) y/o reconocimiento de patrones de ECG.

En algunos casos, por ejemplo, en el caso de una situación crónica (por ejemplo, el tratamiento de un sujeto con insuficiencia cardíaca) o después de que la condición de un paciente se haya estabilizado después del infarto de miocardio, la ubicación de los segmentos enfermos del corazón (por ejemplo, tejido infartado y/o cicatricial) se puede determinar con precisión utilizando imágenes de resonancia magnética cardíaca (MRI). En particular, la resonancia magnética cardíaca se puede usar para determinar el área en riesgo, el índice de rescate y para medir otros índices funcionales. Lo ideal es realizar una resonancia magnética cardíaca tan pronto como sea posible después del infarto de miocardio, por ejemplo, dentro de una semana del infarto de miocardio.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la región del corazón (es decir, el tejido cardíaco) a la que se dirige la terapia de ondas de choque (es decir, la región donde se dirige el punto focal de los pulsos de ondas de choque) se determina mediante MRI. En otras palabras, se puede requerir una etapa de determinar el tamaño del segmento enfermo del tejido cardíaco, es decir, determinar o evaluar el área y/o el volumen del tejido infartado, por ejemplo, tejido cicatricial.

La resonancia magnética cardíaca se puede utilizar para evaluar la eficacia de los usos terapéuticos de la invención. Por lo tanto, una etapa de MRI en el corazón de un sujeto después del tratamiento según la invención se puede usar para determinar la eficacia del tratamiento y/o para determinar el pronóstico del sujeto. Dichas etapas pueden realizarse a intervalos de tiempo apropiados, por ejemplo, diariamente, semanalmente, mensualmente y/o anualmente.

Como se analiza con más detalle a continuación, la insuficiencia cardíaca es una enfermedad progresiva. Por lo tanto, algunos sujetos (por ejemplo, sujetos con insuficiencia cardíaca crónica) pueden beneficiarse de sesiones de tratamiento con ondas de choque repetidas en combinación con los tratamientos farmacológicos descritos en esta solicitud. Por ejemplo, el tratamiento con ondas de choque (es decir, dosis de pulsos de ondas de choque) se puede proporcionar más de una vez a la semana, por ejemplo, dos o tres veces a la semana. Además, la o las sesiones de tratamiento semanales pueden repetirse o ciclarse, por ejemplo, cada semana, cada dos semanas, cada mes o cada dos meses durante un máximo de 6 meses. Además, estos ciclos se pueden repetir, por ejemplo, trimestralmente, bianualmente, anualmente, etc., por ejemplo, para mantener los efectos beneficiosos, especialmente en pacientes con un infarto establecido donde la viabilidad de los cardiomiocitos restantes está en riesgo. Como se mencionó anteriormente, la eficacia del tratamiento se puede controlar mediante resonancia magnética cardíaca y un programa de tratamiento adecuado dependerá del sujeto a tratar y está dentro del alcance de un experto en la materia.

El inhibidor de DPP-4 para su uso en la terapia combinada de la invención puede administrarse antes, simultáneamente y/o después de la administración de la terapia de ondas de choque. En realizaciones particularmente preferidas de la invención, la administración del inhibidor de DPP-4 comienza antes de la terapia de ondas de choque y se administra a lo largo del transcurso de la terapia de ondas de choque. Por lo tanto, por ejemplo, cuando la terapia con ondas de choque se administra durante un transcurso de semanas o meses, el inhibidor de DPP-4 se administra al sujeto continuamente durante ese periodo, por ejemplo, se administran dosis diarias o semanales del inhibidor de DPP-4 al sujeto durante el periodo de tratamiento con ondas de choque. Preferentemente, el inhibidor de DPP-4 se administrará antes del inicio de la terapia con ondas de choque y se puede continuar después de la terapia con ondas de choque para maximizar los efectos. Por ejemplo, la administración del inhibidor de DPP-4 puede comenzar semanas, por ejemplo, 1-4, 1-3 o 1-2 semanas, antes de la primera dosis de pulsos de onda de choque y puede continuar durante semanas o meses después de la última dosis de pulsos de onda de choque, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses después de que se administre la última dosis de pulsos de onda de choque.

Los términos "inhibidor de DPP-4" o "antagonista de DPP-4" se refieren a agentes capaces de inhibir, reducir o bloquear directa o indirectamente la actividad o función de DPP-4. Por ejemplo, los inhibidores directos incluyen agentes que interactúan directamente con DPP-4 para inhibir, reducir o bloquear la actividad o función de DPP-4. Dichos agentes pueden funcionar a través de la inhibición competitiva, la inhibición no competitiva, la inhibición sobre-competitiva o la inhibición mixta. Inhibidores indirectos no interactúan directamente con DPP-4. Por lo tanto, por ejemplo, los inhibidores indirectos pueden inhibir, reducir o bloquear la actividad o función de DPP-4 al reducir la expresión del gen que codifica la enzima DPP-4. En una realización preferida de la invención, el inhibidor de DPP-4 inhibe, reduce o bloquea directamente la actividad o función de DPP-4.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, el término inhibidor de DPP-4 se refiere a una clase de fármacos hipoglucémicos orales que bloquean la actividad de DPP-4 directamente. Inhibidores de DPP-4 generalmente se utilizan para bloquear la degradación del péptido similar al glucagón 1 (GLP1) y encontrar utilidad en el tratamiento de la diabetes. Ejemplos de inhibidores de DPP-4 incluyen sitagliptina, linagliptina, vildagliptina, saxagliptina, gemigliptina, anagliptina, teneligliptina, alogliptina, trelagliptina, dutogliptina, omarigliptina y lupeol. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el inhibidor de DPP-4 para su uso en la invención puede ser sitagliptina, linagliptina, vildagliptina, gemigliptina, anagliptina, teneligliptina, trelagliptina, dutogliptina, omarigliptina, lupeol o una combinación de los mismos. En una realización particularmente preferida de la invención, el inhibidor de DPP-4 para su uso en la invención puede ser sitagliptina, linagliptina o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones particularmente preferidas de la invención, el inhibidor de DPP-4 para su uso en la invención no es alogliptina o saxagliptina.

También se incluyen las sales de dichos compuestos, incluidas las sales orgánicas e inorgánicas (por ejemplo, con contraiones de metales alcalinos y alcalinotérreos, amonio, etanolamina, dietanolamina y meglumina, cloruro, carbonato de hidrógeno, fosfato, sulfato y acetato). Sales farmacéuticamente y/o fisiológicamente aceptables apropiadas están bien descritas en la bibliografía farmacéutica. Además, algunas de estas sales pueden formar solvatos con agua o disolventes orgánicos tales como etanol. Dichos solvatos también están incluidos dentro del alcance de esta invención.

Los términos "célula madre" y "célula progenitora", como se usan en esta invención, se refieren a células biológicas indiferenciadas que pueden diferenciarse en células especializadas, es decir, células totipotentes, pluripotentes o multipotentes. Las células madre son células madre no embrionarias. En particular, las células madre o células progenitoras para su uso en la presente invención son capaces de diferenciarse en células madre cardíacas y/o cardiomiocitos. En realizaciones donde a los sujetos se les administra un agente que moviliza células madre, las células madre o células progenitoras pueden derivar o reclutarse de la circulación periférica, es decir, sangre. De manera similar, en realizaciones donde las células madre o células progenitoras se recogen u obtienen de un sujeto antes de la administración, las células madre o células progenitoras típicamente se pueden recoger u obtener de la circulación periférica, es decir, sangre, del sujeto a tratar o un sujeto donante. Sin embargo, será evidente que las células madre o células progenitoras se pueden cosechar u obtener de otros tejidos apropiados, tales como la médula ósea. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las células madre o células progenitoras se derivan de o comprenden células mononucleares derivadas de médula ósea.

El término "células mononucleares derivadas de la médula ósea" (BM-MNC) se refiere a una población de células que incluye células progenitoras hematopoyéticas, células linfoides (linfocitos (por ejemplo, células T) y células plasmáticas), monocitos y macrófagos. Si bien no se desea limitarse a la teoría, se cree que los macrófagos M2 y las células progenitoras hematopoyéticas pueden actuar en combinación en el rescate, reparación o facilitar el reemplazo de cardiomiocitos dañados o muertos, por ejemplo, como resultado de una lesión por reperusión isquémica. También se postula que las células T son atraídas (reclutadas) al tejido cardíaco después de la terapia de ondas de choque (incluida la terapia combinada), lo que crearía un entorno propicio para la supervivencia celular.

Por lo tanto, en realizaciones preferidas de la invención, puede ser útil usar una población o combinación de células madre, es decir, las células madre o células progenitoras comprendiendo una población de células comprendiendo células progenitoras hematopoyéticas y opcionalmente uno o más tipos de células seleccionadas de células linfoides (linfocitos, por ejemplo, células T), monocitos y macrófagos. En algunos casos, puede ser útil usar un subconjunto de BM-MNC. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las células madre o células progenitoras son o comprenden células progenitoras hematopoyéticas y opcionalmente macrófagos, particularmente macrófagos M2.

El término "macrófagos M2" (también denominados macrófagos activados alternativamente) se refiere ampliamente a macrófagos que funcionan en procedimientos constructivos como la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. Los macrófagos M2 también pueden desactivar la activación dañina del sistema inmunitario al producir citocinas antiinflamatorias como la IL-10. Los macrófagos M2 producen altos niveles de IL-10, TGF-beta y bajos niveles de IL-12. En particular, los macrófagos M2 no constituyen una población uniforme y, a menudo, se subdividen en las categorías M2a, M2b y M2c. Los macrófagos M2a están involucrados en la respuesta inmune de tipo Th2, por ejemplo, contra los parásitos. Los macrófagos M2b se consideran reguladores de la inmunidad y son inducidos por IL-1, LPS y complejos inmunes. Los macrófagos M2c se inducen en presencia de IL-10 y TGF-B. A menudo se les conoce como desactivados o antiinflamatorios y se sabe que están involucrados en la reparación y remodelación de tejidos. Producen grandes cantidades de IL-10 y TGF-beta y expresan múltiples receptores, tales como: CD163, CD206, RAGE y otros receptores depuradores. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los macrófagos M2 son macrófagos M2c.

El término "movilizador farmacológico de células madre" se refiere a agentes capaces de inducir, mejorar o aumentar directa o indirectamente el número de células madre en la circulación periférica de un sujeto. En particular, el movilizador de células madre farmacológico puede ser un movilizador de células madre hematopoyéticas. En la técnica se conocen diversos agentes, tales como hormona paratiroidea, G-CSF, ancestim, mozobil, plerixafor y stemgen y cualquier agente de este tipo se puede usar en los usos de la invención. En una realización preferida de la invención,

el movilizador farmacológico de células madre es hormona paratiroidea o un fragmento de la misma.

La hormona paratiroidea (PTH), también llamada parathormona o paratirina, es una hormona secretada por las glándulas paratiroides. La PTH es secretada por las células principales de las glándulas paratiroides como un polipéptido que contiene 84 aminoácidos, que es una prohormona. En particular, la interacción hormona-receptor efectiva requiere únicamente los aminoácidos 34-N-extremos de la prohormona. Por lo tanto, el fragmento de PTH para su uso en la invención comprende al menos los 34 aminoácidos del extremo N de la PTH. En algunas realizaciones, el fragmento comprende o consiste en teriparatida. La teriparatida es una forma recombinante de PTH que consiste en los aminoácidos 34-N-extremos de PTH.

El término "injerto" se refiere a la incorporación de tejido injertado en el cuerpo del huésped. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el injerto se refiere a la incorporación de células madre en el tejido cardíaco del sujeto a tratar. Las células madre pueden ser endógenas al sujeto a tratar, por ejemplo, movilizadas como resultado de la administración de un movilizador de células madre, tal como la hormona paratiroidea. De manera alternativa, las células madre pueden ser exógenas, es decir, administradas por separado, por ejemplo, obtenidas o recogidas del sujeto que se va a tratar o de un sujeto donante, opcionalmente modificadas *in vitro*, y posteriormente administradas al sujeto que se va a tratar.

El término "insuficiencia cardíaca", como se usa en esta invención, incluye cualquier afección caracterizada por una función cardíaca alterada, específicamente una función ventricular alterada (disfunción ventricular), ya sea debido a una acción de bombeo reducida (disfunción sistólica) o un llenado reducido (disfunción diastólica). La disfunción sistólica puede describirse como una afección de disfunción contráctil ventricular. Se observa un vaciado ventricular inadecuado. La disfunción diastólica puede describirse como resistencia al llenado ventricular. Por lo tanto, la insuficiencia cardíaca puede considerarse una afección ventricular o una afección de insuficiencia ventricular.

