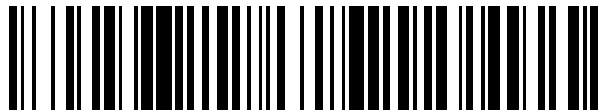


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 086**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2010 E 17168874 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3235504**

54 Título: **Uso de una neuregulina para tratar la lesión del nervio periférico**

30 Prioridad:

14.10.2009 US 251583 P

16.10.2009 US 252161 P

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

27.05.2020

73 Titular/es:

ACORDA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
420 Saw Mill River Road
Ardsey, NY 10502, US

72 Inventor/es:

CAGGIANO, ANTHONY O.;
BELLA, ANTHONY J. y
IACI, JENNIFER F.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 763 086 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

Uso de una neuregulina para tratar la lesión del nervio periférico

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a traumatismos o lesiones nerviosas. Más particularmente, para uso de una neuregulina o segmentos funcionales de la misma para prevenir, tratar o mejorar la lesión del nervio periférico, en particular una lesión del nervio cavernoso.

Antecedentes de la invención

10 Los nervios periféricos se lesionan comúnmente por traumatismos, incluidos accidentes automovilísticos, accidentes de motocicletas, cirugías, heridas de cuchillo y proyectil y lesiones de nacimiento tanto para el niño como para la madre. Las causas quirúrgicas comunes de lesión nerviosa incluyen prostatectomía y mastectomía. Otras lesiones comunes durante la cirugía son el resultado del posicionamiento de las extremidades a largo plazo o la compresión nerviosa inevitable o accidental. Después de una lesión nerviosa, hay una pérdida de sensación y/o función en las regiones del cuerpo invadidas por el nervio dañado. Por ejemplo, después de una lesión nerviosa por prostatectomía, comúnmente hay disfunción eréctil. Después de la mastectomía, a menudo se pierde la función adecuada de la
15 extremidad superior y/o la escápula. Adicionalmente, después de una lesión de nacimiento u otro trauma con daño al plexo braquial, hay disfunción en la extremidad ipsilateral.

Cualquier terapia que pueda prevenir o limitar el alcance de la disfunción después de una lesión nerviosa tendría un impacto significativo en las estrategias terapéuticas actuales para el tratamiento de las lesiones nerviosas periféricas. Existe la necesidad de terapias y tratamientos adicionales para las lesiones nerviosas periféricas.

20 Resumen de la invención

25 Las neuregulinas se han implicado como efectos neuroprotectores y neurorestauradores en una variedad de modelos animales de enfermedades y lesiones del sistema nervioso central. Sin embargo, antes de la presente invención, las neuregulinas nunca se habían establecido como capaces de prevenir y/o tratar la lesión del nervio periférico. Por consiguiente, en el presente documento se divulgan métodos para tratar o mejorar la lesión del nervio periférico mediante la administración de neuregulina (por ejemplo, GGF2) o un segmento funcional de la misma a un sujeto que tiene una lesión del nervio periférico o está en riesgo de lesión del nervio periférico. De acuerdo con una primera realización, se proporciona una neuregulina para uso en la prevención de una lesión del nervio cavernoso en un sujeto. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de una neuregulina en la fabricación de un medicamento para prevenir la lesión del nervio cavernoso en un sujeto.

30 Se divulga que el tratamiento con neuregulina de la lesión del nervio periférico puede atenuar la pérdida de la función del nervio periférico, mejorar o atenuar la pérdida de la función del nervio periférico cuando se administra bien sea antes o después de la lesión del nervio y, en algunos casos, restaurar la función del nervio periférico. En ciertas divulgaciones, se evita la lesión del nervio periférico. En ciertas divulgaciones, se elimina una lesión nerviosa periférica existente. En ciertas divulgaciones, la lesión del nervio periférico no se evita totalmente. En ciertas divulgaciones, una
35 lesión nerviosa periférica existente no se elimina por completo.

40 El modelo de disfunción eréctil de rata se usa como un sistema in vivo para demostrar la efectividad de las neuregulinas en el tratamiento de la lesión nerviosa periférica. En ciertos aspectos, la divulgación está dirigida al tratamiento de la disfunción eréctil resultante de una lesión nerviosa periférica, pero la presente invención no se limita solo a la disfunción eréctil. La neuregulina puede ser efectiva como monoterapia para cualquier lesión nerviosa periférica y no requiere un tratamiento conjunto con conductos nerviosos naturales o artificiales o tratamiento conjunto con terapias celulares tales como las células de Schwann.

45 Ciertas divulgaciones están dirigidas a métodos para tratar la lesión del nervio periférico que comprende administrar una cantidad efectiva de neuregulina a un sujeto que tiene una lesión del nervio periférico o un sujeto en riesgo de sufrir una lesión del nervio periférico. Ciertas divulgaciones están dirigidas a métodos para someter a profilaxis o prevenir la lesión del nervio periférico que comprende administrar una cantidad efectiva de neuregulina a un sujeto en riesgo de sufrir una lesión del nervio periférico. El término "sujeto" incluye mamíferos, y particularmente sujetos humanos.

50 En ciertas realizaciones, la lesión del nervio cavernoso es el resultado de un traumatismo que incluye, sin limitación, accidentes automovilísticos, accidentes de motocicleta, cirugías, heridas de cuchillo y proyectil, y lesiones de nacimiento. En ciertas realizaciones, una lesión del nervio cavernoso es el resultado de una cirugía, tal como una prostatectomía. En el contexto de esencialmente cualquier intervención quirúrgica, la lesión del nervio periférico puede ser el resultado directo de la disección de tejido, resección de tejido y/o secundaria a la colocación y/o compresión de la extremidad. En una divulgación particular, la neuregulina se usa para tratar o prevenir la lesión del nervio periférico que resultaría en la disfunción eréctil.

Divulgaciones adicionales están dirigidas al tratamiento de la disfunción eréctil resultante de una lesión quirúrgica en los nervios periféricos relacionados con la función eréctil, tal como el nervio cavernoso y/o el nervio del pene. La lesión del nervio cavernoso ocurre frecuentemente como resultado de la resección del cáncer de próstata; Esta lesión puede causar disfunción eréctil (ED).

5 Las intervenciones farmacéuticas actuales tratan el déficit funcional resultante como consecuencia de una lesión al aumentar el flujo sanguíneo al cuerpo cavernoso para facilitar la erección del pene. Existen intervenciones actuales de dispositivos médicos que tratan el déficit funcional resultante de la lesión al aumentar el volumen del pene que conduce a un estado análogo a una erección normal del pene. Hay inconvenientes en todas las intervenciones existentes utilizadas para tratar la ED.

10 La presente invención protege de manera aguda los nervios en el momento de la lesión y/o mejora la recuperación del paciente al disminuir la gravedad de cualquier déficit funcional.

15 Se probó un péptido de neuregulina 1 (GGF2) en un modelo de aplastamiento bilateral en rata, que es un modelo aceptado de lesión del nervio cavernoso; Este modelo se ha utilizado para probar el sildenafil y otros fármacos para la disfunción eréctil. Como se establece en el presente documento, GGF2 mejoró los resultados funcionales cuando los nervios se electroestimularon 5 semanas después de la lesión y se midió la presión intercavernosa (ICP).

20 Ciertas divulgaciones están dirigidas al tratamiento con neuregulina de la lesión nerviosa después de la mastectomía. La lesión de los nervios Torácico largo, Intercostobraquial y Toracodorsal es común durante la mastectomía, aunque otros nervios también pueden dañarse y la neuregulina puede usarse para prevenir o tratar tal lesión. La neuregulina puede administrarse antes y/o después de la mastectomía para proteger y restaurar la función nerviosa. Existen muchas medidas comúnmente utilizadas de la función de las extremidades superiores, que incluyen la fuerza, la sensación, el rango de movimiento y los reflejos - todos los cuales son apropiados para determinar la protección o restauración de la función nerviosa. La presente divulgación se aplica igualmente a cualquier nervio lesionado en cualquier procedimiento médico o quirúrgico.

25 Otras divulgaciones incluyen el tratamiento con neuregulina de la lesión nerviosa después de un traumatismo en el plexo braquial. La lesión del plexo braquial es un resultado común de traumatismo por fuerza contundente, traumatismo al nacer, accidente vehicular y lesiones deportivas que dan como resultado deficiencias motoras y sensoriales del miembro afectado. La neuregulina se puede administrar a una persona con un plexo braquial para reducir el daño y restaurar la función de las extremidades. En situaciones previstas, tales como el parto, se puede dar una composición de la invención de forma profiláctica. La función de las extremidades se puede medir mediante cualquier cantidad de medidas neurológicas aceptadas de la función motora, la fuerza, la sensación, el rango de movimiento y/o los reflejos.

30 Ciertos aspectos incluyen la administración de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1-10, 1-20, 10-20, 1-30, 1-40, 1-50, 10-20, 10-30, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 15-25, 15-40, 15-35, 15-50, 20-50, 20-40, 20- 40, 25-35, 30-50, 30-60, 50-75, 50-100, 100, 1-100, 100-150, 150-200, 200, 1-200 µg o mg de polipéptido o péptido de neuregulina sobre la actividad de la neuregulina particular utilizada y el contexto médico apreciado por un experto en la técnica. Ciertos aspectos incluyen en donde la neuregulina se administra antes y/o después de la cirugía.

