



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112012008821-1 A2



(22) Data do Depósito: 14/10/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 15/09/2020

(54) Título: USO DE NEUREGULINA PARA TRATAR LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS.

(51) Int. Cl.: A61K 38/18; A61P 25/02.

(30) Prioridade Unionista: 14/10/2009 US 61/251,583; 16/10/2009 US 61/252,161.

(71) Depositante(es): ACORDA THERAPEUTICS, INC..

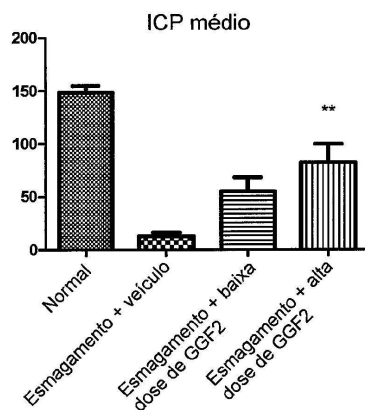
(72) Inventor(es): ANTHONY O. CAGGIANO; ANTHONY J. BELLA; JENNIFER F. IACI.

(86) Pedido PCT: PCT US2010052715 de 14/10/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/047183 de 21/04/2011

(85) Data da Fase Nacional: 13/04/2012

(57) Resumo: USO DE NEUREGULINA PARA TRATAR LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS. A presente invenção refere-se às modalidades da invenção que referem-se ao uso de neuregulinas para prevenir ou tratar lesões nervosas periféricas, atenuar, melhorar ou evitar a perda de função dos nervos periféricos.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**USO DE NEUREGULINA PARA TRATAR LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS**".

Este pedido reivindica prioridade para os Pedidos Provisórios US série número 61/251.583 depositado em 14 de outubro de 2009 e  
5 61/252.161 depositado em 16 de outubro de 2009, ambos aqui incorporados em sua integridade a título de referência.

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um trauma nervoso ou lesão nervosa. Mais particularmente, ao uso de uma neuregulina ou segmentos  
10 funcionais da mesma para prevenir, tratar ou melhorar lesões nervosas periféricas.

Antecedentes da Invenção

Os nervos periféricos geralmente sofrem lesões decorrentes de traumatismos que incluem acidentes de carro, acidentes de moto, cirurgias,  
15 facadas e tiros e lesões ao nascimento que ocorrem tanto na criança quanto na mãe. Os casos cirúrgicos mais comuns de lesão nervosa incluem prostatectomia e mastectomia. Outras lesões comuns durante uma cirurgia são resultado do posicionamento prolongado de um membro ou de compressão nervosa inevitável ou acidental. Subsequente à lesão nervosa ocorre uma  
20 perda de sensibilidade e/ou função nas regiões do corpo enervadas pelo nervo lesionado. Por exemplo, subsequente a uma lesão nervosa decorrente de prostatectomia normalmente ocorre uma disfunção erétil. Subsequente à mastectomia frequentemente ocorre a perda da função própria da extremidade superior e/ou escápula. Além disso, subsequente a uma lesão ao nas-  
25 cimento ou outro trauma com danos ao plexo braquial ocorre uma disfunção no membro ipsilateral.

Qualquer terapia que possa prevenir ou limitar a extensão da disfunção subsequente a uma lesão nervosa teria um impacto significativo nas estratégias terapêuticas atuais para o tratamento de lesões nervosas  
30 periféricas. Fazem-se necessárias terapias e tratamentos adicionais para lesões nervosas periféricas.

Sumário da Invenção

As neuregulinas estão envolvidas como efeitos neuroprotetores e neurorrestauradores em uma variedade de modelos animais de doenças e lesões do sistema nervoso central. No entanto, antes da presente invenção ainda não havia sido confirmado que as neuregulinas são capazes de prevenir e/ou tratar lesões nervosas periféricas. Por conseguinte, certas modalidades da presente invenção referem-se a métodos de tratamento ou melhoria de lesões nervosas periféricas pela administração de neuregulina (por exemplo, GGF2) ou de um segmento funcional da mesma a um indivíduo que tem uma lesão nervosa periférica ou com risco de ter uma lesão nervosa periférica.