La insuficiencia cardíaca puede ser del lado izquierdo (afectación o disfunción ventricular izquierda) o del lado derecho (afectación o disfunción ventricular derecha) o puede afectar ambos lados del corazón (ventrículos derecho e izquierdo). La insuficiencia cardíaca implica una función alterada del miocardio del corazón. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los usos terapéuticos descritos en esta solicitud pueden mejorar la función del miocardio del corazón. Sin embargo, en algunos pacientes, especialmente en la fase temprana de la insuficiencia cardíaca, la fracción de eyección (discutida a continuación) podría estar dentro de los parámetros normales, por ejemplo, 50 % o más, es decir, 50-70 %. Por ejemplo, varios mecanismos compensatorios pueden aumentar el volumen sistólico de modo que la fracción de eyección no se reduzca inmediatamente (por ejemplo, mediante la alteración de la precarga, la poscarga, la resistencia vascular sistémica u otro mecanismo compensatorio). Por lo tanto, en algunas realizaciones, los usos terapéuticos descritos en esta solicitud pueden mantener la función del miocardio del corazón.

En particular, se refieren a las formas crónicas de insuficiencia cardíaca (es decir, insuficiencia cardíaca crónica).

Por lo tanto, la insuficiencia cardíaca puede definirse como un trastorno que puede resultar de cualquier afección que reduzca la capacidad del corazón para bombear sangre. A menudo, la causa es la disminución de la contractilidad del miocardio como resultado de la disminución del flujo sanguíneo coronario (por ejemplo, insuficiencia cardíaca causada por enfermedad de las arterias coronarias (CAD - *Coronary Artery Disease*) o enfermedad isquémica coronaria), pero la falta de bombeo de cantidades adecuadas de sangre también puede ser causada por daño a las válvulas cardíacas, presión externa alrededor del corazón, enfermedades musculares cardíacas primarias (por ejemplo, miocardiopatía dilatada idiopática) o cualquier otra anomalía que haga que el corazón sea una bomba hipoeeficaz. Como se mencionó anteriormente, la insuficiencia cardíaca crónica es particularmente preocupante.

Por lo tanto, se incluye la insuficiencia cardíaca causada por o resultante de una cardiopatía isquémica (miocardiopatía isquémica), particularmente la cardiopatía isquémica crónica (por ejemplo, isquemia miocárdica crónica). Por lo tanto, la insuficiencia cardíaca a tratar mediante los usos de la invención es insuficiencia cardíaca crónica o isquémica. En realizaciones particularmente preferidas de la invención, la insuficiencia cardíaca que se va a tratar con los usos de la presente invención es el resultado de una lesión por perfusión isquémica cardíaca, por ejemplo, causada por un infarto de miocardio.

Como se describió anteriormente, la lesión por perfusión isquémica cardíaca se refiere al daño al tejido cardíaco causado cuando el suministro de sangre regresa al tejido cardíaco después de un período de isquemia o falta de oxígeno (anoxia, hipoxia). La ausencia de oxígeno y nutrientes de la sangre durante el período isquémico crea una condición donde la restauración de la circulación y la rápida elevación de los niveles de oxígeno (es decir, normoxia o hiperoxia) produce inflamación y daño oxidativo a través de la inducción de estrés oxidativo en lugar de la restauración de la función normal. Esto, a su vez, puede dar lugar a la apoptosis de los miocitos y un posterior deterioro del miocardio del corazón.

"Hipoxia" se refiere a una condición de baja tensión de oxígeno, típicamente en el intervalo de 1-5 % O₂, y a menudo se encuentra en la región central de los tumores debido a una mala vascularización. "Anoxia" se refiere a una ausencia sustancial de oxígeno, por ejemplo, tensiones de oxígeno de menos de 0,5 % de O₂, tal como menos de 0,1 % de O₂.

"Normoxia" se refiere a tensiones de oxígeno entre 10-21 %. "Hiperoxia" se refiere a tensiones de oxígeno superiores al 21 %.

5 La insuficiencia cardíaca puede manifestarse de dos maneras: (1) por una disminución del gasto cardíaco o (2) por un bloqueo de la sangre en las venas detrás del corazón izquierdo o derecho. El corazón puede fallar como una unidad completa o el lado izquierdo o el lado derecho pueden fallar independientemente el uno del otro. De cualquier manera, la insuficiencia cardíaca puede provocar congestión circulatoria y esto en el pasado se ha denominado insuficiencia cardíaca congestiva.

10 La insuficiencia cardíaca se puede dividir en dos fases, insuficiencia cardíaca aguda (a corto plazo e inestable) e insuficiencia cardíaca crónica (a largo plazo y relativamente estable). La división entre las dos es difícil de definir con precisión, pero en general la insuficiencia cardíaca aguda es la etapa de la insuficiencia que se produce inmediatamente después del daño cardíaco (es decir, tiene un inicio rápido y un curso corto) y se asocia con inestabilidad en la función cardíaca y la circulación, por ejemplo, una caída repentina del gasto cardíaco. Siempre que
15 la fase aguda no sea tan grave como para provocar la muerte, los reflejos simpáticos del cuerpo se activan inmediatamente y pueden compensar la pérdida repentina de la función cardíaca. Dicha compensación a menudo puede ser tan efectiva y rápida que es posible que no se sienta un efecto notable en el sujeto si un sujeto permanece tranquilo.

20 Después de los primeros minutos de un ataque cardíaco agudo, comienza un estado secundario prolongado. Esto se caracteriza por una retención de líquido por los riñones y por la recuperación progresiva del corazón durante un período de varias semanas a meses hasta el punto en que la afección cardíaca se estabiliza. Esta fase de estabilidad se conoce como insuficiencia cardíaca crónica. Aunque el corazón se ha compensado y estabilizado, todavía está débil y puede debilitarse progresivamente.

25 Por lo tanto, si bien la fase aguda de la insuficiencia cardíaca finaliza con relativa rapidez, la estabilidad asociada con la fase crónica de la insuficiencia cardíaca puede tardar meses en desarrollarse. En general, se puede considerar que un paciente que presenta síntomas de insuficiencia cardíaca durante más de 3 meses o más preferentemente más de 6 meses tiene insuficiencia cardíaca crónica, siempre que no se hayan producido más síntomas de insuficiencia
30 cardíaca aguda durante este período de 3 meses o 6 meses.

Por lo tanto, esto significa que, aunque los síntomas varían en gran medida entre los sujetos, los sujetos con insuficiencia cardíaca, y particularmente insuficiencia cardíaca crónica, característicamente tienen una función cardíaca reducida y, en particular, una función ventricular reducida. La manifestación más común de la reducción del
35 rendimiento cardíaco es la disfunción sistólica. Por lo tanto, la insuficiencia cardíaca puede ser insuficiencia cardíaca sistólica. Por ejemplo, dichos sujetos muestran una fracción de eyección ventricular reducida, particularmente una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) reducida en comparación con un sujeto "normal" que no ha sufrido insuficiencia cardíaca. En personas normales, la fracción de eyección del ventrículo izquierdo suele ser superior al 60 % (normalmente entre el 55 % y el 70 %), mientras que una fracción de eyección inferior al 45 %, en particular inferior
40 al 40 %, se caracteriza como disfunción sistólica. Por lo tanto, una FEVI de menos del 45 %, en particular menos del 40 %, es característica de la función cardíaca reducida en sujetos con insuficiencia cardíaca, en particular insuficiencia cardíaca crónica. Típicamente, una fracción de eyección de 35 %-45 % puede caracterizarse como una función cardíaca levemente alterada. Una fracción de eyección del 25 %-35 % puede caracterizarse como una función cardíaca moderadamente deteriorada. Una fracción de eyección de menos del 25 % puede caracterizarse como una función
45 cardíaca gravemente alterada. Sujetos con una fracción de eyección de menos del 15 % pueden caracterizarse por tener insuficiencia cardíaca en etapa terminal y pueden ser candidatos para un trasplante de corazón. No se espera que sujetos con una fracción de eyección de menos del 5 % sobrevivan a largo plazo.

Menos común que la disfunción sistólica es la disfunción diastólica donde la fracción de eyección está relativamente conservada (por ejemplo, EF ventricular izquierda >40 %) o normal, pero donde el llenado ventricular, por ejemplo, el
50 llenado ventricular izquierdo, se reduce.

Sujetos preferidos para tratamiento según la presente invención incluyen aquellos con una FEVI inferior al 40 % (FEVI <0,40). En algunas realizaciones, los sujetos pueden definirse como aquellos con una FEVI de menos del 35 % (FEVI <0,35). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, algunos sujetos en la fase temprana de la insuficiencia
55 cardíaca pueden tener una FEVI normal, por ejemplo, 45 % o más. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los sujetos para el tratamiento según la presente invención incluyen aquellos con una FEVI de menos del 60 % (FEVI <0,60), preferentemente menos del 55 % (FEVI <0,55), tal como menos del 50 % (FEVI <0,50) o menos del 45 % (FEVI <0,45).

60 Otras características de la función cardíaca reducida que se pueden observar en la insuficiencia cardíaca incluyen una fracción de eyección del ventrículo derecho reducida, una capacidad de ejercicio reducida y variables hemodinámicas deterioradas, como una disminución del gasto cardíaco, un aumento de la presión arterial pulmonar y un aumento de la frecuencia cardíaca y la presión arterial baja.

65 El sistema de clasificación de la New York Heart Association (NYHA) divide la enfermedad cardíaca en cuatro clases,

dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Clase NYHA I: Pacientes con enfermedad cardíaca pero sin limitaciones resultantes de la actividad física, por ejemplo, sin dificultad para respirar, fatiga o palpitaciones cardíacas con actividad física ordinaria; Clase II: Pacientes con enfermedad cardíaca que resulta en una ligera limitación de la actividad física, por ejemplo, dificultad para respirar, fatiga o palpitaciones del corazón con la actividad física ordinaria, pero los pacientes se sienten cómodos en reposo. Clase III: Pacientes con enfermedad cardíaca que resulta en una marcada limitación del rendimiento físico, por ejemplo, dificultad para respirar, fatiga o palpitaciones del corazón con menos de la actividad física ordinaria, pero los pacientes se sienten cómodos en reposo. Clase IV: Pacientes con enfermedad cardíaca que resultan en incapacidad para realizar cualquier actividad física sin molestias, por ejemplo, dificultad para respirar, fatiga o palpitaciones del corazón con cualquier esfuerzo físico y los síntomas pueden estar presentes incluso en reposo.

La invención se puede usar para el tratamiento o la profilaxis de todas las clases de insuficiencia cardíaca, pero particularmente las clases II-IV o los sujetos en las clases III-IV. Por lo tanto, el paciente o sujeto puede estar en una o más de las clases I a IV, pero preferentemente están en las clases II-IV o III-IV.

Por lo tanto, la presente invención puede usarse para el tratamiento o la prevención (profilaxis) de cualquier tipo de insuficiencia cardíaca, independientemente de la causa o la etiología. La resistencia del corazón a la insuficiencia cardíaca puede aumentar. Por lo tanto, la presente invención puede usarse para tratar la insuficiencia cardíaca establecida o sintomática o manifiesta, particularmente la insuficiencia cardíaca crónica, pero que incluye también la insuficiencia cardíaca aguda o la insuficiencia cardíaca que está evolucionando o desarrollándose, incluida la insuficiencia cardíaca incipiente o la insuficiencia cardíaca que es asintomática. También se puede usar para prevenir o retrasar la aparición de insuficiencia cardíaca o para prevenir, limitar o reducir el desarrollo de insuficiencia cardíaca, por ejemplo, para reducir o limitar el grado en que se desarrolla la insuficiencia cardíaca o para reducir la susceptibilidad del corazón a la insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, por ejemplo, el desarrollo de insuficiencia cardíaca terminal puede retrasarse. Por lo tanto, visto alternativamente, la invención puede usarse para mejorar el pronóstico de un sujeto con, o en riesgo de, insuficiencia cardíaca.

Como se mencionó anteriormente, la insuficiencia cardíaca, particularmente la insuficiencia cardíaca crónica, a tratar según la presente invención puede ser el resultado de cualquier causa, por ejemplo, puede ser el resultado de una enfermedad primaria o puede ser secundaria a otra enfermedad. En una realización de la invención, la insuficiencia cardíaca a tratar es insuficiencia cardíaca crónica secundaria a cardiomiopatía dilatada idiopática (IDCM - *Idiopathic Dilated Cardiomyopathy*) y/o enfermedad isquémica coronaria (enfermedad de la arteria coronaria - CAD - *Coronary Artery Disease*).

Particularmente, en una realización preferida adicional de la invención, la insuficiencia cardíaca a tratar según la invención es insuficiencia cardíaca posterior al infarto o insuficiencia cardíaca isquémica.

Otros tipos de insuficiencia cardíaca que pueden tratarse según la invención incluyen insuficiencia cardíaca inducida por un aumento constante después de la carga, tal como insuficiencia cardíaca hipertensiva. Dentro del alcance de esta invención se incluye la insuficiencia cardíaca que surge de cualquier otra causa, por ejemplo, como se mencionó anteriormente.