35 En ciertos aspectos, una neuregulina puede ser cualquier neuregulina de longitud completa codificada por los genes NRG1, 2, 3 o 4. En un aspecto adicional, una neuregulina puede ser cualquier segmento funcional de un polipéptido de neuregulina. En ciertas realizaciones, el segmento funcional de una neuregulina contiene un dominio similar a EGF. En ciertas realizaciones, una neuregulina puede ser cualquier péptido de los genes NRG1, 2, 3 o 4 que se une y activa los receptores erbB. En ciertas realizaciones, una neuregulina puede ser cualquier péptido modificado a partir de un péptido de tipo silvestre codificado por los genes NRG1, 2, 3 o 4, de tal manera que el péptido modificado se una y active los receptores erbB.

45 Las neuregulinas y polipéptidos que contienen dominios de neuregulinas similares a EGF se pueden administrar a sujetos con un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en forma de dosificación unitaria. La práctica farmacéutica convencional puede emplearse para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar tales composiciones a pacientes o animales experimentales. Aunque se prefiere la administración intravenosa, se puede emplear cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, oral o transdérmica o tópica (por ejemplo, aplicando un dispositivo o un parche adhesivo que lleva una formulación capaz de cruzar la dermis y entrar en el torrente sanguíneo). Las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para la administración oral, las formulaciones pueden estar en forma de tabletas o cápsulas; y para formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles.

55 Por "neuregulina-1", "NRG-1", "heregulina" se entiende un polipéptido que se une a los receptores ErbB 1, 3 o 4, y por emparejamiento de receptores (dimerización) también a ErbB2. En una realización, la neuregulina está codificada por el gen del ligando p185erbB2 descrito en las patentes U.S. 5,530,109 ; 5,716,930 ; y 7,037,888. En una realización, la

neuregulina es GGF2 o cualquier subsecuencia de la misma, o cualquier molécula que comprenda toda o una parte activa de la secuencia de GGF2.

5 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad efectiva" significa la cantidad de neuregulina que provoca una respuesta biológica o médica de un tejido, un sistema, un animal o un humano que está siendo buscada por un investigador, veterinario o médico u otro clínico.

10 Un cambio terapéutico es un cambio en una característica bioquímica o fisiológica medida en una dirección que alivia la enfermedad o condición que se está abordando, por ejemplo, lesión del nervio periférico. Más particularmente, una "cantidad efectiva" es una cantidad suficiente para disminuir los síntomas asociados con una condición o enfermedad médica, para normalizar las funciones corporales en enfermedades o trastornos que resultan en el deterioro de funciones corporales específicas, o para proporcionar una mejora en uno o más de los parámetros medidos clínicamente de una enfermedad o condición.

15 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente para referirse solo a alternativas o cuando las alternativas son mutuamente excluyentes. También se contempla que cualquier cosa enumerada usando el término "o" también puede excluirse específicamente de las otras opciones establecidas.

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor que está dentro del 85%, 90%, 95% o la desviación estándar de error para el dispositivo o método que es empleado para determinar el valor.

Siguiendo la ley de patentes de larga data, las palabras "un" y "uno, una", en las reivindicaciones o especificaciones, denotan una o más, a menos que se indique específicamente.

20 En ciertas divulgaciones, la neuregulina se usa de manera profiláctica para prevenir o disminuir una posible lesión. En ciertas divulgaciones, la neuregulina se usa de forma pronóstica para indicar el estado futuro del sujeto. En ciertas divulgaciones, la neuregulina se utiliza de forma diagnóstica para indicar la presencia o probable presencia de una condición o estado. En ciertas divulgaciones, la neuregulina se usa terapéuticamente con el fin de afectar una condición de alguna manera que disminuya o elimina un síntoma o signo de la condición o enfermedad que se está tratando.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se dan solo a modo de ilustración.

Breve descripción de los dibujos

30 Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar ciertos aspectos de la presente divulgación. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en este documento.

Figura 1: Datos para el cambio de ICP medio

Figura 2: Datos normalizados a presiones aórticas.

35 Figura 3: Etiquetado representativo con Fluoro-oro de los ganglios pélvicos mayores (MPG) de 3 animales por grupo de tratamiento ((panel A) normal, (panel B) aplastamiento, (panel C) aplastamiento + GGF2). El fluoro-oro inyectado en el tejido del pene se transporta retrógradamente de regreso a través de los nervios intactos a los cuerpos celulares en los MPG. Panel A: los animales normales demuestran la cantidad de marcaje retrógrado observado en ausencia de lesión nerviosa. Panel B: Los animales aplastados demuestran la reducción dramática de las fibras nerviosas intactas de la lesión, ya que la etiqueta de fluoruro-oro no puede transportarse de regreso a los MPG. Panel C: los animales Aplastados + GGF2 muestran un mayor número de células MPG marcadas con flúor-oro, lo que indica que hay más fibras nerviosas preservadas presentes después de la lesión como resultado del tratamiento con GGF2.

40 Figura 4: Cuantificación del etiquetado con fluoro-oro en los MPG. Los resultados mostraron que los animales normales tienen un gran número de cuerpos celulares etiquetados en los MPG. Después de una lesión por aplastamiento, el número de células marcadas se reduce drásticamente, como consecuencia del daño de la fibra nerviosa y la incapacidad resultante de transportar de manera retrógrada la etiqueta de regreso a los MPG. Sin embargo, el tratamiento con GGF2 mejoró el número de fibras nerviosas intactas disponibles para transportar el fluoro-oro desde el tejido del pene a los MPG de manera retrógrada, lo que resultó en un mayor número de células marcadas.

50 Figura 5: tinción representativa de los niveles de nNos. El nNOS cavernoso es un marcador bien establecido de preservación del nervio cavernoso. Los resultados de este trabajo incluyeron tinción de tejido normal (panel A). En comparación, hubo una pérdida significativa de tinción de nNOS después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (panel B). La tinción preservada de nNOS de las terminaciones nerviosas cavernosas en los cuerpos del pene demostró mayores tasas de supervivencia de los nervios cavernosos después de una lesión por aplastamiento

con el tratamiento con GGF2 (panel C). La densidad de la tinción indica la preservación de la tinción de nNOS con el tratamiento con GGF2.

5 Figura 6: Tinción representativa de los niveles de tirosina hidroxilasa (TH). Los resultados en esta figura muestran en el panel A una tinción de tejido normal y en el panel B una pérdida significativa de tinción de TH después de una lesión por aplastamiento del nervio cavernoso. El panel C muestra la tinción conservada de TH de las terminaciones nerviosas cavernosas en los cuerpos del pene; este hallazgo corresponde a una preservación general o restablecimiento de la inervación del pene luego de una lesión por aplastamiento producida por el tratamiento con GGF2. Por lo tanto, la densidad de tinción indicó la preservación de la tinción TH con tratamiento con GGF2.

10 Figura 7: Tinción representativa del transportador de acetilcolina vesicular (VaChT). Los resultados muestran una tinción de tejido normal (panel A) y una pérdida significativa de tinción con VaChT después de una lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (panel B). Por el contrario, la tinción conservada con VaChT de las terminaciones nerviosas cavernosas en los cuerpos del pene que se muestran en el (panel C) demuestra mayores tasas de supervivencia de los nervios cavernosos después de una lesión por aplastamiento con el tratamiento con GGF2 (C). La densidad de la tinción muestra tendencias hacia la preservación de la tinción con VaChT con el tratamiento con GGF2.

Descripción detallada de la invención

15 La lesión de los nervios periféricos es el resultado común de diversos eventos, compresión, contusión, transacción, aplastamiento o estiramiento, causados, por ejemplo, por trauma, accidente o cirugía. Si bien los factores externos que conducen a la lesión nerviosa son variados, las manifestaciones a nivel nervioso tienen características comunes (para una revisión, véase, por ejemplo, Lee y Wolfe, J Am Acad Orthop Surg, 8 (4), p. 243, 2008). La lesión traumática de cualquier etiología a menudo causa daño a la mielinización, epineuro, perineuro, endoneuro y axones. En los casos más leves, la lesión se produce principalmente en la mielina y el epineuro, después de lo cual la recuperación completa se produce espontáneamente en varios días o semanas.

20 Sin embargo, muchas lesiones nerviosas provocan la interrupción del endoneuro y los axones y provocan la interrupción de la función que no se recupera por completo o se recupera durante un período prolongado de tiempo.

Además, con una lesión nerviosa periférica que implica daño a un axón, hay una degeneración local de ese axón que ocurre dentro de las horas posteriores a la lesión. En los próximos días, el cuerpo celular de la neurona proximal y el axón se someten a un proceso conocido como degeneración Walleriana. Después de la degeneración del axón, la célula de Schwann productora de mielina muere dejando escombros e inflamación. Esta muerte celular de Schwann y la inflamación relacionada exacerban el daño nervioso.