A presente invenção demonstra que o tratamento de uma lesão nervosa periférica com neuregulina pode atenuar a perda de função do nervo periférico, melhorar ou atenuar a perda de função do nervo periférico quando dada seja antes ou depois da lesão nervosa, e em alguns casos restaurar a função do nervo periférico. Em certas modalidades, a lesão nervosa periférica é evitada. Em certas modalidades, uma lesão existente no nervo periférico é eliminada. Em certas modalidades, a lesão nervosa periférica não é totalmente evitada. Em certas modalidades, uma lesão existente no nervo periférico não é totalmente eliminada.

O modelo de disfunção erétil em rato é usado como um sistema in vivo para demonstrar a eficácia das neuregulinas no tratamento de lesões nervosas periféricas. Em certos aspectos, a invenção refere-se ao tratamento de disfunção erétil resultante de lesão nervosa periférica, mas a presente invenção não se limita somente à disfunção erétil. A neuregulina pode ser eficaz como uma monoterapia para qualquer lesão nervosa periférica e não requer cotratamento com condutos nervosos naturais ou artificiais ou cotratamento com terapias celulares tais como as células de Schwann.

Certas modalidades referem-se a métodos de tratamento de lesões nervosas periféricas compreendendo administrar uma quantidade eficaz de neuregulina a um indivíduo com uma lesão nervosa periférica ou a um indivíduo com risco de sofrer uma lesão nervosa periférica. Certas modalidades referem-se a métodos de profilaxia ou prevenção de lesões nervosas

periféricas compreendendo administrar uma quantidade eficaz de neuregulina a um indivíduo com risco de sofrer uma lesão nervosa periférica. O termo indivíduo inclui mamíferos, e particularmente seres humanos.

5 Em certas modalidades, a lesão nervosa periférica é resultado de traumatismos que incluem acidentes de carro, acidentes de moto, cirurgias, facadas e tiros, e lesões ao nascimento. Em certas modalidades, uma lesão nervosa periférica é resultado de uma cirurgia, tal como um prostatectomia, uma mastectomia ou similar. No contexto de essencialmente qualquer intervenção cirúrgica, a lesão nervosa periférica pode ser o resultado direto  
10 de dissecação tecidual, ressecção tecidual e/ou secundária ao posicionamento e/ou compressão de um membro. Em uma modalidade particular, a neuregulina é usada para tratar ou prevenir uma lesão nervosa periférica que resultaria em disfunção erétil.

15 Outras modalidades referem-se ao tratamento de disfunção erétil resultante de uma lesão cirúrgica nos nervos periféricos relacionados com a função erétil, tais como o nervo cavernoso e/ou o nervo peniano. Uma lesão no nervo cavernoso frequentemente ocorre como resultado de ressecção de câncer de próstata; esta lesão causa disfunção erétil (ED).

20 As intervenções farmacêuticas atuais tratam a deficiência funcional resultante decorrente de uma lesão aumentando o fluxo sanguíneo para o corpo cavernoso para facilitar a ereção do pênis. Existem atualmente intervenções com dispositivos médicos que tratam a deficiência funcional resultante da lesão aumentando o volume do pênis que leva a um estado análogo à ereção normal do pênis. Todas as intervenções existentes usadas  
25 para tratar ED possuem desvantagens.

A presente invenção protege profundamente os nervos no momento da lesão, e/ou melhora a recuperação do paciente reduzindo a severidade de qualquer deficiência funcional.

30 Um peptídeo de neuregulina 1 (GGF2) foi testado em um modelo de esmagamento bilateral em rato, que é um modelo aceito de lesão no membro cavernoso; este modelo já foi usado para testar o sildenafil e outras drogas para ED. Como descrito neste relatório, o GGF2 melhorou os resul-

tados funcionais quando os nervos foram eletroestimulados 5 semanas depois da lesão e a pressão intercavernosa (ICP) foi medida.

Certas modalidades referem-se ao tratamento com neuregulina de uma lesão nervosa subsequente à mastectomia. Lesão no nervo torácico longo, no nervo intercostobraquial e toracicodorsal é comum durante a mastectomia, embora outros nervos também possam ser lesionados e a neuregulina pode ser usada para prevenir ou tratar tal lesão. A neuregulina pode ser administrada antes e/ou depois da mastectomia para proteger e restaurar a função nervosa. Existem muitas medidas comumente usadas da função dos membros superiores incluindo resistência, sensibilidade, alcance do movimento e reflexos - todas elas ou qualquer uma delas sendo apropriadas para determinar a proteção e a restauração da função nervosa. A presente invenção aplica-se igualmente a qualquer nervo lesionado em qualquer procedimento médico ou cirúrgico.