Como se señaló anteriormente, los sujetos a tratar según la presente invención pueden presentar insuficiencia cardíaca sintomática. Los síntomas de insuficiencia cardíaca se enumeran anteriormente y pueden incluir aumento de peso, hinchazón de pies y tobillos o abdomen, venas del cuello pronunciadas, pérdida de apetito, indigestión, náuseas y vómitos, dificultad para respirar con la actividad o después de acostarse, dificultad para dormir, fatiga, debilidad o desmayo, palpitaciones, pulso irregular o rápido, disminución del estado de alerta o la concentración, tos, disminución de la producción de orina y necesidad de orinar por la noche, aunque no todos o ninguno de estos síntomas pueden estar presentes con insuficiencia cardíaca.

Otras características de la insuficiencia cardíaca que pueden manifestarse incluyen fracciones de eyección reducidas (LV y/o RV), capacidad de ejercicio reducida y variables hemodinámicas alteradas como las enumeradas anteriormente.

Los sujetos pueden estar recibiendo tratamientos estándar para la insuficiencia cardíaca, incluidos tratamientos farmacológicos estándar tales como uno o más de betabloqueantes, inhibidores de ECA, ARB, antagonistas de la aldosterona, diuréticos, antihipertensivos, glucósidos cardíacos, terapia de combinación de receptor de angiotensina-inhibidor de neprilisina (ARNI) (por ejemplo, valsartán/sacubitril), etc. En particular, los sujetos pueden o no estar recibiendo betabloqueantes. Por ejemplo, el sujeto puede estar recibiendo tratamiento con un agonista de NPR-A, tal como BNP, por ejemplo, BNP recombinante o un análogo o derivado del mismo, u otro péptido natriurético o un análogo o derivado del mismo.

El desarrollo o la progresión de la insuficiencia cardíaca puede estar asociado con la remodelación ventricular, particularmente la remodelación ventricular izquierda, que se manifiesta como aumentos graduales en los volúmenes diastólicos finales y sistólicos finales del ventrículo izquierdo, adelgazamiento de la pared y un cambio en la geometría

de la cámara a una forma más esférica y menos alargada. Este procedimiento generalmente se asocia con una disminución continua de la fracción de eyección. En una realización de la invención, la remodelación, y particularmente la remodelación ventricular, preferentemente ventricular izquierda, puede reducirse o evitarse.

- 5 La remodelación puede conducir a disfunción ventricular, particularmente disfunción ventricular izquierda. En otra realización de la invención, se trata o previene la disfunción ventricular.

10 Como se usa en esta invención, "tratamiento" se refiere a reducir, aliviar, mejorar o eliminar la enfermedad (término que incluye cualquier enfermedad, afección o trastorno), o uno o más síntomas de la misma, que se está tratando (por ejemplo, la insuficiencia cardíaca o un síntoma de la misma), en relación con la enfermedad o síntoma antes del tratamiento. El tratamiento puede incluir una mejora o aumento en la función o el rendimiento cardíaco, y en particular la función o el rendimiento ventricular, más particularmente la función o el rendimiento ventricular izquierdo.

15 "Profilaxis" o "prevención", como se usa en esta invención, se refiere a retrasar, limitar o reducir la enfermedad o el inicio de la enfermedad, o uno o más síntomas de la misma, por ejemplo, en relación con la enfermedad o síntoma antes del tratamiento profiláctico o preventivo. Por lo tanto, la profilaxis incluye explícitamente tanto la prevención absoluta de la aparición o desarrollo de la enfermedad o síntoma, como la reducción o limitación del desarrollo o progresión de la enfermedad o síntoma.

20 El sujeto o paciente de tratamiento o profilaxis puede ser cualquier sujeto animal humano o no humano, pero preferentemente será un mamífero, por ejemplo, un ser humano o cualquier ganado o animal doméstico, por ejemplo, ratones, ratas, cerdos, gatos, perros, ovejas, conejos, caballos, vacas o monos. Más preferentemente, el sujeto será un sujeto humano.

25 Dada la naturaleza de la mayoría de las formas de enfermedad cardíaca, no es de esperar que el "tratamiento" según la presente invención dé como resultado una cura completa de la insuficiencia cardíaca en cuestión. Más bien, el "tratamiento" según la presente invención incluye una mejora o alivio de cualquiera de los síntomas asociados con la insuficiencia cardíaca y también una mejor calidad de vida para un paciente y, en última instancia, una vida útil prolongada y una mejor supervivencia, es decir, un mejor pronóstico.

30 "Tratamiento" según la presente invención también incluye una mejora o aumento de la funcionalidad del corazón o, en otras palabras, una mejora o aumento a largo plazo en la función o el rendimiento cardíaco. En particular, el tratamiento según la presente invención puede dar como resultado una mejora o aumento en uno o más de los síntomas y parámetros funcionales asociados con la insuficiencia cardíaca y, en particular, los síntomas y parámetros relacionados con la función ventricular y, en particular, con la función ventricular izquierda.

35 Un síntoma y parámetro importante asociado con la mejora de la función cardíaca en la insuficiencia cardíaca es un aumento en la fracción de eyección ventricular y, en particular, en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI). Esto se puede evaluar mediante procedimientos estándar bien conocidos y documentados en la técnica, por ejemplo, mediante ecocardiografía ("eco", es decir, un eco cardíaco, que es un sonograma del corazón), electrocardiograma (ECG), ventriculografía de radionucleidos sincronizados con ECG (escaneo MUGA), angiografía o imágenes de resonancia magnética (MRI), y normalmente se lleva a cabo cuando el sujeto está en reposo. Se ha descubierto que una mejora en la FEVI está asociada con una mejor supervivencia entre los pacientes con insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, este es un parámetro importante y ventajoso para mejorar en sujetos tratados según la presente invención. RVEF también puede incrementarse.

40 Si bien una mejora de la FEVI es particularmente importante para la mejora general de la función cardíaca, se puede mejorar una serie de otros parámetros asociados con el rendimiento cardíaco según la presente invención. Uno de ellos es una mejora significativa en el estado clínico general y, por lo tanto, en el rendimiento clínico según lo evaluado por la clase funcional NYHA. En otras palabras, la clase funcional NYHA de un paciente puede reducirse después del tratamiento según la presente invención. Dicha evaluación clínica normalmente puede ser realizada por un cardiólogo capacitado.

45 Otros parámetros incluyen la capacidad de ejercicio, por ejemplo, medida por el consumo máximo de oxígeno y la carga máxima de trabajo. Como se indicó anteriormente, una disminución de la capacidad de ejercicio es un síntoma inconveniente y potencialmente debilitante de muchos pacientes con insuficiencia cardíaca. En la técnica se conocen bien y están documentados procedimientos para medir la capacidad de ejercicio. Por ejemplo, las pruebas de ejercicio se pueden llevar a cabo utilizando un ergómetro de bicicleta con freno eléctrico. Un protocolo ejemplar podría consistir en una velocidad de trabajo inicial de 20 W que aumenta en 20 W cada segundo minuto hasta el agotamiento (definido como la incapacidad de mantener la velocidad de pedaleo constante a 60 rpm). La absorción de oxígeno (VO₂) se puede medir utilizando, por ejemplo, el sistema EOS/- SPRINT. La VO₂ máxima se toma como la VO₂ más alta observada. Otro ejemplo de prueba de esfuerzo es la prueba de caminata de 6 minutos, donde se pide al paciente que camine el mayor tiempo posible durante 6 minutos en condiciones estandarizadas, y la distancia caminada representa una medida de la capacidad de ejercicio.

65

Los parámetros y variables ecocardiográficos hemodinámicos también se pueden evaluar para indicar una función cardíaca mejorada. Por ejemplo, la función cardíaca mejorada puede estar indicada por una disminución en la presión de cuña capilar pulmonar y/o en la presión de la arteria pulmonar, y/o un aumento en la frecuencia cardíaca máxima, la presión arterial sistólica máxima y el tiempo de desaceleración de la velocidad mitral. Las variables ecocardiográficas pueden medirse convenientemente mediante ecocardiografía realizada por un cardiólogo capacitado y las variables hemodinámicas pueden evaluarse convenientemente mediante cateterismo cardíaco del lado derecho según técnicas estándar.

Otra variable importante que se puede evaluar es el nivel plasmático de Nt-proANP o Nt-proBNP. Se han reconocido niveles aumentados o generalmente altos de Nt-proANP o Nt-proBNP como marcadores de disfunción cardíaca. Además, se ha demostrado en el pasado que los niveles de Nt-proANP se correlacionan con las presiones de la arteria pulmonar en la insuficiencia cardíaca y proporcionan información pronóstica importante en pacientes con insuficiencia cardíaca. Los niveles de Nt-proANP o Nt-proBNP en una muestra de sangre se pueden medir de varias maneras bien conocidas y documentadas en la técnica, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo. Antes del inmunoensayo, el plasma se separa de una muestra de sangre tomada del paciente nuevamente mediante procedimientos bien conocidos y documentados en la técnica.

La "mejora" o "aumento" descrito anteriormente en los síntomas, parámetros y/o pronóstico del sujeto incluye cualquier mejora o aumento medible cuando el parámetro en cuestión se compara con el parámetro equivalente en un individuo no tratado o cuando el parámetro en cuestión se compara con el parámetro equivalente en el mismo individuo tomado en un punto de tiempo anterior (por ejemplo, comparación con un nivel de "línea base"). Preferentemente, la mejora o el aumento serán estadísticamente significativos. Especialmente preferentemente, la mejora o el aumento de los síntomas, los parámetros y/o el pronóstico se asociarán con la mejora de la salud del paciente en cuestión y, más preferentemente, con una supervivencia prolongada.

Los procedimientos para determinar la significación estadística de las diferencias en los parámetros son bien conocidos y están documentados en la técnica. Por ejemplo, en esta solicitud un parámetro generalmente se considera significativo si una comparación estadística usando una prueba de significancia de dos colas tal como una prueba t de Student o una prueba de suma de rangos U de Mann-Whitney muestra un valor de probabilidad de $<0,05$.

Por lo tanto, la presente invención puede usarse en la mejora de la función cardíaca, particularmente la función cardíaca en la insuficiencia cardíaca. Más específicamente, a largo plazo, la presente invención puede usarse para aumentar la función ventricular, particularmente la función ventricular izquierda (por ejemplo, FEVI), más particularmente en la insuficiencia cardíaca.

La presente invención puede dar como resultado la reducción de los niveles plasmáticos de Nt-proANP o Nt-proBNP. Como se mencionó anteriormente, una reducción en los niveles plasmáticos de Nt-proANP o Nt-proBNP es un indicador de una mejor función y rendimiento cardíaco. "Reducción", como se usa en esta invención, incluye cualquier reducción medible cuando el parámetro en cuestión se compara con el parámetro equivalente en un individuo no tratado o cuando el parámetro en cuestión se compara con el parámetro equivalente en el mismo individuo tomado en un punto de tiempo anterior (por ejemplo, comparación con un nivel de "línea base"). Preferentemente, la reducción es estadísticamente significativa como se ha analizado anteriormente. Especialmente preferentemente, la reducción en los niveles de Nt-proANP o Nt-proBNP se asociará con una mejor sensación de salud en el paciente en cuestión y, más preferentemente, una supervivencia prolongada.

En un aspecto, se puede identificar que el paciente o sujeto necesita tratamiento o profilaxis de la insuficiencia cardíaca (por ejemplo, como que sufre de insuficiencia cardíaca, o como que está en riesgo de desarrollar, o es susceptible a, insuficiencia cardíaca), antes de que se administre la terapia combinada de la invención.

Dicha identificación puede basarse en síntomas y/o parámetros que son indicativos de insuficiencia cardíaca o riesgo de insuficiencia cardíaca, como se ha analizado anteriormente.

Como se analizó anteriormente, el rendimiento cardíaco puede aumentar después de la administración de la terapia combinada de la invención. Por consiguiente, los diversos aspectos de la presente invención como se presentaron y discutieron anteriormente pueden incluir además evaluar al sujeto que se está tratando para una mejora en el rendimiento cardíaco, o en la insuficiencia cardíaca o sus síntomas después de la administración de la terapia combinada de la invención. Como se ha analizado anteriormente, esta evaluación puede ser una evaluación de una mejora en el rendimiento o la función cardíaca, particularmente en el rendimiento o la función ventricular y especialmente en el ventrículo izquierdo, o de una mejora en cualquier síntoma o parámetro de insuficiencia cardíaca, como se ha analizado anteriormente.