30 A diferencia del sistema nervioso central, puede producirse una cantidad significativa de regeneración en los nervios periféricos. Los axones crecen a lo largo de los canales del perineuro y re-inervan los objetivos distales y las células de Schwann remielinizan los axones. Aunque hay regeneración de nervios periféricos, desafortunadamente, este proceso no es perfecto; muchas neuronas que sufren degeneración nunca se regeneran o nunca encuentran su objetivo original y el resultado de disfunciones permanentes. Esta disfunción puede comprender pérdida de la función motora, pérdida de la función sensorial, parestesias, pérdida de reflejos, rigidez, contracturas o disminución del rango de movimiento.

Cualquier terapia que pueda limitar el alcance de la disfunción después de una lesión nerviosa tendría un impacto significativo en las estrategias terapéuticas actuales para el tratamiento de las lesiones nerviosas periféricas.

40 Una gran cantidad de literatura demuestra que las neuregulinas mejoran la capacidad de las neuronas para regenerarse a través de conductos artificiales y funcionan como una terapia complementaria con terapias celulares tal como los injertos de células de Schwann.

45 El modelo empleado en estos estudios (modelo de disfunción eréctil de rata) es un modelo estándar, aceptado y bien publicitado de lesión nerviosa periférica. En este enfoque específico, el nervio cavernoso se lesiona por compresión con fórceps. La misma compresión o lesión por aplastamiento puede usarse como modelo en cualquier otro nervio periférico. En el modelo de lesión del nervio cavernoso, el déficit funcional está en la función eréctil. En vista de la fisiopatología común y constante de la lesión nerviosa traumática, tal lesión del nervio cavernoso es un excelente modelo para la lesión inducida por prostatectomía, así como un modelo general para todas las lesiones traumáticas del nervio periférico.

50 Las lesiones a los nervios periféricos inducen cambios dentro de los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales ubicadas en el ganglio de la raíz dorsal (DRG); Estos cambios promueven la supervivencia y la regeneración axonal. Bajo condiciones favorables, por ejemplo, después de una lesión por aplastamiento, la mayoría de las fibras nerviosas se regeneran con éxito. Sin embargo, en muchas circunstancias clínicamente relevantes, la lesión nerviosa traumática o inducida por la enfermedad tiene un mal resultado con un retorno limitado de la función y, a menudo, con un retraso considerable. En tales casos, pueden desarrollarse estados de dolor neuropático o crónico.

5 El dolor normalmente se asocia con daño o lesión del nervio sensorial y da como resultado la protección e inmovilización del área afectada. Por lo tanto, la nocicepción (la señalización neuronal subyacente a la sensación de dolor) es concomitante con los mecanismos y la promoción de la curación rápida, aunque desencadena una experiencia sensorial y emocional desagradable. Sin embargo, en muchas situaciones patológicas, las entradas nociceptivas pueden dar lugar a cambios funcionales que son perjudiciales para el organismo.

10 Pain is normally associated with sensory nerve injury or damage and results in guarding and immobilization of the affected area. Nociception (the neuronal signaling underlying the sensation of pain) therefore is concomitant to mechanisms for and the promotion of rapid healing, albeit triggering an unpleasant sensory and emotional experience. However, in many pathological situations, nociceptive inputs can result in functional changes that are actively detrimental to the organism.

15 La lesión nerviosa da como resultado la alteración de muchas de las propiedades de las neuronas aferentes primarias y sus conexiones centrales en la médula espinal, lo que lleva a alodinia (la percepción del dolor de un estímulo normalmente inocuo), hiperalgesia (una respuesta exagerada a cualquier estímulo de dolor dado) y una expansión del campo receptivo (es decir, el área que es "dolorosa" cuando se aplica un estímulo). La mayoría de las condiciones de dolor crónico surgen como resultado del daño al tejido nervioso central o periférico.

Disfunción eréctil

20 La impotencia, o también conocida como disfunción eréctil (ED), es un problema común que afecta a 20 millones de hombres solo en los Estados Unidos. La erección del pene es un fenómeno neurovascular que depende tanto de la integridad neural como de los vasos sanguíneos funcionales. Tras la estimulación sexual, los neurotransmisores (especialmente el óxido nítrico) se liberan de las terminales nerviosas cavernosas y las células endoteliales. La relajación resultante de los músculos lisos arteriales y arteriolas aumenta el flujo arterial. La sangre atrapada dentro de los cuerpos cavernosos lleva el pene a un estado erecto.

25 La lesión del nervio cavernoso por cirugías pélvicas radicales, tales como el cáncer de próstata, vejiga o rectal, es una de las causas más comunes de ED iatrogénica en este país. La ED es una fuente importante de morbilidad después de la prostatectomía radical. Por ejemplo, a pesar de la introducción de técnicas quirúrgicas para preservar los nervios, las tasas de potencia postoperatoria oscilan entre 30% y 80% para los hombres que se han sometido a procedimientos de preservación nerviosa cavernosa bilateral para el cáncer de próstata confinado a órganos (Wang, J Sex Med, 4: 1085-97, 2007).

30 Se han investigado diversas estrategias neuromoduladoras hasta la fecha; sin embargo, no hay tratamientos disponibles para la neuroprotección de los nervios cavernosos antes o en el momento de la lesión, o tratamientos después de la lesión para provocar la regeneración nerviosa (Michl et al., J Urol 176:227-31, 2006 ; Burnett and Lue, J Urol 176:882-7, 2006). A pesar de las modificaciones contemporáneas que ahorran nervios a las terapias quirúrgicas y de radioterapia para las neoplasias pélvicas, existe la necesidad de nuevos medios para preservar y restaurar la función eréctil después del tratamiento.

35 Se observa un patrón bien definido de cambios celulares distales al sitio del daño, que progresa desde la degeneración de la vaina axonal y de mielina, la invasión de macrófagos, las fagocitosis y la desdiferenciación de células de Schwann hasta la formación de bandas de Bungner. Estos cambios modifican el entorno del nervio lesionado y su potencial para la regeneración de axones. La supervivencia neuronal se ve facilitada por factores tróficos cuando los axones cambian del modo 'transmisor' al modo de crecimiento, expresando proteínas (GAP-43, tubulina, actina), nuevos neuropéptidos y citoquinas. Se requieren nuevas estrategias que mejoren el potencial de crecimiento ya que el soporte del muñón del nervio distal y la capacidad neuronal para regenerarse no son indefinidas (Fu and Gordon, Mol Neurobiol. 14: 67-116, 1997).

Neuregulinas

45 Por "neuregulina", "neuregulin-1", "NRG-1", "heregulina" se entiende un polipéptido que se une a los receptores ErbB1, ErbB 3 o ErbB 4 y por emparejamiento (dimerización) al receptor ErbB2. Por ejemplo, una neuregulina puede ser codificada por el gen del ligando p185erbB2 descrito en las patentes U.S. 5,530,109 ; 5,716,930 ; y7,037,888; una neuregulina también puede estar codificada por los genes NRG-2, 3 y 4.

50 La neuregulina puede ser GGF2 o cualquier fragmento activo de la misma; También puede ser una variante conservadora de GGF2, o una molécula que comprende GGF2. En algún uso en la técnica, el término "neuregulina" pretende indicar solo un dominio similar a EGF de una molécula de neuregulina completa; Esto también se conoce como proteína, péptido o polipéptido "similar a la neuregulina".

55 Por proteína "similar a neuregulina", péptido o polipéptido se entiende un polipéptido que posee un dominio similar a EGF codificado por un gen de neuregulina. En una realización, una proteína, péptido o polipéptido "similar a neuregulina" produce un efecto terapéutico en un sujeto que tiene una lesión del nervio periférico o uno en riesgo de lesión del nervio periférico (por ejemplo, pacientes programados para cirugía o parto de tal manera que existe un riesgo de una lesión nerviosa periférica relacionada).

ES 2 763 086 T3

La secuencia de aminoácidos de GGF2 (con una región que comprende su dominio similar a EGF debajo del revestimiento) es:

MRWRRAPRRSGRPGPRAQRPGSAARSSPPLPLLPLLLLLGTAALAPGAAAGNEAAPA
GASVCYSSPPSVGQELAQRAAVVIEGKVHPQRRQQGALDRKAAAAAGEAGAWG
GDREPPAAGPRALGPPAEPELLAANGTVPSWPTAPVPSAGEPGEAPYLKVVHQQVW
AVKAGGLKKDSSLTVRLGTWGHFAFPSCGRLKEDSRYIFFMEPDANSTSRAPAAFR
SFPPLETGRNLKKEVSRVLCRRCALPPQLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSLR
KWFKNLGNELNRKNKPNQNIQKPKGSELRINKASLADSGEYMCKVISKLGNDSSA
NITIVESNATSTSTTGTSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFT
GDRCQNYVMASFYSTSTPFLSLPE (SEQ ID NO:1)(número de acceso GenBank AAB59622)