Outras modalidades incluem o tratamento com neuregulina de uma lesão nervosa subsequente a um traumatismo no plexo braquial. Uma lesão no plexo braquial é um resultado comum de contusões, traumas ao nascimento, acidentes de carro, e lesões desportivas que resultam em deficiências motoras e sensoriais do membro afetado. A neuregulina pode ser administrada a uma pessoa com um plexo braquial para reduzir a lesão e restaurar a função do membro. Em situações que são previstas, tal como um parto, uma composição da invenção pode ser dada profilaticamente. A função dos membros pode ser medida por qualquer uma das várias medidas neurológicas aceitas de função motora, resistência, sensibilidade, alcance do movimento e/ou reflexos.

Certos aspectos incluem a administração de cerca de 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 ou mg de polipeptídeo ou peptídeo de neuregulina com base na atividade da neuregulina particular usada, e no contexto médico observado pelo especialista na técnica. Certos aspectos incluem a administração de neuregulina

antes e/ou depois de uma cirurgia.

Em certos aspectos, a neuregulina pode ser qualquer neuregulina de comprimento integral codificada pelos genes NRG1, 2, 3 ou 4. Em um outro aspecto, a neuregulina pode ser qualquer segmento funcional de um polipeptídeo de neuregulina. Em certas modalidades, o segmento funcional da neuregulina contém um domínio semelhante ao EGF. Em certas modalidades, a neuregulina pode ser qualquer peptídeo dos genes NRG1, 2, 3 ou 4 que se liga a receptores de erbB e ativa os mesmos. Em certas modalidades a neuregulina pode ser qualquer peptídeo modificado de um peptídeo do tipo selvagem codificado pelos genes NRG1, 2, 3 ou 4, de modo que o peptídeo modificado se liga a receptores de erbB e ativa os mesmos.

Neuregulinas e polipeptídeos contendo domínios semelhantes ao EGF de neuregulinas podem ser administrados aos indivíduos com um diluente, veículo ou excipiente farmacologicamente aceitável, em uma forma de dosagem unitária. A prática farmacêutica convencional pode ser empregada para fornecer formulações ou composições adequadas para administrar tais composições aos pacientes ou animais experimentais. Embora a administração intravenosa seja preferida, qualquer via de administração apropriada pode ser empregada, por exemplo, parenteral, subcutânea, intramuscular, intracraniana, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinhal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerossol, oral, ou transdérmica ou administração tópica (por exemplo, aplicando um dispositivo ou um adesivo carregando uma formulação capaz de atravessar a derme e penetrar na corrente sanguínea). As formulações terapêuticas podem estar na forma de soluções ou suspensões líquidas; para administração oral, as formulações podem estar na forma de comprimidos ou cápsulas; e para formulações intranasais, na forma de pós, gotas nasais, ou aerossóis.

Por "neuregulina-1", "NRG-1", "heregulina" entende-se um polipeptídeo que se liga aos receptores de ErbB 1, 3 ou 4, e por pareamento de receptores (dimerização) também ao ErbB2. Em uma modalidade a neuregulina é codificada pelo gene ligando p185erbB2 descrito nas Patentes US 5.530.109, 5.716.930, e 7.037.888, todas aqui incorporadas em sua integri-

dade a título de referência. Em uma modalidade a neuregulina é GGF2 ou qualquer subsequência da mesma, ou qualquer molécula que compreende toda a sequência de GGF2 ou uma parte ativa da mesma.

5 O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" ou "quantidade eficaz" significa a quantidade de neuregulina que produz uma resposta biológica ou médica de um tecido, um sistema, animal ou humano que está procurado pelo pesquisador, veterinário, médico ou outro clínico.

10 Uma alteração terapêutica é uma alteração em uma característica bioquímica ou fisiológica medida em um sentido que alivia a doença ou condição sendo abordada, por exemplo, uma lesão nervosa periférica. Mais particularmente, uma "quantidade eficaz" é uma quantidade suficiente para reduzir os sintomas associados a uma condição médica ou enfermidade, para normalizar as funções do corpo em doenças ou distúrbios que resultam no enfraquecimento de funções corporais específicas, ou para proporcionar  
15 uma melhora em um ou mais dos parâmetros medidos clinicamente de uma doença ou condição.