Cuando el sujeto está en riesgo de desarrollar una insuficiencia cardíaca o es susceptible a la insuficiencia cardíaca, se puede evaluar al sujeto para determinar uno o más factores que son factores de riesgo de insuficiencia cardíaca. Por ejemplo, estas pueden ser enfermedades o afecciones isquémicas, por ejemplo, enfermedad de las arterias coronarias, cardiomiopatía, hipertensión, enfermedad valvular, defectos cardíacos congénitos o cualquier otra afección

o factor predisponente conocido en la técnica o descrito o mencionado anteriormente.

Después de la administración de la terapia combinada de la invención, se puede evaluar al sujeto para el desarrollo de insuficiencia cardíaca o para uno o más factores de riesgo de insuficiencia cardíaca.

La terapia de ondas de choque se usa en combinación con un agente farmacológico, es decir, un inhibidor de DPP-4 y opcionalmente un movilizador de células madre (por ejemplo, hormona paratiroidea), donde el agente farmacológico puede formularse convenientemente en una composición farmacéutica para su uso según la presente invención. Una composición farmacéutica se refiere a una composición comprendiendo un agente farmacológico (es decir, un agente o ingrediente farmacológicamente activo), por ejemplo, un inhibidor de DPP-4 y/o movilizador de células madre (por ejemplo, hormona paratiroidea) con al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, por ejemplo, se puede considerar que la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención (profilaxis) de la insuficiencia cardíaca, o en el tratamiento de la lesión por reperfusión isquémica cardíaca, en un sujeto, donde a dicho sujeto se le ha administrado terapia de ondas de choque cardíacas extracorpóreas y donde dicha composición comprende un inhibidor de DPP-4 junto con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, y es para su administración antes, simultáneamente y/o después de la administración de dicha terapia de ondas de choque.

El contenido apropiado de ingrediente activo (un agente farmacológico, es decir, un agente o ingrediente farmacológicamente activo) en dichas composiciones puede determinarse según los principios y procedimientos rutinarios en la técnica y puede determinarse fácilmente por el médico experto. Por lo tanto, por ejemplo, el ingrediente activo en tales composiciones puede comprender de 0,05 % a 99 % en peso de la formulación, por ejemplo de 0,1 % a 1,0 % o alrededor de 0,5 %. La concentración de ingrediente activo en la formulación dependerá del tipo de formulación. Por ejemplo, los productos enterales (por ejemplo, comprimidos y cápsulas) pueden tener típicamente de un 5 % a un 50 % de ingredientes activos en peso, mientras que las formulaciones parenterales suelen tener una menor concentración de compuesto activo, por ejemplo, de un 0,1 % a un 3 % de ingrediente activo en peso, por ejemplo, en una solución inyectable.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende que los ingredientes deben ser compatibles con otros ingredientes de la composición, así como fisiológicamente aceptables para el receptor.

Una composición farmacéutica puede formularse según cualquiera de los procedimientos convencionales conocidos en la técnica y ampliamente descritos en la bibliografía. Por lo tanto, el ingrediente activo (por ejemplo, un inhibidor de DPP-4) se puede incorporar, opcionalmente junto con otras sustancias activas, con uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes convencionales, para producir preparaciones galénicas convencionales que son adecuadas o se pueden hacer adecuadas para administración por vía oral, subcutánea, intramuscular, intravenosa o cualquier otra administración tal como polvos, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, ungüentos, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles y productos similares. Una composición farmacéutica comprendiendo un ingrediente activo (por ejemplo, hormona paratiroidea) se puede preparar en una forma apropiada para infusión o inyección en un paciente. Dicha infusión o inyección es preferentemente intramuscular (i.m.), pero también se puede administrar por vía subcutánea (s.c.) o intravenosa (i.v.).

Preferentemente, las composiciones comprendiendo el inhibidor de DPP-4 pueden proporcionarse en una forma adaptada para la administración por vía oral. Por ejemplo, las formas farmacéuticas pueden incluir comprimidos, cápsulas, suspensiones y soluciones simples o recubiertas que contienen el componente activo (por ejemplo, inhibidor de DPP-4) opcionalmente junto con uno o más portadores y/o diluyentes convencionales inertes.

Preferentemente, las composiciones comprendiendo el agente farmacológico para movilizar células madre (por ejemplo, hormona paratiroidea) pueden proporcionarse en una forma adaptada para la administración parenteral, particularmente la administración intramuscular o intraabdominal. Por ejemplo, las formas farmacéuticas pueden incluir soluciones o suspensiones inyectables estériles opcionalmente junto con uno o más portadores y/o diluyentes convencionales inertes.

Ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados son lactosa, dextrosa, sacarosa, maltosa, glucosa, sorbitol, manitol, almidones, goma acacia, fosfato de calcio, aglinatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe de agua, agua, agua/etanol, agua/glicol, agua/polietileno, glicol, propilenglicol, metilcelulosa, metilhidroxibenzoatos, propilhidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio, aceite mineral o sustancias grasas tales como grasa dura o mezclas adecuadas de los mismos. Las composiciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes y similares. Las composiciones pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

También se pueden usar agentes solubilizantes y/o estabilizantes, por ejemplo, ciclodextrinas (CD) α , β , y γ ciclodextrina HP- β .

Dosis adecuadas variarán de un paciente a otro y pueden ser determinadas por el médico según el peso, la edad y el sexo del paciente, el modo de administración y la gravedad de la afección y también el ingrediente activo particular utilizado para el tratamiento. Las dosis unitarias ejemplares para administración por vía oral (por ejemplo, el inhibidor de DPP-4) pueden contener de 1 a 250 mg del ingrediente activo, aunque se entenderá que esto puede variar, por supuesto, dependiendo del antagonista particular utilizado, etc. Por ejemplo, una dosis unitaria de sitagliptina puede estar en el intervalo de 100 mg, por ejemplo, 75-125 mg, mientras que una dosis unitaria de linagliptina puede estar en el intervalo de 5 mg, por ejemplo, 1-10 mg. La dosis diaria para administración por vía oral puede estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg/día, por ejemplo, de 0,1 a 5 mg/kg/día, por ejemplo, de 0,1 a 2 mg/kg/día. Por ejemplo, un adulto de 70 kg recibiría una dosis diaria de 1 a 700 mg o de 0,7 a 700 mg, más generalmente de 1 a 350 mg o de 7 a 350 mg, por ejemplo, de 7 a 140 mg. Para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa o intramuscular) (por ejemplo, hormona paratiroidea), las dosis unitarias ejemplares pueden estar entre 0,1 µg y 100 µg, por ejemplo, entre 0,1 µg y 50µg, tal como 1-40, 2-35, 3-40, 4-35 o 5-25µg, por ejemplo, 20µg. La dosis diaria para administración parenteral puede estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0,001 a 1 µg/kg/día, por ejemplo, 0,001 a 0,5 µg/kg/día, por ejemplo, 0,001 a 0,3 µg/kg/día. Por ejemplo, un adulto de 70 kg recibiría una dosis diaria de 0,01 a 70 µg o de 0,07 a 70 µg, más generalmente de 0,07 a 35 µg o de 0,7 a 35 µg, por ejemplo, de 0,7 a 21 µg.

Las mejoras observadas en pacientes tratados según la presente invención se pueden observar después de unos pocos días, semanas o meses dependiendo del paciente individual. Una vez que se observa la mejora inicial, también puede ocurrir una mejora continua durante las semanas y meses posteriores. Como se indicó antes, el tratamiento puede continuarse durante el tiempo que se desee o sea necesario.

La terapia de combinación de la presente invención puede ser en lugar de, o además de (es decir, en combinación con) el uso de otros fármacos para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, otros fármacos conocidos para tratar la insuficiencia cardíaca podrían incluirse en las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente o pueden administrarse por separado, de una manera apropiada para el fármaco en cuestión.

Los fármacos o agentes adicionales o suplementarios adecuados para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca son bien conocidos y están documentados en la técnica e incluyen fármacos conocidos para su uso en el tratamiento de trastornos cardíacos. Por ejemplo, se pueden usar diuréticos, vasodilatadores, fármacos inotrópicos tales como digoxina o digitoxina, u otros compuestos tales como anticoagulantes, bloqueadores β, bloqueadores de angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, terapias de combinación de inhibidor de receptor de angiotensina-neprilisina (ARNI - *Angiotensin Receptor-Neprilysin Inhibitor*) (por ejemplo, valsartán/sacubitril) o antagonistas de aldosterona.

En algunas realizaciones, puede ser útil administrar azúcar, por ejemplo, glucosa, a los sujetos a tratar. En particular, las terapias de combinación de la invención utilizan inhibidores de DPP-4, que bloquean la degradación del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1). El GLP-1 aumenta la secreción de insulina al tiempo que inhibe la liberación de glucagón, lo que reduce los niveles de glucosa en plasma. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el agente complementario o adicional para la administración al sujeto que se va a tratar es glucosa.

Los fármacos o agentes adicionales o suplementarios pueden formularse por separado, para su administración junto con, por ejemplo, al mismo tiempo o secuencialmente con, o a intervalos separados de, los agentes activos para su uso en la terapia de ondas de choque combinada de la invención (por ejemplo, inhibidor de DPP-4 y/o movilizador farmacológico de células madre, por ejemplo, hormona paratiroidea).

Por lo tanto, los fármacos o agentes adicionales o suplementarios pueden proporcionarse con los agentes activos para su uso en la terapia de ondas de choque combinada de la invención en forma de un kit. Dicho kit puede comprender, por ejemplo, recipientes separados para (por ejemplo, comprendiendo o que contienen) los agentes activos para su uso en la terapia combinada de ondas de choque de la invención y fármacos o agentes adicionales o suplementarios, respectivamente, opcionalmente junto con instrucciones de uso.

Por ejemplo, se puede ver que la presente invención proporciona un kit o producto que contiene:

- (i) un inhibidor o composición farmacéutica de DPP-4 comprendiendo dicho inhibidor y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; y
- (ii) un agente farmacológico para movilizar células madre, tal como hormona paratiroidea o fragmento de la misma, o una composición farmacéutica comprendiendo dicho agente farmacológico y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; y opcionalmente
- (iii) un agente adicional, por ejemplo, un agente para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca o glucosa, o una composición farmacéutica comprendiendo dicho agente adicional y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable,

donde (i), (ii) y opcionalmente (iii) del kit o producto descrito anteriormente se proporcionan como una preparación

combinada para uso simultáneo, secuencial o separado en:

- (a) tratamiento o prevención de la insuficiencia cardíaca; o
- (b) tratamiento de la lesión por reperfusión isquémica cardíaca,

en un sujeto, donde a dicho sujeto se le ha administrado terapia de ondas de choque cardíacas extracorpóreas y donde (i) y/o (ii) son para la administración antes, simultáneamente y/o después de la administración de dicha terapia de ondas de choque.

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes con referencia a los siguientes dibujos donde:

La Figura 1 muestra un gráfico de barras que muestra el porcentaje de cardiomiocitos de rata viables en diversas condiciones de tratamiento (las barras de error representan la desviación estándar, **** $p \leq 0,001$, "ns" no significativo).

La Figura 2 muestra gráficos de barras de la cantidad relativa (cambio en número de veces) de (A) expresión génica de SDF-1 y (B) expresión génica de MCP-1 en tejido ventricular humano cuatro horas después de diversos tratamientos con ondas de choque (* $p > 0,05$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$).

La Figura 3 muestra gráficos de barras de la cantidad relativa (cambio en número de veces) de (A) expresión génica de ANG-1 (angiopoyetina) y (B) expresión génica de VEGFA (factor de crecimiento endotelial vascular A) en tejido ventricular humano cuatro horas después de varios tratamientos con ondas de choque (* $p > 0,05$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$).

La Figura 4 muestra gráficos de barras de la cantidad relativa (cambio en número de veces) de expresión génica de (A) NOS-3 (óxido nítrico sintasa 3) y (B) expresión génica de TAC-1 (precursor de taquicinia 1) en tejido ventricular humano cuatro horas después de diversos tratamientos con ondas de choque (* $p > 0,05$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$).

La Figura 5 muestra gráficas de la cantidad relativa (cambio en número de veces) de la expresión génica de SDF-1 a lo largo del tiempo en (A) células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y (B) fibroblastos cardíacos humanos después de varios tratamientos con ondas de choque (* $p > 0,05$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$).

La Figura 6 muestra gráficas de la cantidad relativa (cambio en número de veces) de (A) expresión génica de VEGFA y (B) expresión génica de MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1) a lo largo del tiempo en fibroblastos cardíacos humanos después de diversos tratamientos con ondas de choque (* $p > 0,05$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$).

La Figura 7 muestra gráficos de barras de la cantidad relativa (cambio en número de veces) en la fosforilación de AKT en cardiomiocitos de rata en diversas condiciones, donde (A) muestra el cambio relativo de p-AKT308 normalizado y (B) muestra el cambio relativo de la relación de p-AKT308 y AKT no fosforilado.