- 5 En ciertos aspectos de la invención, un polipéptido de neuregulina o segmento del mismo es 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idéntico u homólogo a la secuencia de aminoácidos de GGF2. En ciertos aspectos de la invención, un polipéptido similar a la neuregulina es 75, 80, 85, 86, 97, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idéntico u homólogo a la secuencia de aminoácidos del dominio similar a EGF de GGF2.
- 10 Como se usa en el presente documento, una "proteína" o "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende al menos diez residuos de aminoácidos. En ciertas realizaciones, la proteína comprende todo o parte del polipéptido GGF2. En algunas realizaciones, se emplea una versión de tipo silvestre de una proteína o polipéptido, sin embargo, en algunas realizaciones de la invención, se emplea una proteína o polipéptido modificado para tratar la lesión nerviosa periférica. Los términos "péptido", "proteína" o "polipéptido" se usan indistintamente en el presente documento. Por conveniencia, el término péptido se usa en el presente documento para referirse a secuencias de aminoácidos de cualquier longitud.
- 15 Un "péptido modificado" se refiere a un péptido cuya estructura química, particularmente su secuencia de aminoácidos, se altera con respecto al péptido de tipo silvestre respectivo. En algunas realizaciones, un péptido modificado tiene al menos un aminoácido modificado. En algunas realizaciones, un péptido modificado tiene al menos un d-aminoácido. En algunas realizaciones, un péptido modificado tiene al menos un aminoácido no natural.
- 20 Sin limitación, en ciertas realizaciones, el tamaño de un péptido (de tipo silvestre o modificado) puede comprender cualquiera de (o cualquier rango derivable de): 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 422, moléculas de amino o más, y cualquier rango derivable en el mismo, de una secuencia de amino correspondiente descrita o referenciada aquí; en una realización, tal proteína, polipéptido o rango de tamaño es relativo al GGF2. Se contempla que los polipéptidos pueden mutar por truncamiento amino terminal o carboxilo terminal, haciéndolos más cortos que su forma de tipo silvestre correspondiente, pero también pueden alterarse fusionando o conjugando una secuencia de proteína heteróloga con una función particular (por ejemplo, para direccionamiento o localización, para fines de purificación, etc.).
- 25
- 30 Como se usa en el presente documento, una "molécula de aminoácido" se refiere a cualquier aminoácido, derivado de aminoácidos o imitador de aminoácidos conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, los residuos de la molécula peptídica son secuenciales, sin que ninguna molécula no amino interrumpa la secuencia de los residuos de la molécula amino. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender una o más unidades estructurales de molécula no amino. En realizaciones particulares, la secuencia de residuos de la molécula peptídica puede ser interrumpida por una o más unidades estructurales de molécula no amino.
- 35
- Por consiguiente, el término composición "péptido" comprende secuencias de aminoácidos; estos aminoácidos pueden ser cualquiera de los 20 aminoácidos comunes en proteínas sintetizadas naturalmente o cualquier aminoácido modificado o inusual.
- 40 Las composiciones peptídicas pueden prepararse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, que incluye (i) la expresión de péptidos a través de técnicas biológicas moleculares estándar, (ii) el aislamiento de compuestos peptídicos a partir de fuentes naturales, o (iii) síntesis química. El nucleótido, así como las secuencias de péptidos para ciertos genes de neuregulina se han divulgado previamente, y se pueden encontrar en las bases de datos computarizadas reconocidas. Una de esas bases de datos son las bases de datos Genbank y GenPept del Centro Nacional de Información Biotecnológica (en la World Wide Web en ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones de

codificación para estos genes pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas descritas en el presente documento o las técnicas que conocerán los expertos en la materia.

5 Los péptidos modificados pueden incluir variantes de sustitución, inserción o delección. Las variantes de delección típicamente carecen de uno o más residuos de la molécula nativa o de tipo silvestre. Se pueden eliminar los residuos individuales o se pueden eliminar varios aminoácidos contiguos. Se puede introducir un codón de parada (mediante sustitución o inserción) en una secuencia de ácido nucleico codificante para generar una proteína truncada. Los mutantes de inserción típicamente implican la adición de material en un punto no terminal en el péptido. Esto puede incluir la inserción de uno o más residuos. También se pueden generar adiciones terminales, a menudo llamadas proteínas de fusión o péptidos de fusión. Las variantes de sustitución típicamente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro del péptido, y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del péptido, con o sin la pérdida de otras funciones o propiedades, como la unión y activación de receptores de neuregulina. Las sustituciones pueden ser conservadoras, es decir, un aminoácido se reemplaza con uno de forma y carga similares. Alternativamente, las sustituciones pueden ser no conservativas de modo que una función o actividad del péptido puede verse afectada. Los cambios no conservadores típicamente implican la sustitución de un residuo con uno que es químicamente diferente, tal como un aminoácido polar o cargado por un aminoácido no polar o no cargado, y viceversa.

20 Las "sustituciones conservadoras" son bien conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina o leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina.

25 También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos pueden incluir residuos adicionales, tales como aminoácidos de terminales N o C adicionales, o secuencias 5' o 3', respectivamente, siempre que la secuencia cumpla con los criterios funcionales establecidos aquí tal como el mantenimiento de la actividad biológica. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácido nucleico que pueden, por ejemplo, incluir diversas secuencias no codificantes que flanquean cualquiera de las porciones 5' o 3' de la región codificante.

Formulaciones farmacéuticas

30 Las formulaciones farmacéuticas para uso en la presente invención comprenden una cantidad efectiva de un péptido disuelto o dispersado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptables" se refieren a composiciones que generalmente no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administra a un sujeto, por ejemplo, un humano, según corresponda. La preparación de tales composiciones farmacéuticas es conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para fines de administración humana, se entenderá que las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza, como lo exige, por ejemplo, la USFDA Office of Biological Standards.

40 Además, como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye materiales tales como disolventes, medios de dispersión, revestimientos, surfactantes, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como es conocido por un experto en la técnica a la vista de la presente divulgación. Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con un ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

50 Los productos farmacéuticos para uso en la presente invención pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se administrará en forma sólida, líquida o en aerosol, y si necesita ser estéril para tales vías de administración como inyección. La presente invención se puede administrar por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, por vía intratraqueal, intranasal, por vía intravítrea, intravaginal, intrarrectal, por vía intratumoral, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, intravascularmente, por vía mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocularmente, oralmente, tópicamente, localmente, por inhalación (por ejemplo, aerosol). Además, la presente invención puede administrarse mediante inyección, infusión, infusión continua, células diana de baño de perfusión localizadas directamente, a través de un catéter, a través de un lavado, o por otro método o cualquier combinación de lo anterior como sería conocido por un experto en la técnica.

La cantidad de dosificación real de una composición de la presente invención administrada a un sujeto puede determinarse por factores físicos y fisiológicos tales como peso corporal, gravedad de la condición, el tipo de enfermedad que se va a tratar, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del paciente y en la ruta

de administración. El profesional responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de ingredientes activos en una composición y las dosis apropiadas para el sujeto individual.

- 5 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0.1% de compuesto activo. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente 2% a aproximadamente 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25% a aproximadamente 60%, por ejemplo, y cualquier rango derivable en el mismo. En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de cuerpo peso o más por administración, y cualquier rango derivable en el mismo. En ejemplos no limitantes de un rango derivable de los números enumerados aquí, un rango de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, etc., se pueden administrar, con base en los números descritos anteriormente.
- 10
- 15
- 20 En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de los microorganismos puede llevarse a cabo mediante conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, que incluyen, pero no se limitan a, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.
- 25 Los productos farmacéuticos pueden formularse en una composición en una base libre, neutral o en forma de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, aquellas formadas con los grupos amino libres de una composición peptídica, o que están formadas con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico, o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.
- 30
- 35 En realizaciones donde la composición está en forma líquida, un vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprende, pero no se limita a, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como la lecitina; por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido por dispersión en vehículos tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; mediante el uso de surfactantes tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de tales métodos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o combinaciones de los mismos.
- 40 En ciertas realizaciones, las composiciones se preparan para la administración por vías tales como la ingestión oral. En estas realizaciones, la composición sólida puede comprender, por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina con cubierta dura o blanda), formulaciones de liberación sostenida, composiciones bucales, trocitos, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, o combinaciones de las mismas. Las composiciones orales se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta. Los vehículos preferidos para administración oral comprenden diluyentes inertes, vehículos comestibles asimilables o combinaciones de los mismos. En otros aspectos de la invención, la composición oral puede prepararse como un jarabe o elixir. Un jarabe o elixir, y puede comprender, por ejemplo, al menos un agente activo, un agente edulcorante, un conservante, un agente aromatizante, un tinte, un conservante o combinaciones de los mismos.
- 45
- 50 En ciertas realizaciones preferidas, una composición oral puede comprender uno o más aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes aromatizantes y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, una composición puede comprender uno o más de los siguientes: un aglutinante, tal como, por ejemplo, goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato dicálcico, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente desintegrante, tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico o combinaciones de los mismos, un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio; un agente edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los mismos, un agente aromatizante, tal como, por ejemplo, menta, aceite de gaulteria, sabor de cereza, sabor de naranja, etc.; o combinaciones de los mismos de lo anterior. Cuando la forma de unidad de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, vehículos tales como un vehículo líquido. Diversos otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, las tabletas, píldoras o cápsulas pueden estar recubiertas con goma laca, azúcar o ambos.
- 55
- 60

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando los compuestos activos de la invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado, opcionalmente con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, como se solicitó, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/u otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, suspensiones o emulsiones, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío o secado por congelación que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de un medio líquido filtrado previamente estéril del mismo. El medio líquido se debe regular adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido debe volverse isotónico antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. También se contempla la preparación de composiciones altamente concentradas para inyección directa, donde se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, suministrando altas concentraciones de los agentes activos en un área pequeña.

Preferiblemente, una composición para uso en la invención es estable bajo condiciones estándar de fabricación y almacenamiento, y se conserva contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas debe mantenerse mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0.5 ng/mg de proteína.

En realizaciones particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable para uso en la invención puede producirse mediante composiciones para uso en la invención que comprenden agentes que retrasan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

20 Ejemplos

Ejemplo 1: El modelo de rata de lesión del nervio cavernoso

El modelo de rata de lesión del nervio cavernoso típicamente usa la siguiente metodología. Las ratas se anestesian con isoflurano. Los animales se colocan sobre una almohadilla térmica para mantener la temperatura corporal a 37 °C. El abdomen se afeita y es exfoliado con solución antiséptica de Clinidina (yoduro de povidona). Se realiza una abertura en la línea media del abdomen inferior de la cavidad peritoneal, exponiendo los nervios cavernosos y los ganglios pélvicos mayores (MPGs). La lesión del nervio cavernoso se induce al aplastar el nervio cavernoso con una pinza hemostática durante dos minutos por lado. En los estudios relacionados con la neuregulina, dos grupos de neuregulina fueron tratados 48 horas antes de la lesión.

El modelo de aplastamiento de ratas proporciona una disminución simple, reproducible y extremadamente confiable de la función eréctil. Esta técnica se usa ampliamente y se han publicado varios estudios con esta técnica. No es necesario probar la función eréctil después de la lesión por aplastamiento, la función eréctil disminuida es predecible y, por lo general, las pruebas funcionales se realizan aproximadamente 5 semanas después de la lesión por aplastamiento.

Después de la lesión del nervio cavernoso, la cavidad abdominal se cierra en dos capas con una reproximación de los músculos abdominales y la fascia (sutura absorbible) a través de 2-3 suturas interrumpidas. La piel se cierra usando una sutura continua subcuticular (enterrada) para la piel con un material de sutura que no se impregna (PDS o vicryl recubierto). El analgésico de buprenorfina se administró de forma preventiva (10 minutos antes de finalizar el procedimiento) y cada 6-12 horas después de la operación durante 48 horas para el control del dolor.

Aproximadamente a 5 semanas después de la operación, las ratas fueron anestesiadas con Ketamina (100 mg/kg IP) y Xilazina (5 mg/kg). Las cruras cavernosas se exponen a través de la misma incisión y se realizan estudios funcionales utilizando una aguja 23G insertada en la crura izquierda y conectada a un programa de software diseñado específicamente para medir las presiones intracavernosas. Antes de la medición, los nervios cavernosos se estimulan con un electrodo a 1.5 mA. La duración del procedimiento de medición es de aproximadamente 15 minutos. Las ratas se sometieron a eutanasia con euthanyl-intercardiac antes de la recuperación anestésica y se recolectaron tejidos (nervios cavernosos, MPG, pene, próstata) para microscopía óptica y evaluaciones moleculares e histológicas.

Como se presenta en los datos de presiones intracavernosas (ICP) mostrados en la FIG. 1, la electroestimulación de los nervios cavernosos 5 semanas después de la lesión demostró una preservación significativa de la función nerviosa y del órgano terminal en ambos grupos tratados con neuregulina y esto fue aún más significativo a dosis más altas. Los datos se analizaron primero mediante ANOVA de medidas no repetidas con la prueba t de Bonferroni y la significación se consideró en $p < 0.05$. Todos los resultados se expresan como la media \pm SEM. Los cambios también mejoraron significativamente cuando se normalizaron a las presiones aórticas como se muestra en la FIG. 2)

Desde un punto de vista histológico, los datos indican que el tratamiento con NRG aumentó el número de fibras nerviosas intactas basadas en el etiquetado transportado retrógradamente fluoro-oro en el MPG, y mejoró la preservación de la óxido nítrico neuronal sintasa y VaChT del nervio y los tejidos del músculo liso del pene. Esto indica que existen mecanismos de acción neuroprotectores y/o neuroregenerativos. La apoptosis del músculo liso también disminuye en comparación con los animales con lesiones por aplastamiento que no reciben neuregulina.

Ejemplo 2: métodos de histología con fluoro-oro

Para realizar este protocolo, se realizó una inyección intracorporal de 4% de fluoro-oro, y en una semana, se recolectaron tejidos de ganglios pélvicos mayores (MPG) y se fijaron en paraformaldehído al 4%, regulador de fosfato 0.1 M, se fijaron durante la noche y luego se colocaron en 20% de sacarosa. La criosección fue de 20 µm de espesor. Las imágenes se tomaron usando una cámara Infinity y un sistema de imágenes, seguido de análisis ciegos para conteos de células mejoradas con fluoro de oro. Posteriormente, los portaobjetos de especímenes de MPG se seleccionaron aleatoriamente (10 por animal) y se realizaron recuentos celulares para determinar el número de neuronas intactas. (Véase, por ejemplo, Dail, W. G., Trujillo, D., de la Rosa, D. and Walton, G.: Autonomic innervation of reproductive organs: analysis of the neurons whose axons project in the main penile nerve in the pelvic plexus of the rat. *Anat Rec*, 224: 94, 1989; Laurikainen A, Hiltunen JO, Vanhatalo S, Klinge E, Saarma M: Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in penis of adult rat and retrogradely transported in penile parasympathetic and sensory nerves. (*Cell Tissue Res* 2000, 302:321-9.))

Por lo tanto, este era un protocolo de rastreo retrógrado que usaba fluoro-oro. Los resultados de este protocolo proporcionaron información que indica que el tratamiento con neuregulina ayudó a la regeneración y la reproyección a su objetivo (los cuerpos cavernosos del pene) y/o la neuroprotección de los nervios cavernosos.

En consecuencia, se inyectó fluoro-oro en un órgano objetivo, en este caso los cuerpos del pene. Posteriormente, se produjo la captación de los terminales nerviosos del órgano final. Esta absorción indicó que las fibras nerviosas se preservaron y/o volvieron a crecer en el área inyectada. Una vez que hay captación de fluoro-oro, el fluoro-oro se transporta de manera retrógrada en el axón nervioso y el marcador se acumula en las neuronas originales del MPG (ganglio pélvico mayor).

La figura 3 muestra el marcado con fluoro-oro representativo de los ganglios pélvicos principales (MPG) de 3 animales por grupo de tratamiento ((panel A) normal, (panel B) aplastamiento, (panel C) aplastamiento + GGF2). Los animales normales (panel A) demuestran la cantidad de marcaje retrógrado observado en ausencia de lesión nerviosa. Los animales aplastados (panel B) demuestran la reducción dramática en las fibras nerviosas intactas de la lesión, ya que la etiqueta de fluoruro-oro no puede transportarse todo el camino de regreso al MPG. Los animales aplastados + GGF2 (panel C) muestran un mayor número de células MPG marcadas con fluoro-oro, lo que indica que hay más fibras nerviosas preservadas presentes después de la lesión como resultado del tratamiento con GGF2.

La figura 4 proporciona una cuantificación del marcado con fluoro-oro en el MPG. Los animales normales tienen una gran cantidad de cuerpos celulares marcados en el MPG. Después de una lesión por aplastamiento, el número de células marcadas se reduce drásticamente, como consecuencia del daño de la fibra nerviosa y la incapacidad resultante de transportar de manera retrógrada el marcador de regreso al MPG. El tratamiento con GGF2 mejoró el número de fibras nerviosas intactas disponibles para transportar el fluoro-oro desde el tejido del pene al MPG de manera retrógrada, lo que dio como resultado un mayor número de células marcadas.

Ejemplo 3: inmunohistoquímica

Las criosecciones longitudinales de la porción proximal de los cuerpos se tiñeron para nNos, VaChT. Todos los lavados se realizaron con regulador Tris que contenía 1% de tritón-X. Los tejidos se bloquearon 1 hora con suero de cabra normal al 5% y luego se incubaron durante la noche a 4°C con, respectivamente:

- a) nNOs (Sigma; 1/1000) o
- b) VaChT (Abcam; 1/150) o
- c) TH (Millipore; 1/5000).

Después de varios enjuagues, las secciones se incubaron durante 1 hora en HRP de cabra-anti-conejo y anti-cabra de burro (1/1000) luego en una solución DAB que contenía 0.2% de sulfato de níquel de amonio y 0.03% de peróxido de hidrógeno durante 10 minutos. Después del último lavado, las secciones se deshidrataron, se aclararon en xileno y se cubrieron con un cubreobjetos en Permout (Fisher Scientific).

Tinción de nNos:

El óxido nítrico (NO) liberado de las placas terminales axonales de los nervios cavernosos dentro de los cuerpos cavernosos, junto con el NO endotelial, provoca la relajación del músculo liso, iniciando los cambios hemodinámicos de la erección del pene y contribuyendo a mantener la tumescencia. Actualmente se entiende que un retorno a la potencia después de una lesión en los nervios cavernosos depende, al menos en parte, de la regeneración axonal en los tejidos neurales restantes y la reinervación funcional exitosa del órgano terminal (permitiendo la activación neuronal del NO). Se observan cambios patobiológicos bien definidos en los estudios con modelos animales del pene después del compromiso del nervio cavernoso. Estos cambios patobiológicos pueden variar desde neuropraxia hasta daño axonal letal, y pueden incluir apoptosis del músculo liso, apoptosis del endotelio, densidad nerviosa reducida de óxido nítrico sintasa (NOS), sobrerregulación de las citoquinas fibroproliferativas tales como el factor de crecimiento

transformante beta (TGF- β), pérdida o fibrosis del músculo liso, o respuestas de señalización patobiológica tal como la proteína hedgehog sónica alterada.