La Figura 8 muestra gráficos de barras de la cantidad relativa (cambio en número de veces) de (A) expresión génica de SDF-1 y (B) expresión génica de VEGFA en cardiomiocitos de rata cuatro horas después de varios tratamientos con ondas de choque.

La Figura 9 muestra fotomicrografías de secciones de tejido congelado de corazones de rata sometidos a los siguientes tratamientos: (A) sin tratamiento; (B) tratamiento con ondas de choque cardíacas extracorpóreas y sondas (gavages) con agua diarias; (C) tratamiento con ondas de choque cardíacas extracorpóreas y sondas con agua diarias de DPP4i; y (D) sondas con agua diarias de DPP4i, como se describe en el Ejemplo 7. Los círculos muestran áreas de depósitos marrones que son evidencia de la presencia de SDF-1.

La Figura 10 muestra fotografías de corazones de rata fijados sometidos a los siguientes tratamientos: (A) sin tratamiento; (B) tratamiento con ondas de choque cardíacas extracorpóreas y sondas (gavages) con agua diarias; (C) tratamiento con ondas de choque cardíacas extracorpóreas y sondas con agua diarias de DPP4i; y (D) sondas con agua diarias de DPP4i, como se describe en el Ejemplo 7.

Las barras de error en las Figuras 2-6 y 8 representan el intervalo de confianza (IC) del 95 %.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto del tratamiento con ondas de choque sobre la apoptosis inducida por hipoxia en cardiomiocitos de rata

Los cardiomiocitos primarios de rata se aislaron utilizando el procedimiento de Langendorff, donde los corazones explantados se perfundieron retrógradamente a través de la aorta con soluciones oxigenadas bajas en calcio y soluciones de colagenasa. A continuación, los corazones se cortaron en cubitos y se agitaron en soluciones de colagenasa para liberar las células. Las células se lavaron y los cardiomiocitos se seleccionaron a continuación positivamente utilizando centrifugación a baja velocidad y mediante adherencia a placas de cultivo recubiertas con laminina (placas de Petri).

Los cardiomiocitos de rata se expusieron a hipoxia severa durante 30 minutos (0 % O_2 , 100 % N_2). Los grupos que recibieron tratamientos con ondas de choque (1000 pulsos de 1 Bar o 2 Bar) se trataron inmediatamente después de

regresar a la normoxia. Las ondas de choque se administraron desde la parte inferior de las placas de Petri a través del contacto directo entre el aplicador de ondas de choque, en la pieza de mano del sistema de ondas de choque Swiss Dolarclast (EMS), junto con el gel de ultrasonido. En particular, el grupo que recibió SDF exógeno no recibió tratamiento con ondas de choque al regresar a la normoxia. La viabilidad de las células se evaluó contando el número de células en forma de varilla y en forma redonda (donde las células en forma de varilla son viables) por triplicado 24 horas después del tratamiento con ondas de choque o SDF. Los resultados se muestran en la Figura 1 y demuestran que el posacondicionamiento con terapia de ondas de choque inmediatamente después de la hipoxia aumenta la viabilidad de los cardiomiocitos en relación con los controles no tratados, lo que sugiere que la terapia de ondas de choque puede atenuar la lesión por reperfusión isquémica.

Ejemplo 2: Efecto del tratamiento con ondas de choque sobre la expresión génica en el tejido ventricular humano

El tejido ventricular cardíaco humano explantado se cortó en trozos pequeños y se cultivó individualmente en placas de 24 pocillos en medio M199. La exposición a diversas condiciones de onda de choque se realizó colocando temporalmente las piezas de tejido en tubos Eppendorf de 1,5 ml en medio M199. El aplicador de ondas de choque descrito en el Ejemplo 1 se acopló directamente a los tubos usando gel de ultrasonido. Los trozos de tejido se devolvieron a continuación a sus respectivos medios de cultivo en la incubadora (37 °C y CO₂ al 5 %) durante los puntos de tiempo de 4 horas y a continuación se almacenaron en ARN- Más tarde a -80 °C. En lotes, las muestras se homogeneizaron completamente en Trizol utilizando un homogeneizador de energía. El ARN se purificó utilizando cloroformo y columnas de centrifugación comerciales. La calidad del ARN se inspeccionó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop y se realizaron reacciones de transcripción inversa. La expresión génica de SDF1 (factor derivado del estroma 1), VEGFA (factor de crecimiento endotelial vascular A), MCP1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1), ANGP1 (angiopoyetina), TAC1 (precursor de taquiquinina 1) y NOS3 (óxido nítrico sintasa 3) se evaluó utilizando sondas Taqman en la mezcla maestra de expresión génica TaqMan normalizada utilizando GAPDH, en el sistema de PCR rápida en tiempo real Applied Biosystems™ 7900HT. Los cambios en el número de veces se calcularon utilizando el procedimiento $\Delta\Delta CT$. Los resultados se muestran en las Figuras 2-4 y demuestran que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los controles no tratados y los puntos de tiempo de 4 horas para todos los genes medidos.

Ejemplo 3: Efecto del tratamiento con ondas de choque sobre la expresión del gen SDF-1 en fibroblastos endoteliales y cardíacos humanos

Los tejidos ventriculares cardíacos humanos se disociaron usando collagenasa y las suspensiones de células individuales se lavaron, se colocaron en placas y se cultivaron en DMEM complementado con FCS al 10 %. HLIVEC se cosecharon de los cordones umbilicales humanos y se cultivaron en EGM2. Pases de células 3-5 se utilizaron en los experimentos.

Los fibroblastos cardíacos humanos y HUVEC se sometieron a tratamiento con ondas de choque como se describe en el Ejemplo 1 y, al alcanzar los puntos de tiempo, se retiró el medio y se lisaron las células con Trizol. La expresión génica de SDF1 se midió en diversos puntos temporales después del tratamiento con ondas de choque según el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Figura 5.

En fibroblastos cardíacos humanos, la expresión del gen SDF1 continuó aumentando en el punto de tiempo de 24 horas, mientras que la expresión del gen SDF1 alcanzó la expresión máxima entre 2-6 horas en HUVEC y regresó a los niveles iniciales dentro de las 24 horas del tratamiento con ondas de choque. Estos resultados demuestran que el tratamiento con ondas de choque indujo la expresión sostenida del gen SDF1 específicamente en fibroblastos cardíacos.

Ejemplo 4: Efecto del tratamiento con ondas de choque sobre la expresión génica en fibroblastos cardíacos humanos

Fibroblastos cardíacos humanos se obtuvieron según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3 y se sometieron a tratamiento con ondas de choque como se describe en el Ejemplo 1. La expresión génica de VEGFA y MCP1 se midió en diversos puntos temporales después del tratamiento con ondas de choque según el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Figura 6 y muestran que, en contraste con SDF1, la expresión génica de VEGFA y MCP1 aumentó rápidamente en el punto de tiempo de 3 horas y regresó a los niveles de referencia en el punto de tiempo de 24 horas. Estos datos demuestran que la expresión de SDF1 en fibroblastos está por detrás de la expresión de SDF1 de las células endoteliales en 24 horas, creando un gradiente temporal y espacial del tejido intravascular al cardíaco.

Ejemplo 5: Efecto del tratamiento con ondas de choque sobre la fosforilación de AKT en cardiomiocitos de rata

Los cardiomiocitos de rata se cultivaron en condiciones estándar y se sometieron a tratamiento con: ondas de choque (1000 pulsos a 1 Bar); SDF exógeno; o un inhibidor de la cinasa PI3 (LY294002). LA fosforilación de AKT se midió en varios puntos de tiempo utilizando Western Blot normalizado utilizando pan-AKT y COX IV como control de carga.

Los resultados se muestran en la Figura 7 y muestran que la fosforilación de AKT aumenta en las células tratadas con ondas de choque. Sin embargo, el efecto no fue bloqueado por el inhibidor de la cinasa PI3 (LY294002), lo que indica que la fosforilación de AKT por la onda de choque es independiente de la fosfatidilinositol 3-cinasa, un activador de la vía de AKT.

Ejemplo 6: Efecto del tratamiento con ondas de choque sobre la expresión del gen SDF-1 en cardiomiocitos de rata

Los cardiomiocitos de rata se cultivaron según el procedimiento del Ejemplo 1 y se sometieron a tratamiento con ondas de choque (1000 pulsos a 1 Bar o 2 Bar). La expresión génica de SDF1 y VEGFA se midió 4 horas después del tratamiento como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Figura 8 y demuestran que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los controles no tratados y las condiciones de onda de choque para la expresión génica de SDF1 y VEGFA. Esto indica que el efecto antiapoptótico de las ondas de choque en los cardiomiocitos es independiente de los factores antiapoptóticos como SDF1 y VEGFA.

Ejemplo 7: Efectos de los tratamientos con ondas de choque e inhibidores de DPP-4 (DPP4i) en corazones de ratas

Ratas Lewis macho (250-275 g) se sometieron a los siguientes tratamientos durante cuatro días: (1) sin tratamiento; (2) tratamiento con ondas de choque cardíacas extracorpóreas el día 2 de 4 y sondas orales diarias con agua; (3) tratamiento con ondas de choque cardíacas extracorpóreas el día 2 de 4 y sondas orales diarias con DPP4i; y (4) sondas orales diarias con DPP4i.

Los tratamientos con ondas de choque ($0,25\text{mJ/mm}^2 \times 1000$ pulsos a 4 Hz utilizando un dispositivo Storz Medical DUOLITH® SD1) se administraron bajo anestesia general (isoflurano al 1,5-2 % en O_2 al 100 %). Las ondas de choque se administraron de forma continua y dirigida al corazón, que se localizó mediante palpación de los dedos y ecocardiografía junto con gel de ultrasonido.

El inhibidor de DPP4 (linagliptina, 3 mg por rata administrada como una solución de 1 mg/ml) o agua se administró directamente en el estómago a través de una aguja de sonda.

Los animales se sacrificaron y los corazones se explantaron 4 días después del inicio del experimento. La sangre se lavó de los corazones con solución salina tamponada con fosfato, se fijó en paraformaldehído al 4 % durante la noche, se crioprotegió en sacarosa al 30 % durante la noche y a continuación se incrustó en OCT para crio-sección usando un criostato.

La inmunohistoquímica se realizó en secciones bloqueadas con BSA al 1 % en solución salina tamponada con Tris + Tween usando anticuerpos primarios SDF1 anti-rata de conejo y anticuerpos secundarios conjugados con HRP anti-conejo de cabra (conjugados con peroxidasa de rábano picante). Las secciones de tejido se contratiñeron usando hematoxilina y se usó sustrato de 3,3'-diaminobencidina (DAB) para la detección cromogénica de HRP. DAB da como resultado un producto insoluble de color marrón en presencia de HRP. Las secciones se deshidrataron utilizando series de etanol, se montaron utilizando DPX- nuevo y reemplazo de xileno como disolvente. Se usó microscopía de luz de campo brillante para visualizar las secciones.

Los resultados se presentan en la Figura 9, donde los tratamientos 1-4 se presentan en las Figuras 9A-D, respectivamente. Para facilitar la referencia, los depósitos del producto de reacción insoluble de color marrón, que son evidencia de la presencia de SDF-1, están rodeados con un círculo. Se observó que el SDF-1 fue inducido por terapia de onda de choque extracorpórea (ver Figuras 9B y 9C); no se observaron depósitos marrones en el tejido cardíaco de ratas no tratadas (Figura 9A) o ratas tratadas solo con DPP4i (Figura 9D). Además, las ratas tratadas con DPP4i mostraron un aumento significativo de SDF-1 en relación con las ratas tratadas solo con ondas de choque o DPP4i. Estos resultados indican que la combinación de tratamiento con ondas de choque y DPP4i da como resultado un efecto más que aditivo sobre la presencia de SDF-1 en el tejido cardíaco.

La Figura 10 muestra el aspecto de los corazones de rata después de la incubación durante la noche con paraformaldehído al 4 %: A) control normal no tratado, B) solo onda de choque; C) onda de choque y DPP4i, y D) solo DPP4i. Se observó que los corazones de ratas tratadas con onda de choque y DPP4i tienen vasos sanguíneos muy prominentes en comparación con los corazones de ratas tratadas solo con ondas de choque. Los corazones de las ratas no tratadas y las ratas tratadas solo con DPP4i son muy similares. Se concluyó que DPP4i mejora el procedimiento angiogénico inducido por la onda de choque y DPP4i por sí solo tiene un efecto neutro.

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), o una composición farmacéutica que contiene dicho inhibidor, para su uso en:

- (a) tratamiento o prevención de la insuficiencia cardíaca; o
- (b) tratamiento de la lesión por reperfusión isquémica cardíaca,

en un sujeto, donde a dicho sujeto se le ha administrado terapia extracorpórea de ondas de choque cardíacas y donde dicho inhibidor es para su administración antes, simultáneamente y/o después de la administración de dicha terapia de ondas de choque.