5 Adicionalmente, una ausencia crónica de erección secundaria a neuropraxia del nervio cavernoso durante la fase de recuperación prolongada se cree que exacerba el potencial de un mayor deterioro estructural del músculo liso cavernoso debido a una falla del ciclo cavernoso normal entre los estados flácidos y erectos (Bella AJ, Lin G, Fandel TM, Hickling DR, Morash C, Lue TF. Nerve growth factor modulation of the cavernous nerve response to injury. J Sex Med 6 Suppl 3: 347-352, 2009.

10 El nNOS cavernoso es un marcador bien establecido de preservación del nervio cavernoso. (Véase, por ejemplo, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-410X.2010.09364.x/full>) Los resultados de este protocolo indicaron un efecto neuroprotector y/o regenerativo nervioso después de una lesión bilateral del nervio cavernoso en la rata producida de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 1.

La densidad de los resultados de la tinción (secciones corporales proximales representativas, 5 cortes seleccionadas al azar, observador cegado, con base en 5 animales por grupo) indicó la preservación de la tinción de nNOS para sujetos tratados con neuregulina.

15 La figura 5 proporciona tinción representativa para los niveles de nNos. La densidad de la tinción indica la presencia de nNOS. Los resultados de este trabajo incluyen tinción de tejido normal (panel A). En comparación, hay una pérdida significativa de tinción de nNOS después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (panel B). La tinción preservada de nNOS de las terminaciones nerviosas cavernosas en el cuerpo del pene demuestra mayores tasas de supervivencia y/o regeneración de los nervios cavernosos después de una lesión por aplastamiento con el tratamiento con GGF2 (panel C). La densidad de la tinción indica la preservación de la tinción de nNOS con el tratamiento con GGF2.

Tinción del transportador de acetilcolina vesicular (VaChT).

25 Las neuronas del ganglio pélvico que inervan el pene expresan nNOS y marcadores colinérgicos, mientras que la inervación simpática noradrenérgica del pene surge principalmente a través de la cadena simpática y no atraviesa los nervios del pene o el ganglio pélvico. Los resultados de este protocolo proporcionaron información que indica que el tratamiento con neuregulina ayudó a la regeneración y la reyección a su objetivo (los cuerpos cavernosos del pene) y/o la neuroprotección de los nervios cavernosos basada en la tinción intracorporal para el transportador de acetilcolina vesicular (VaChT). Aunque la etiología primaria de la ED posquirúrgica es neurogénica, los estudios en roedores han revelado que también ocurren cambios morfológicos y funcionales dentro del tejido cavernoso después de la lesión del nervio del pene. (Véase, por ejemplo, Keast JR. Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation. Int Rev Cytol 2006;248: 141-208; Andersson KE, Hedlund P, Aim P. Sympathetic pathways and adrenergic innervation of the penis. Int J Impot Res 2000;12:S5-12; Mulhall JM, Bella AJ, Briganti A, McCullough A, Brock G. Erectile Function Rehabilitation in the Radical Prostatectomy Patient. J Sex Med 7(4), 1687-1698, 2010)

35 La densidad de los resultados de la tinción (secciones corporales proximales representativas, 5 cortes seleccionadas al azar, observador cegado, con base en 5 animales por grupo) indicó la preservación de la tinción con VaChT en las ratas que recibieron el GGF2.

40 La figura 7 proporciona una tinción inmunohistoquímica representativa del transportador de acetilcolina vesicular (VaChT). La densidad de la tinción indica la presencia de VaChT. Los resultados incluyen tinción de tejido normal (panel A) y una pérdida significativa de tinción de VaChT después de una lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (panel B). Por el contrario, la tinción conservada con VaChT de las terminaciones nerviosas cavernosas en los cuerpos del pene que se muestra en el Panel C demostró mayores tasas de supervivencia y/o regeneración de los nervios cavernosos después de una lesión por aplastamiento tratada con tratamiento con GGF2 (panel C). La densidad de la tinción indica la preservación de la tinción de VaChT con el tratamiento con GGF2.

Tinción de TH

45 TH es un marcador de fibras nerviosas adrenérgicas y se utiliza para apoyar la preservación nerviosa en los cuerpos. La porción proximal de los cuerpos fue crioseccionada longitudinalmente y teñida con anticuerpos primarios generados contra el marcador de síntesis de catecolaminas, tirosina hidroxilasa (Reinervación cavernosa deteriorada después de lesión del nervio del pene en ratas con características del síndrome metabólico Matthew R. Nangle, BSc, PhD, Joseph Proietto, MBBS, PhD, † y Janet R. Keast, BSc, PhD J Sex Med 2009; 6: 3032-3044).

50 La densidad de los resultados de tinción indica la presencia de TH. La densidad de los resultados de tinción realmente logrados (secciones corporales proximales representativas, 5 cortes seleccionadas al azar, observador cegado, con base en 5 animales por grupo) indicaron la preservación de la tinción de TH en animales tratados con GGF2. La figura 6 proporciona una tinción representativa de los niveles de tirosina hidroxilasa (TH). Los resultados incluyen tinción de tejido normal (panel A) y una pérdida significativa de tinción de TH después de una lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (panel B). El panel C muestra que la tinción conservada de TH de las terminaciones nerviosas cavernosas en el cuerpo del pene corresponde mejor a un aumento general en la preservación de la inervación del pene después

de una lesión por aplastamiento con el tratamiento con GGF2 (panel C). La densidad de la tinción muestra tendencias hacia la preservación de la tinción de TH con el tratamiento con GGF2.

5 La figura 6 proporciona una tinción representativa de los niveles de tirosina hidroxilasa (TH). Los resultados incluyen tinción de tejido normal (panel A) y una pérdida significativa de tinción de TH después de una lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (panel B). El panel C muestra que la tinción conservada de TH de las terminaciones nerviosas cavernosas en el cuerpo del pene corresponde mejor a un aumento general en la preservación de la inervación del pene después de una lesión por aplastamiento con el tratamiento con GGF2 (panel C). La densidad de la tinción muestra tendencias hacia la preservación de la tinción TH con el tratamiento con GGF2.

Listado de secuencias

10

<110> CAGGIANO, ANTHONY O.

BELLA, ANTHONY J.

IACI, JENNIFER F.

<120> USO DE UNA NEUREGULINA PARA TRATAR LA LESIÓN DEL NERVI PERIFÉRICO

15

<130> ACOR.P0207US

<140> 12904891

<141> 2010-10-14

<150> 61/251,583

<151> 2009-10-14

20

<150> 61/252,161

<151> 2009-10-16

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

25

<211> 422

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 763 086 T3

Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg
1 5 10 15

Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu
20 25 30

Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala
35 40 45

Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser
50 55 60

Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala
65 70 75 80

Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala
85 90 95

Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly
100 105 110

Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro
115 120 125

ES 2 763 086 T3

Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro
 130 135 140

Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr
 145 150 155 160

Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys
 165 170 175

Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala
 180 185 190

Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe
 195 200 205

Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg
 210 215 220

Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val
 225 230 235 240

Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu
 245 250 255

Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys
 260 265 270

Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn
 275 280 285

Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln
 290 295 300

Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala
 305 310 315 320

Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp
 325 330 335

Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr
 340 345 350

Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys
 355 360 365

Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser
 370 375 380

Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp
 385 390 395 400

Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro
 405 410 415

Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 420

REIVINDICACIONES

1. Una neuregulina para uso en la prevención de una lesión del nervio cavernoso en un sujeto.
2. Uso de una neuregulina en la fabricación de un medicamento para prevenir una lesión del nervio cavernoso en un sujeto.
- 5 3. La neuregulina para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la lesión del nervio cavernoso se debe a un trauma o procedimiento médico.
4. La neuregulina para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la neuregulina se administra antes de la cirugía.
- 10 5. La neuregulina para uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 3 en donde el trauma es una lesión por aplastamiento.
6. La neuregulina para uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 3 en donde el trauma se debe a un procedimiento quirúrgico.
7. La neuregulina para uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el procedimiento quirúrgico es una cirugía pélvica radical.
- 15 8. La neuregulina para uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la cirugía pélvica radical es para cáncer de próstata, para cáncer de vejiga o para cáncer rectal.
9. La neuregulina para uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el procedimiento quirúrgico es una cirugía de resección tumoral.
- 20 10. La neuregulina para uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la cirugía de resección tumoral es una prostatectomía.
11. La neuregulina para uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la neuregulina es GGF2 o un fragmento que comprende un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (similar a EGF) del mismo.
- 25 12. La neuregulina para uso o el uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la neuregulina comprende un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (similar al EGF).

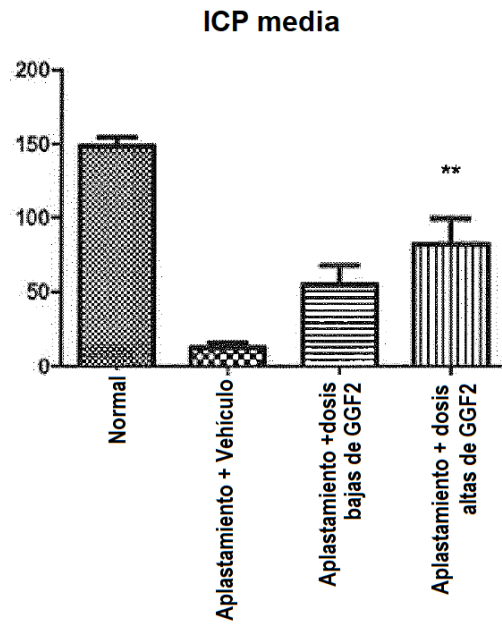


FIG. 1

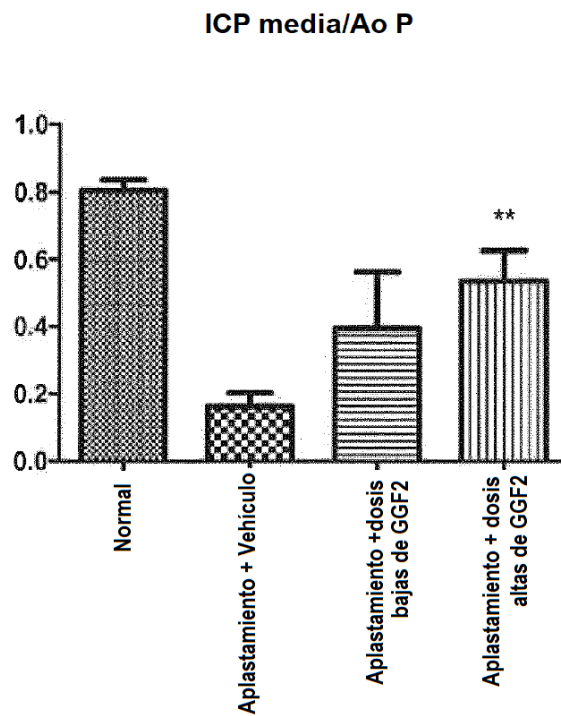


FIG. 2

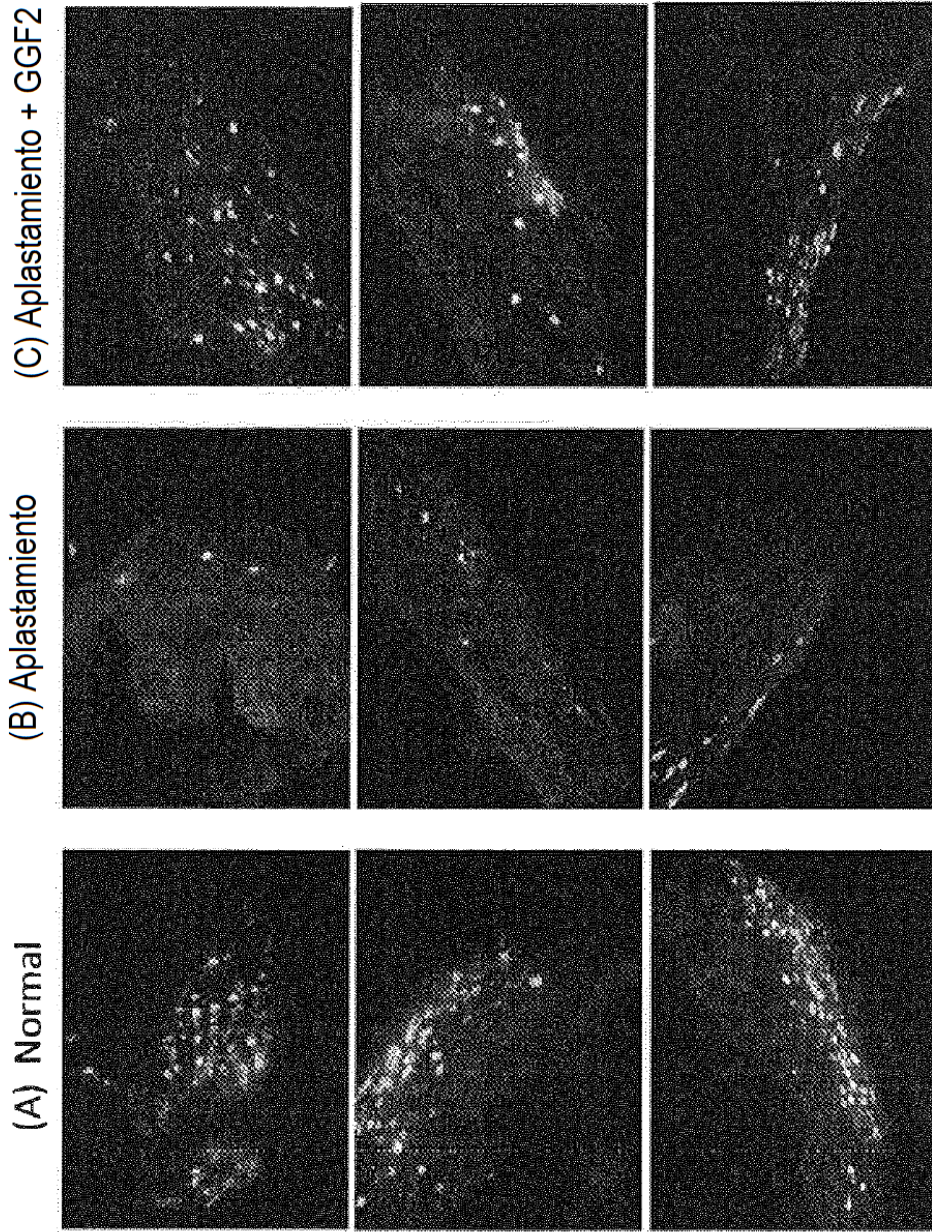


FIG. 3

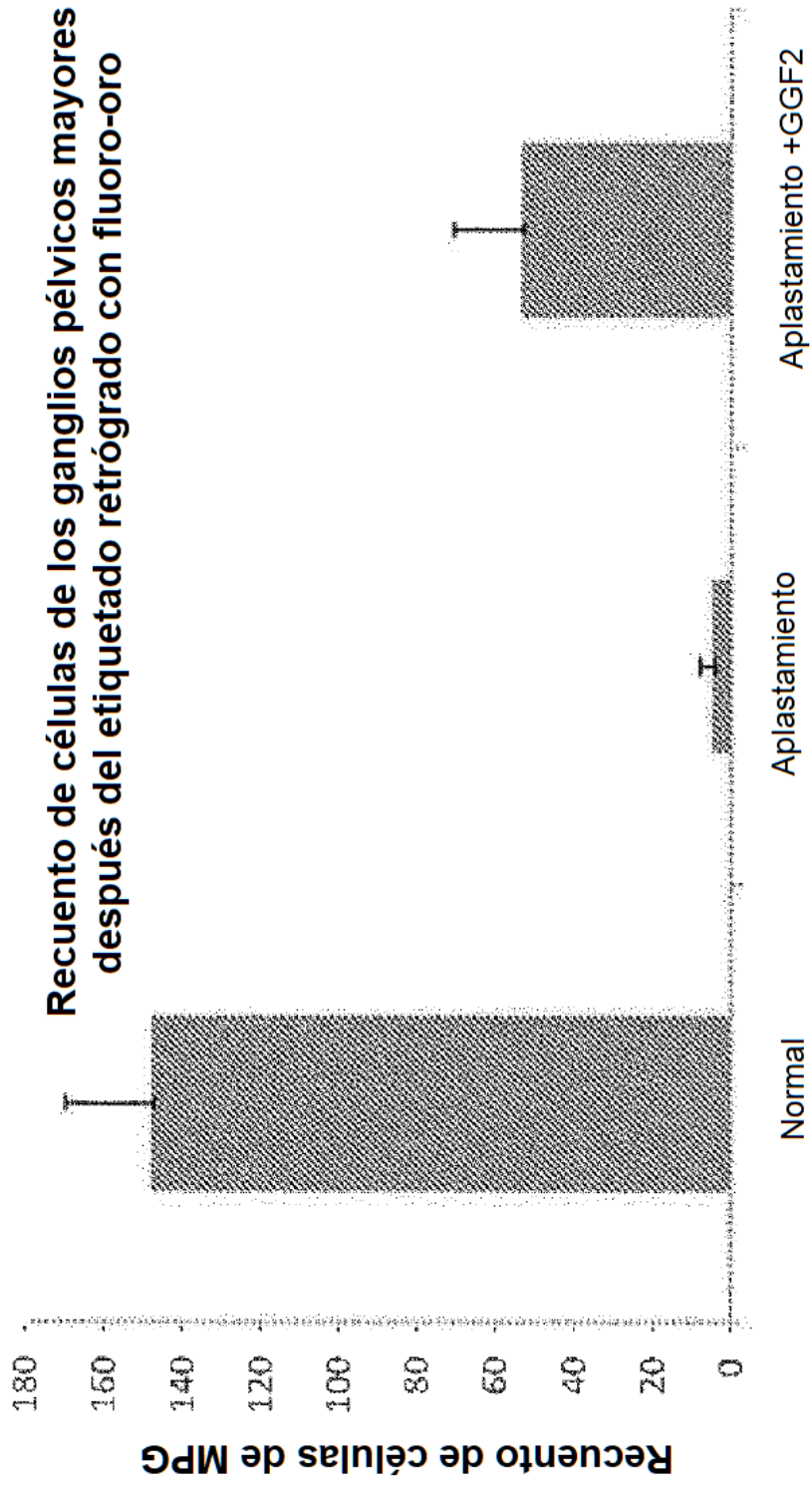