2. El inhibidor o composición de DPP-4 para su uso según la reivindicación 1, donde dicho inhibidor o composición se proporciona como una preparación combinada con un agente farmacológico adecuado para movilizar células madre para su uso o administración por separado, simultánea o secuencial.

3. El inhibidor o composición de DPP-4 para su uso según la reivindicación 2, donde dicho agente farmacológico adecuado para movilizar células madre es hormona paratiroidea o un fragmento de esta, opcionalmente donde dicho fragmento de hormona paratiroidea comprende teriparatida.

4. El inhibidor o composición de DPP-4 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho inhibidor o composición es para su administración antes de dicha administración de terapia de ondas de choque y continúa durante todo el curso de la terapia de ondas de choque.

5. El inhibidor o composición de DPP-4 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde el agente farmacológico adecuado para movilizar células madre es para su administración al menos 8 horas antes de la terapia con ondas de choque.

6. El inhibidor o composición de DPP-4 para su uso según la reivindicación 1, donde dicho inhibidor se proporciona como una preparación combinada con células madre para su uso o administración separada, simultánea o secuencial, opcionalmente donde dichas células madre se derivan de o comprenden células mononucleares derivadas de médula ósea.

7. El inhibidor o composición de DPP-4 para su uso según la reivindicación 5 o 6, donde las células madre son para la administración al menos 8 horas antes del tratamiento con ondas de choque.

8. El inhibidor o composición de DPP-4 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el inhibidor de DPP-4 es sitagliptina, linagliptina, vildagliptina, gemigliptina, anagliptina, teneligliptina, trelagliptina, dutogliptina, omarigliptina, lupeol o una combinación de estos.

9. El inhibidor o composición de DPP-4 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha insuficiencia cardíaca es insuficiencia cardíaca crónica o insuficiencia cardíaca posterior a un infarto.

10. El inhibidor o composición de DPP-4 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha terapia de ondas de choque comprende la administración de pulsos de ondas de choque con una energía de aproximadamente 0,05-0,25 mJ/mm² y/o dicha terapia de ondas de choque comprende la administración de al menos aproximadamente 500 pulsos de ondas de choque, opcionalmente donde dicha terapia de ondas de choque comprende la administración de una dosis de aproximadamente 500-2000 pulsos de ondas de choque.

11. El inhibidor o composición de DPP-4 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicha terapia de ondas de choque comprende la administración de pulsos de ondas de choque durante los períodos de contracción isovolúmica y/o relajación isovolúmica del ciclo cardíaco y/o donde el punto focal de los pulsos de ondas de choque se dirige a una región específica del corazón, opcionalmente donde la región del corazón a la que se dirige se determina mediante visualización por ecocardiografía (Eco) y/o reconocimiento de patrones de electrocardiogramas (ECG) o imágenes de resonancia magnética.

12. El inhibidor de DPP-4 o la composición para su uso según la reivindicación 11, donde la región específica del corazón a la que se va a dirigir comprende tejido cicatricial.

13. El inhibidor o composición de DPP-4 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la dosis de pulsos de onda de choque es para su administración durante más de una sesión.

14. Un kit o producto que contiene:

- (i) un inhibidor o una composición de DPP-4 comprendiendo dicho inhibidor; y

- (ii) un agente farmacológico para movilizar células madre, tal como hormona paratiroidea o fragmento de la misma, o una composición farmacéutica comprendiendo dicho agente farmacológico y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; y opcionalmente
- 5 (iii) un agente adicional, por ejemplo, un agente para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca o glucosa, o una composición farmacéutica comprendiendo dicho agente adicional y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable,
- 10 donde (i), (ii) y opcionalmente (iii) se proporcionan como una preparación combinada para uso simultáneo, secuencial o separado en:
- (a) tratamiento o prevención de la insuficiencia cardíaca; o
- (b) tratamiento de la lesión por reperfusión isquémica cardíaca,
- 15 en un sujeto, donde a dicho sujeto se le ha administrado terapia de ondas de choque cardíacas extracorpóreas y donde dicho inhibidor y/o agente farmacológico para movilizar células madre es para la administración antes, simultáneamente y/o después de la administración de dicha terapia de ondas de choque.
15. El kit o producto de la reivindicación 14, donde dicho inhibidor de DPP-4, agente farmacológico para movilizar
- 20 células madre y/o terapia de ondas de choque es como se define en cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente.