FIG. 4

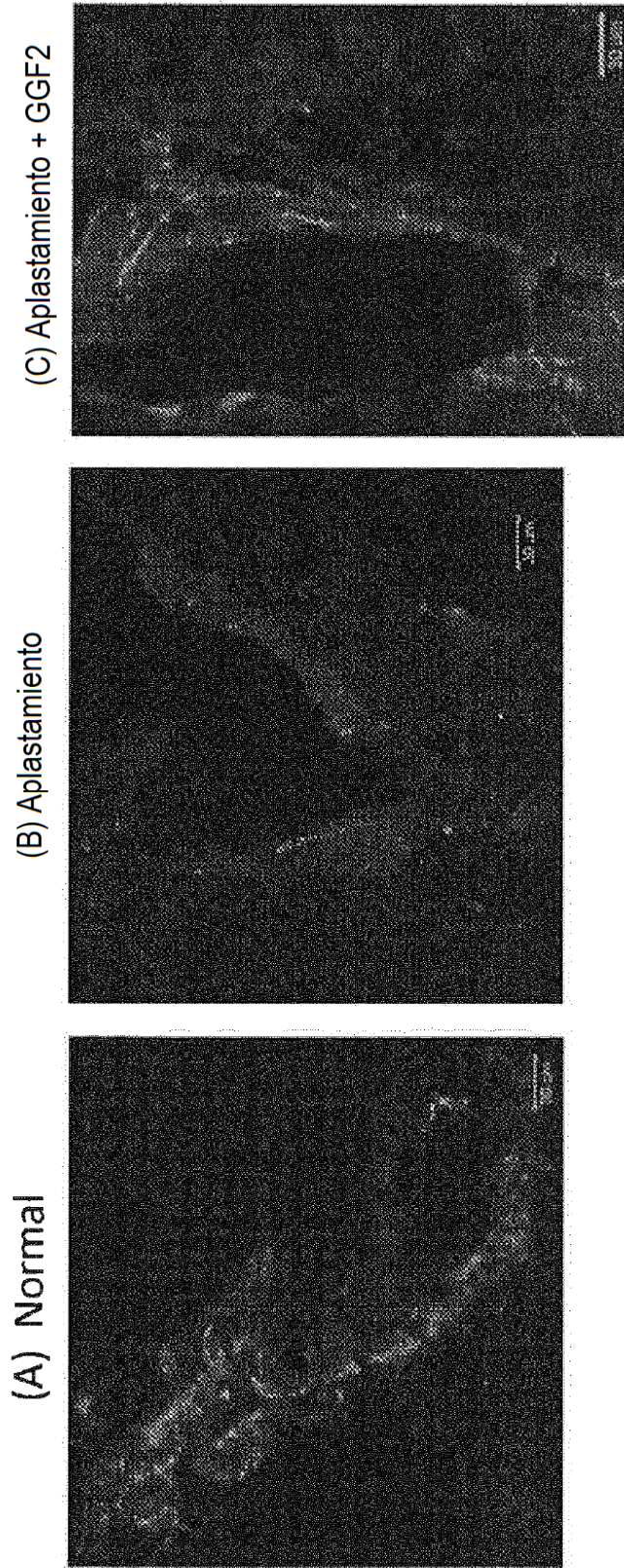


FIG. 5

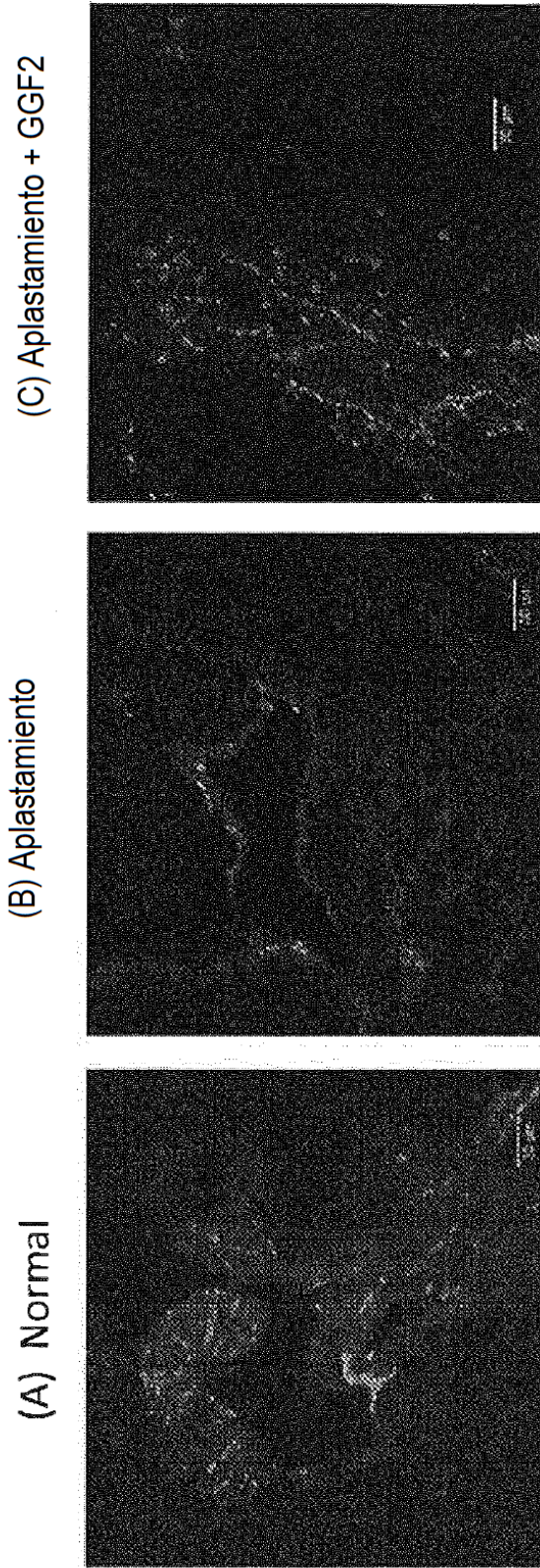


FIG. 6

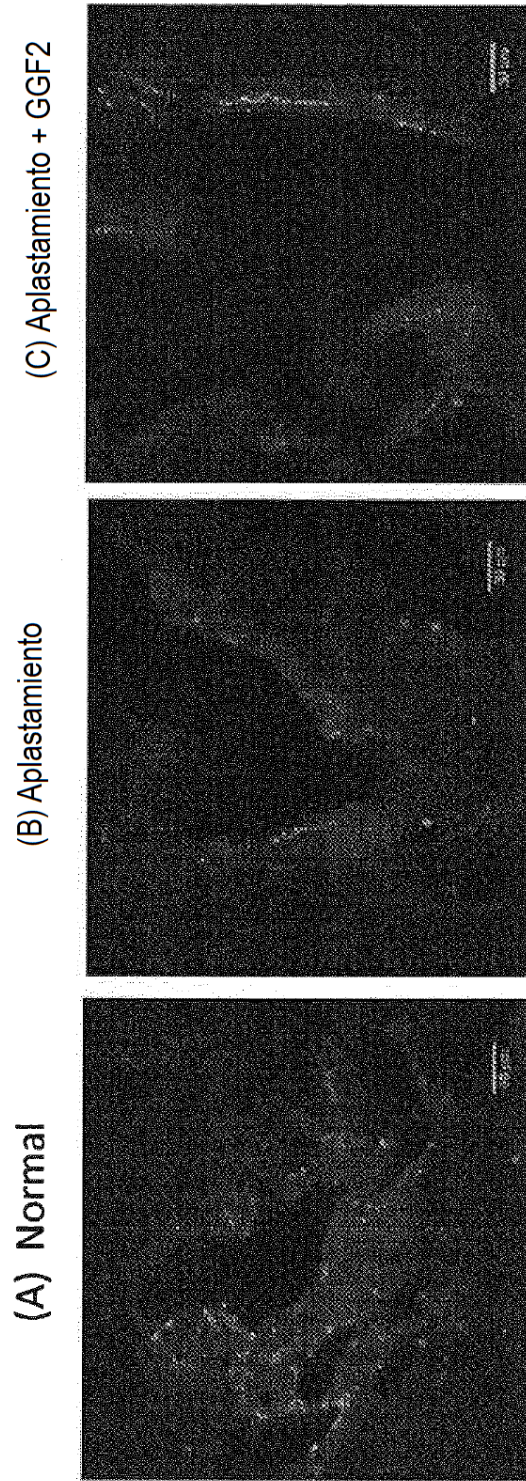


FIG. 7