Figura-11

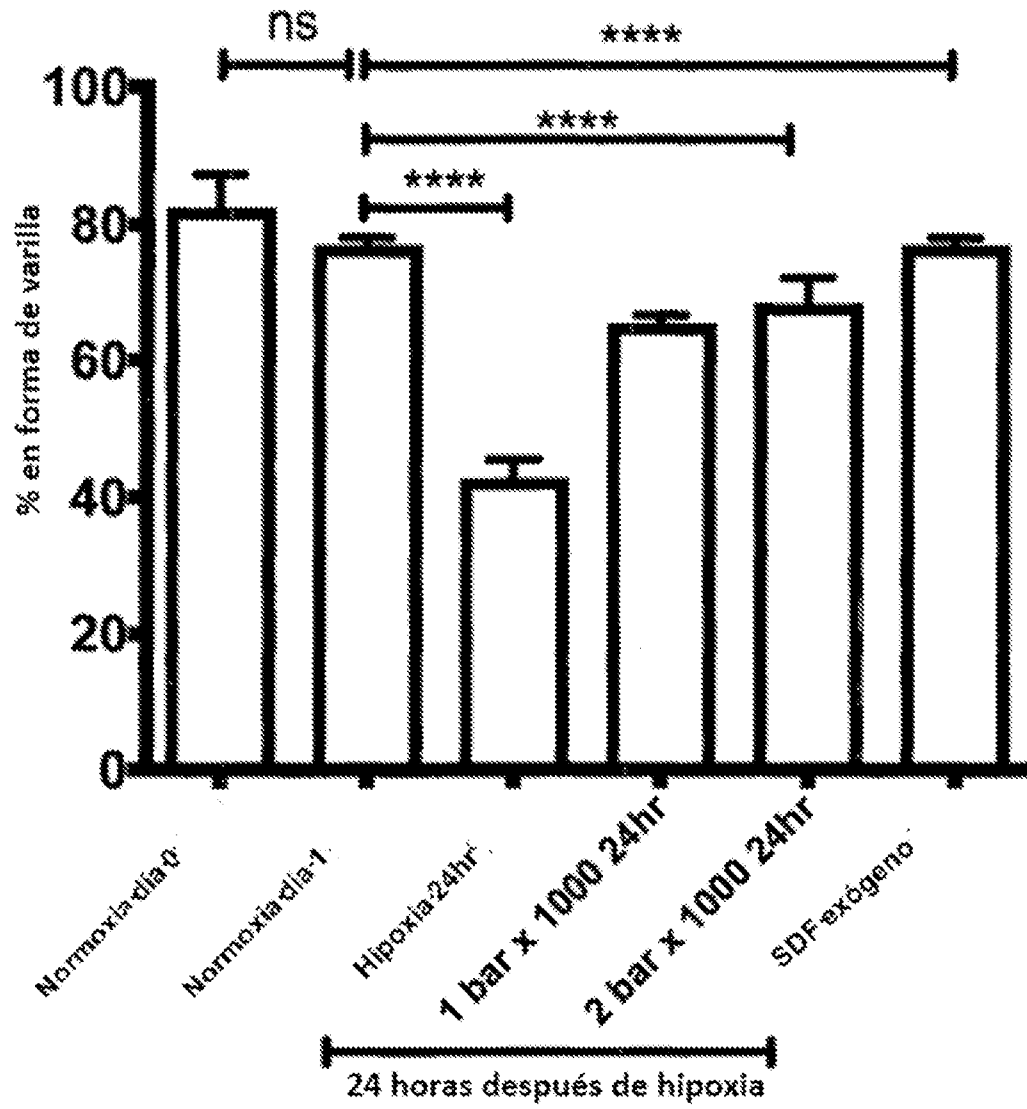


Figura 2

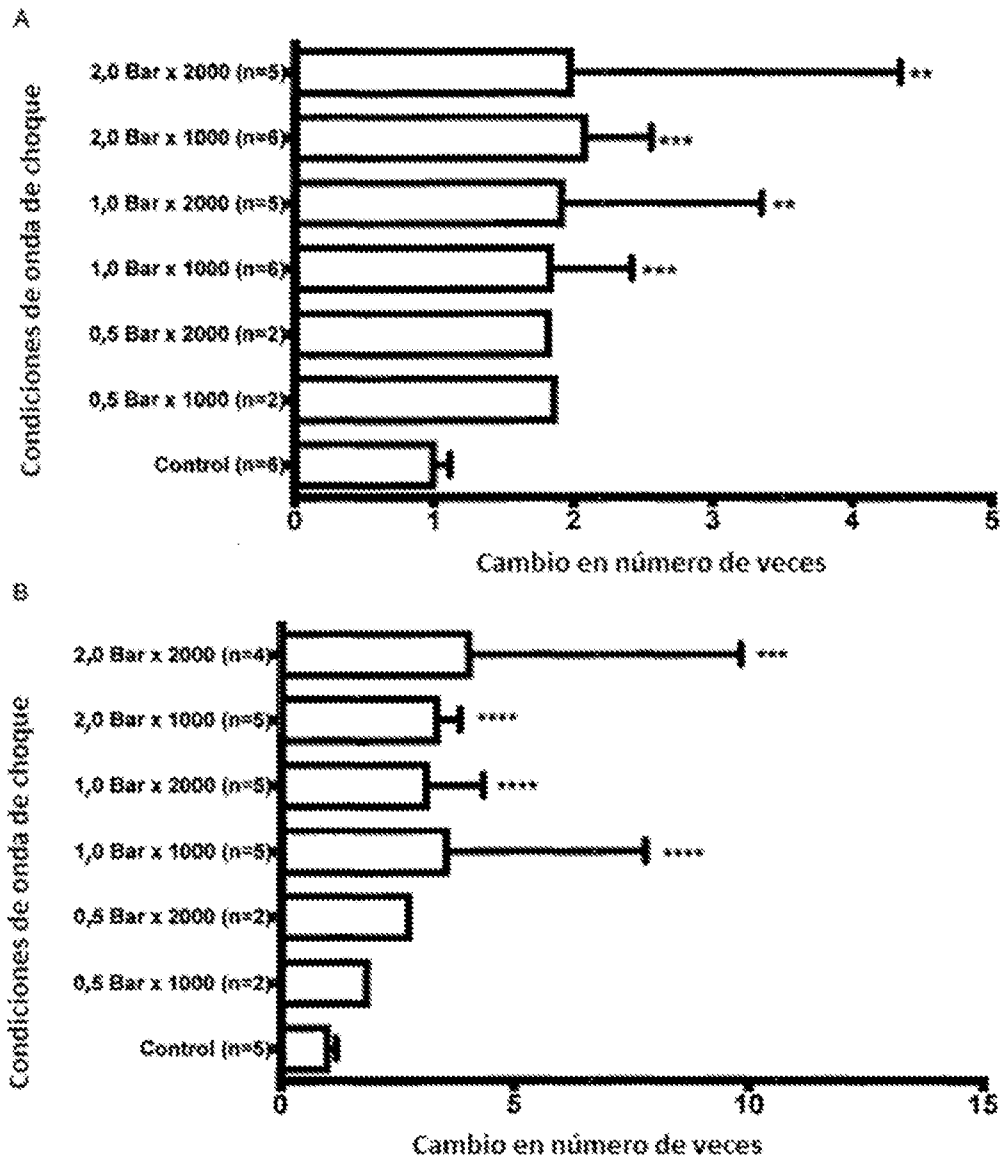


Figura 3

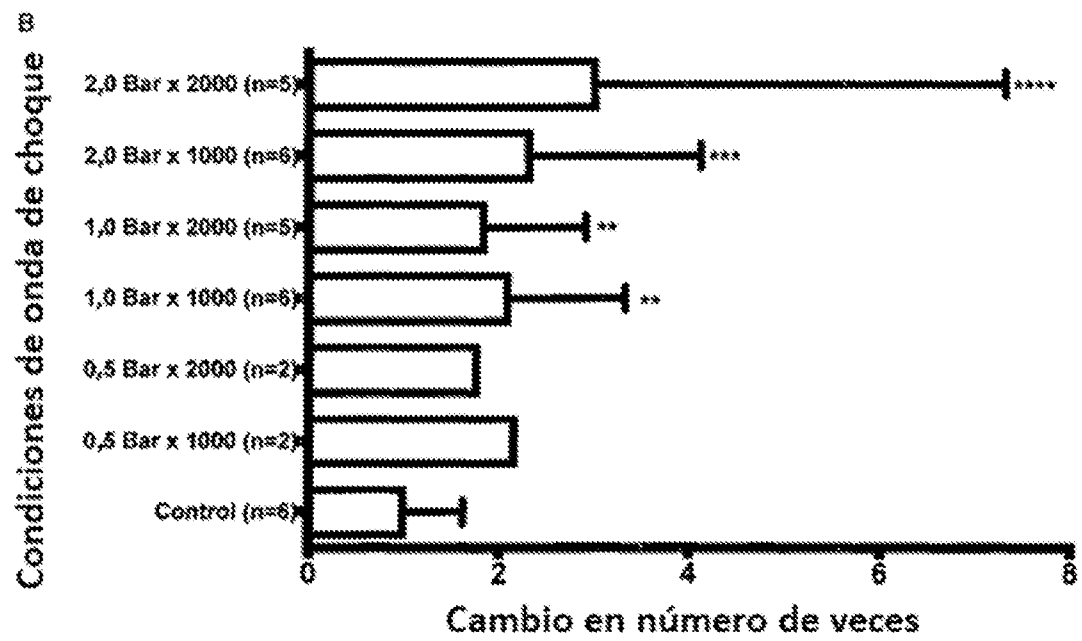
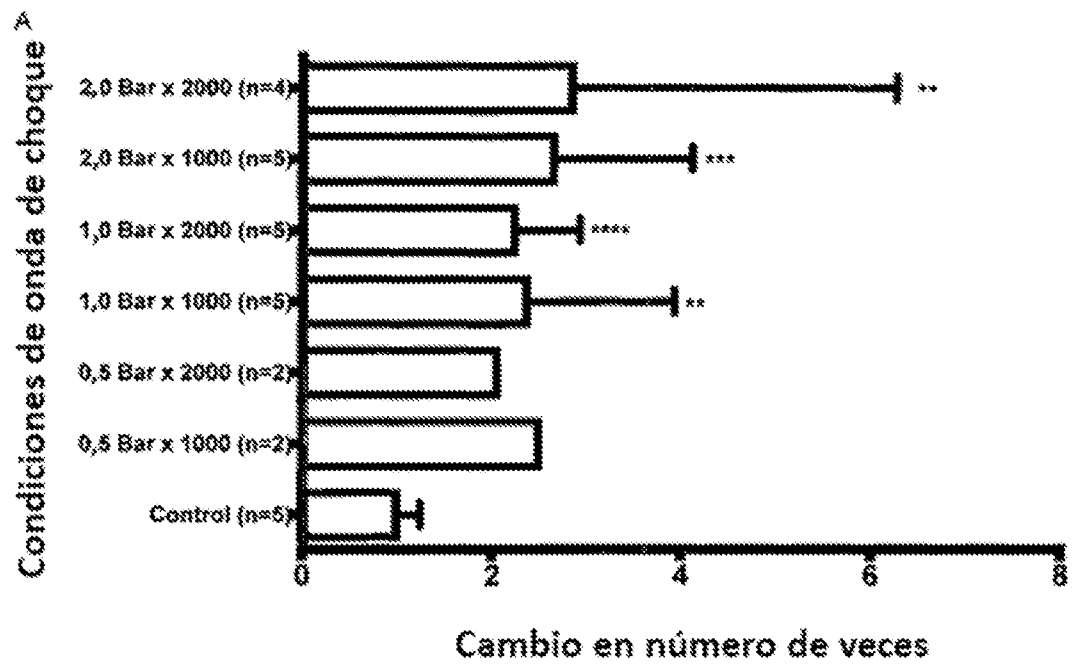


Figura 4

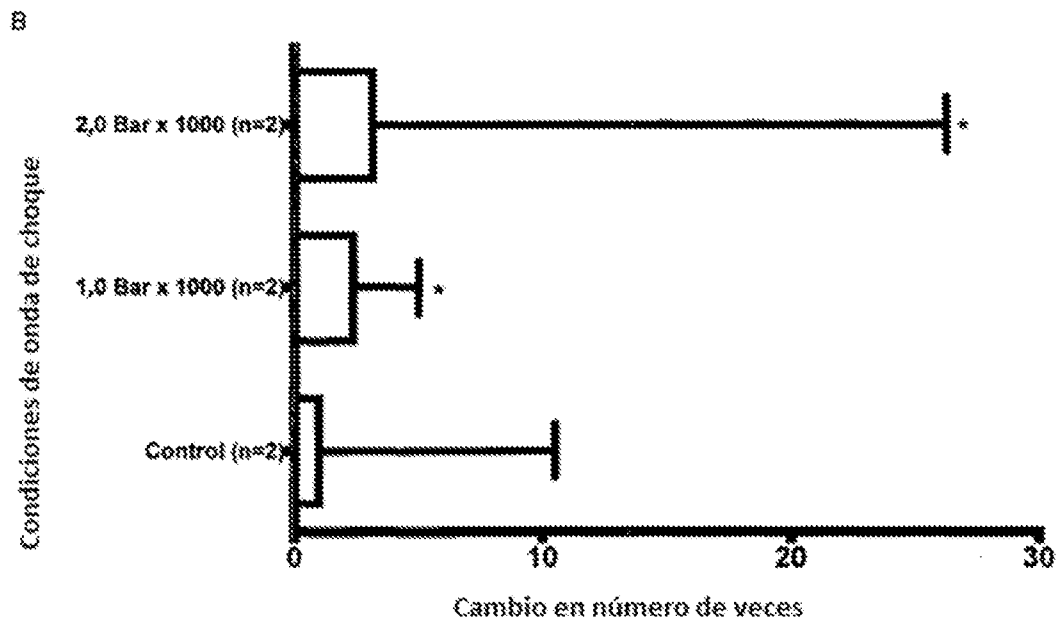
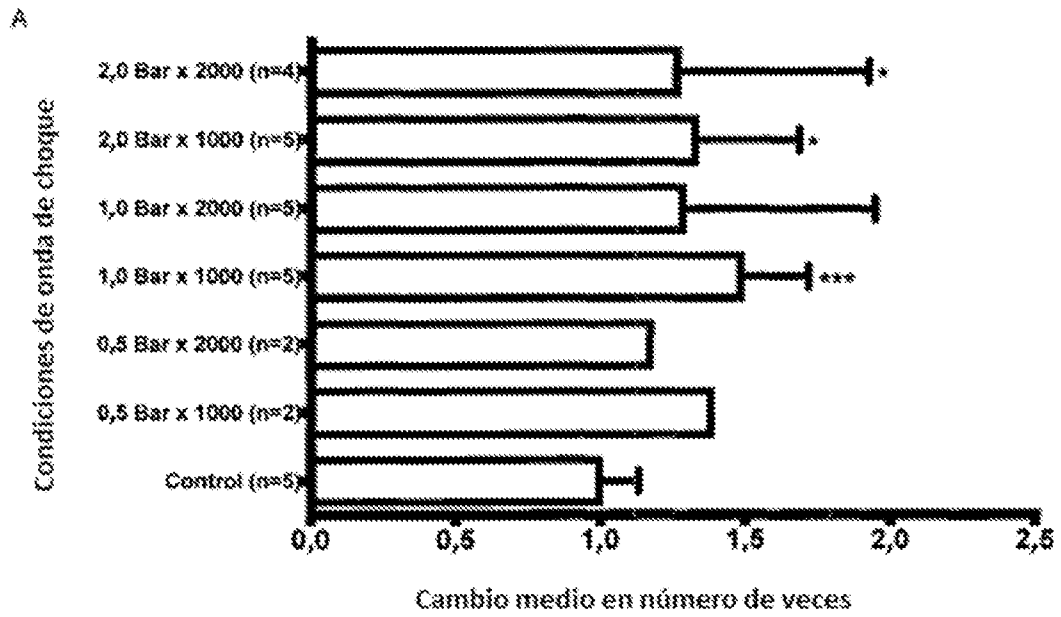


Figura 5

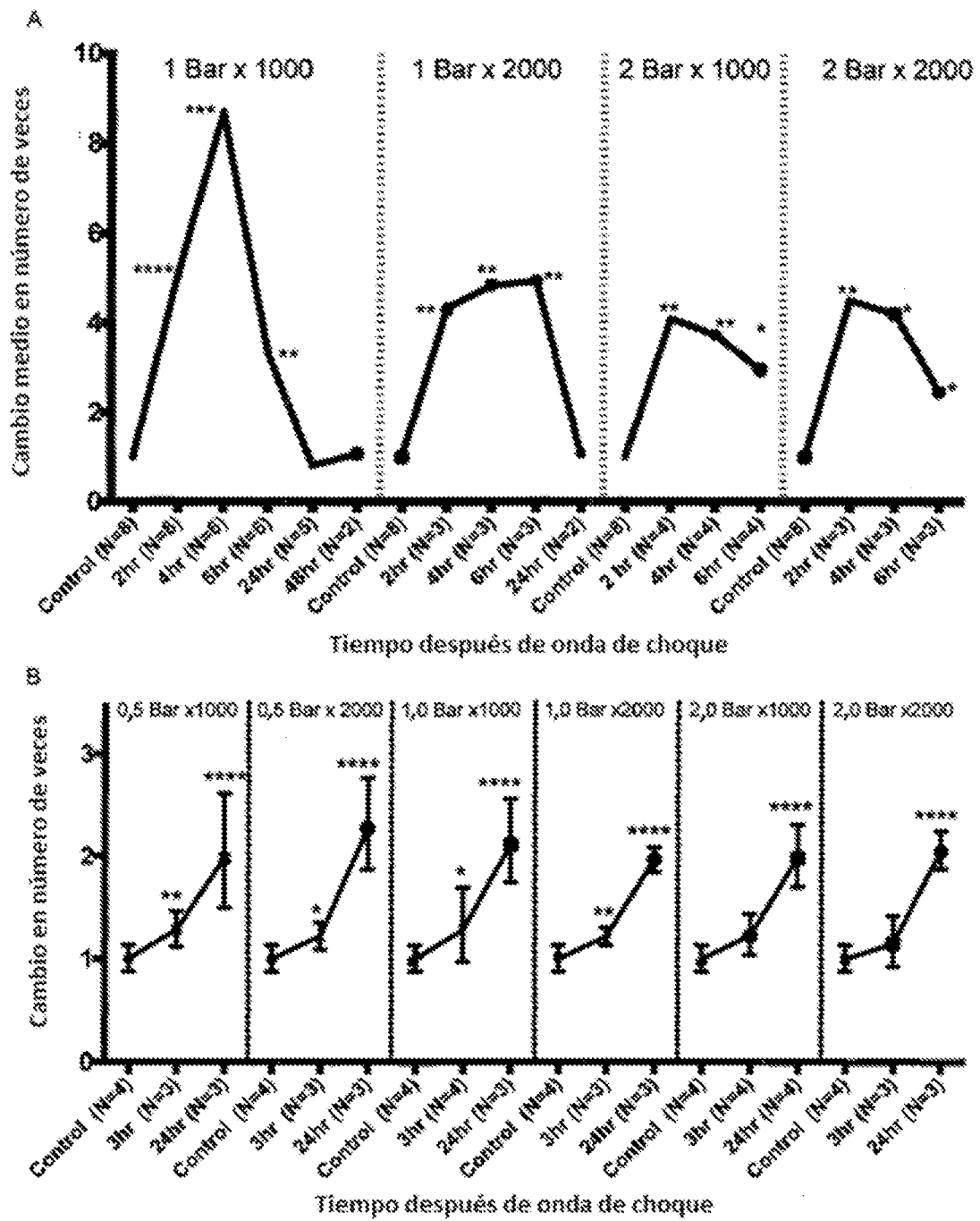


Figura 6

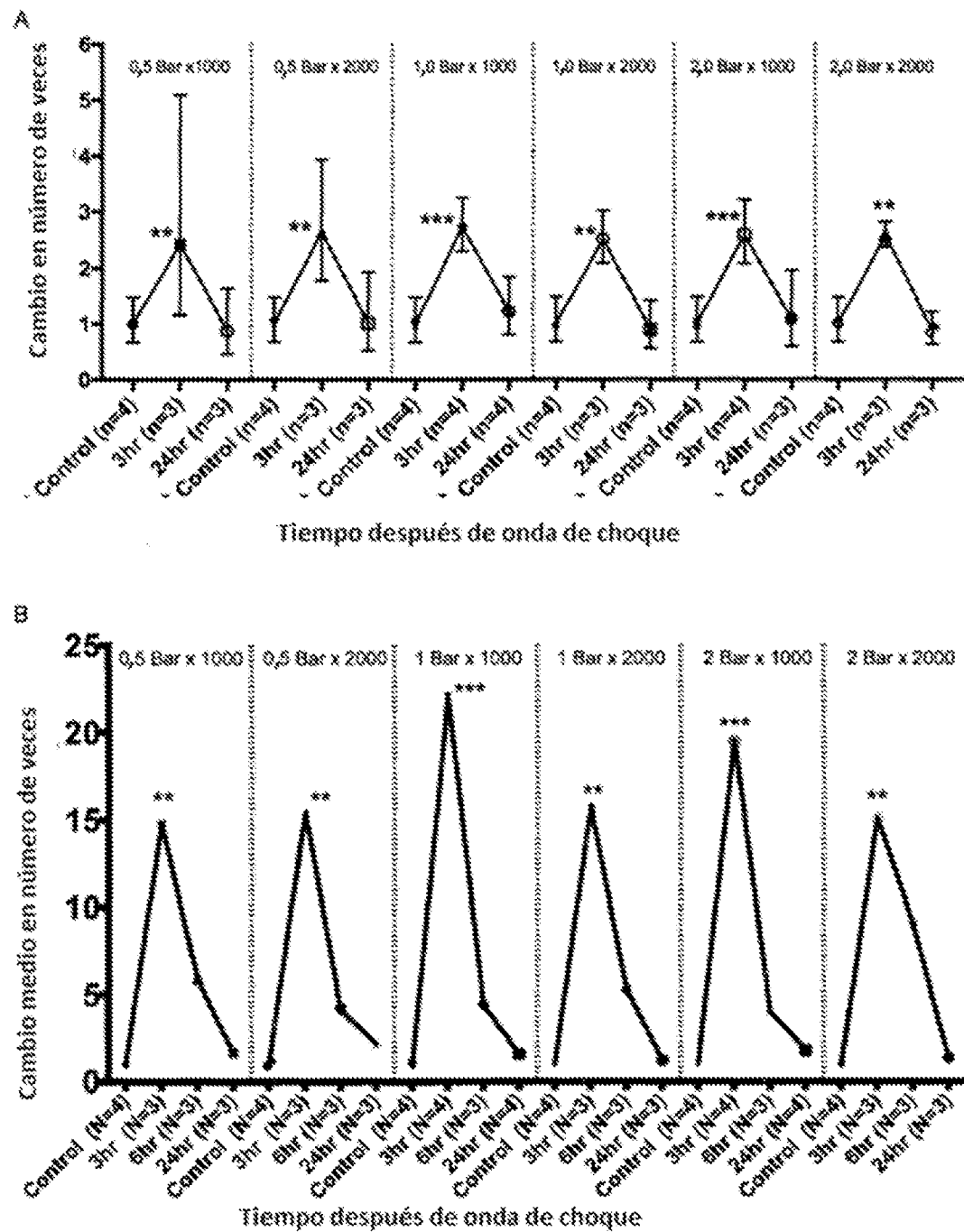
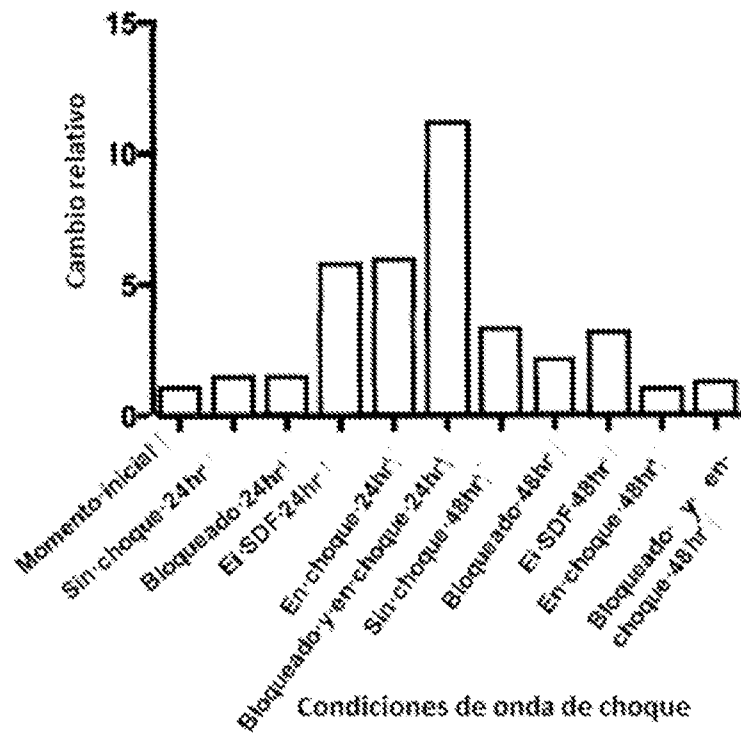


Figura 7

A



B

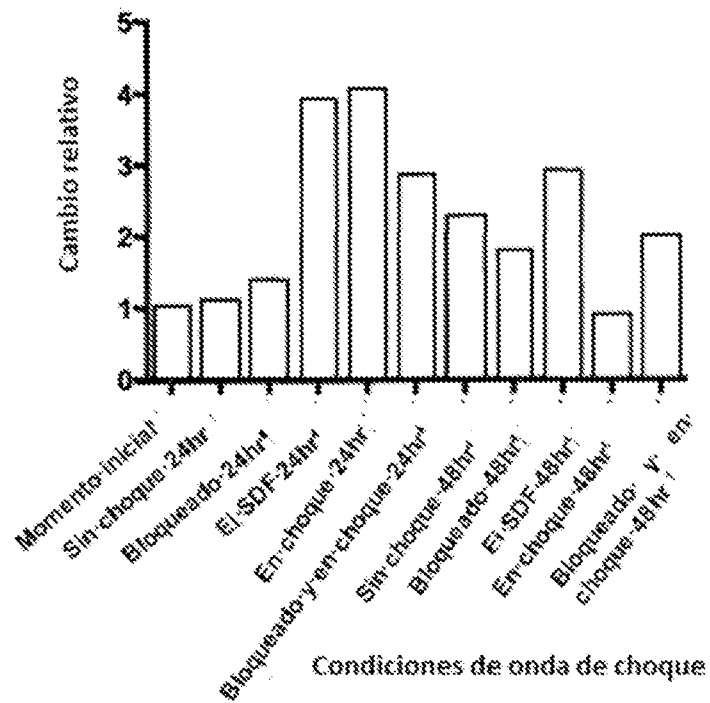
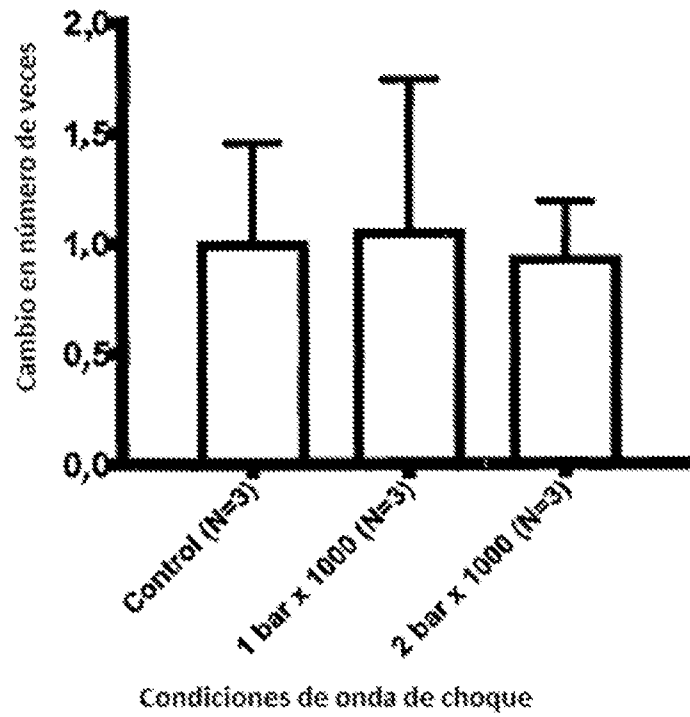


Figura 8

A



B

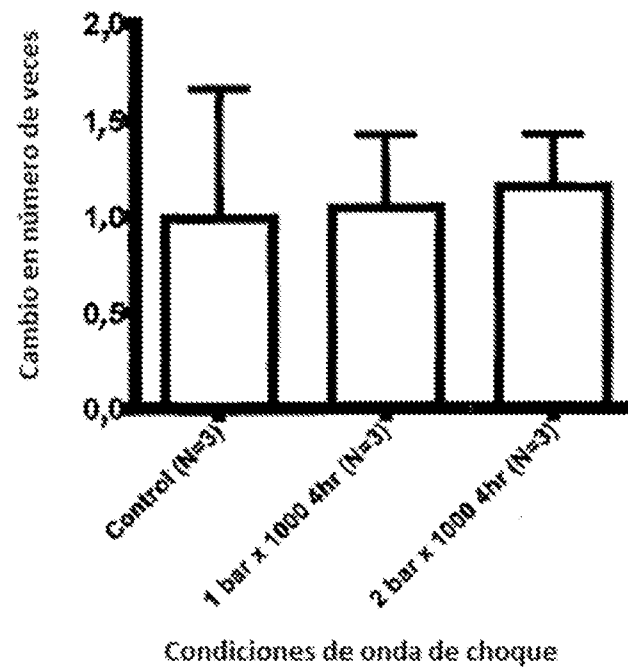


Figura 9

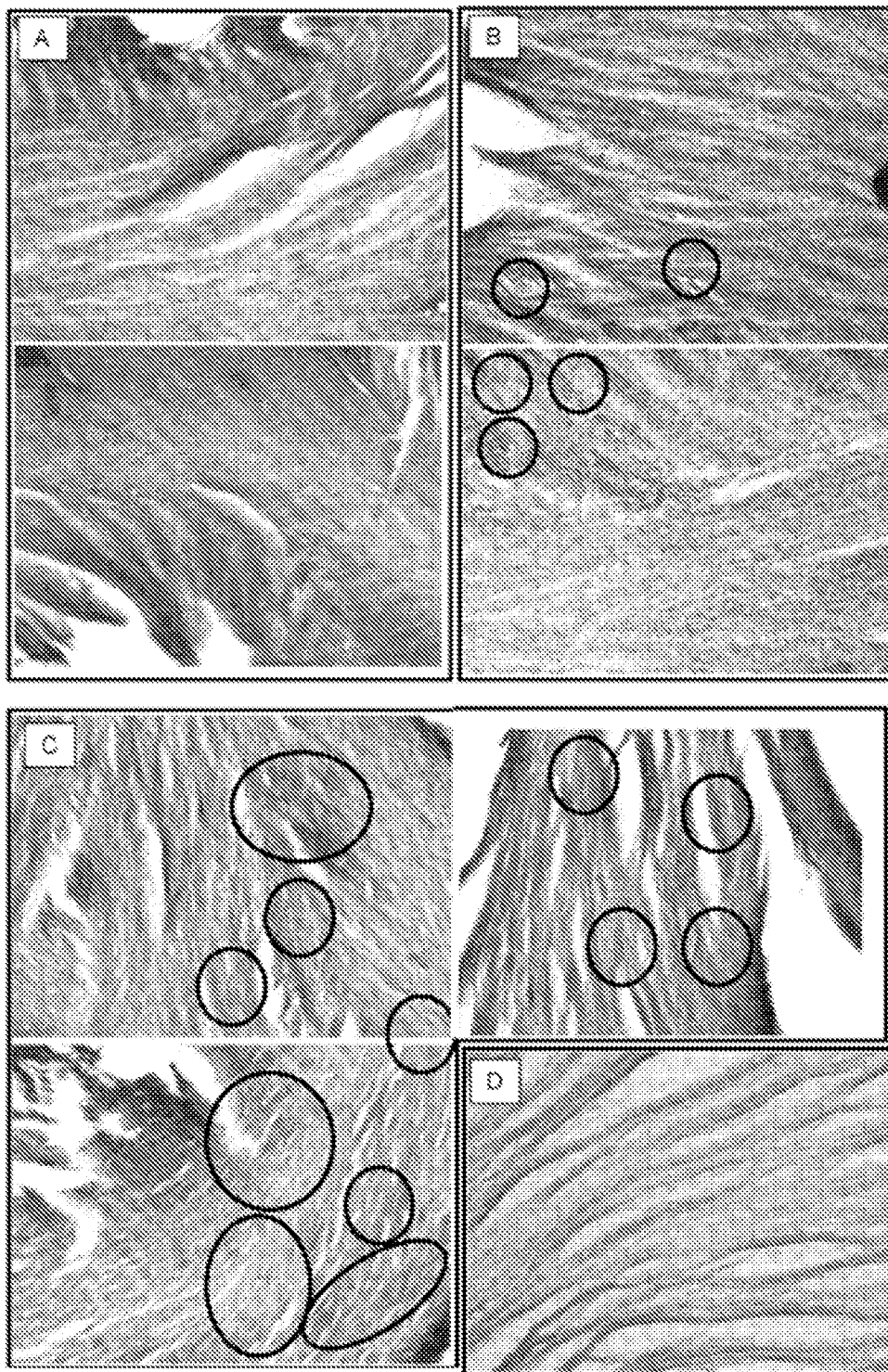


Figura 10