O uso do termo "ou" nas reivindicações é usado para indicar "e/ou" a menos que explicitamente indicado que ele se refere somente às alternativas ou quando as alternativas são mutuamente excludentes. Também contemplamos que tudo aquilo mencionado usando o termo "ou" também pode ser especificamente excluído das outras opções apresentadas.  
20

Em todo este pedido, o termo "cerca de" é usado para indicar que um valor está dentro de 85%, 90%, 95%> ou do desvio padrão para o dispositivo ou método sendo empregado para determinação do valor.

25 De acordo com a lei de patentes existente, as palavras "um" e "uma", nas reivindicações ou no relatório descritivo, indicam um ou mais, a menos que especificamente indicado.

Em certas modalidades de acordo com a invenção a neuregulina é usada profilaticamente dessa forma prevenindo ou diminuindo uma possível lesão. Em certas modalidades de acordo com a invenção a neuregulina é usada como prognóstico para indicar a futura situação do indivíduo. Em certas modalidades de acordo com a invenção a neuregulina é usada como di-  
30

agnóstica para indicar a presença ou possível presença de uma condição ou estado. Em certas modalidades de acordo com a invenção a neuregulina é usada terapêuticamente para afetar uma condição de alguma maneira que reduza ou elimine um sintoma ou sinal da condição ou doença sendo trata-  
5 da.

Outros objetivos, aspectos e vantagens da presente invenção tornar-se-ão evidentes a partir da descrição detalhada a seguir. Deve ficar entendido, no entanto, que a descrição detalhada e os exemplos específicos, embora indiquem modalidades específicas da invenção, são dados apenas a  
10 título ilustrativo, uma vez que várias alterações e modificações dentro do espírito e escopo da invenção ficarão evidentes para os especialistas na técnica a partir desta descrição detalhada.

#### Breve Descrição dos Desenhos

Os desenhos a seguir fazem parte do presente relatório descrittivo e estão incluídos para demonstrar certos aspectos da presente descrição.  
15 A invenção pode ser melhor entendida fazendo-se referência a um desses desenhos em combinação com a descrição detalhada das modalidades específicas apresentadas neste relatório.

figura 1 : Dados para variação no ICP médio.

20 figura 2: Dados normalizados para pressões aórticas.

figura 3: Marcação representativa com flúor-ouro de gânglios pélvicos maiores (MPG) de 3 animais por grupo de tratamento ((quadro A) normal, (quadro B) com esmagamento, (quadro C) com esmagamento + GGF2). O flúor-ouro injetado no tecido peniano é transportado de volta re-  
25 trogradamente através de nervos intactos para os corpos celulares nos MPG. Quadro A: Animais normais demonstram a quantidade de marcação retrógrada observada na ausência de lesão nervosa. Quadro B: Animais com esmagamento demonstram uma redução drástica nas fibras nervosas intactas da lesão, já que o marcador flúor-ouro não consegue ser transportado de  
30 volta para os MPG. Quadro C: Animais com esmagamento + GGF2 apresentam um número aumentado de células de MPG marcadas com flúor-ouro, indicando que há mais fibras nervosas preservadas presentes depois da le-



são como resultado do tratamento com GGF2.

figura 4: Quantificação da marcação com flúor-ouro no MPG. Os resultados mostraram que animais normais têm um grande número de corpos celulares marcados no MPG. Subsequente a uma lesão por esmagamento o número de células marcadas é drasticamente reduzido, decorrente de lesão da fibra nervosa e da incapacidade resultante de transportar retrogradamente o marcador de volta para o MPG. No entanto, o tratamento com GGF2 aumentou o número de fibras nervosas intactas disponíveis para transportar o flúor-ouro do tecido peniano para o MPG de forma retrógrada, resultando em um maior número de células marcadas.

figura 5: Coloração representativa para os níveis de nNos. O nNOS cavernoso é um marcador bem estabelecido da preservação do nervo cavernoso. Os resultados deste trabalho incluíram a coloração de tecido normal (quadro A). Comparativamente, houve uma perda significativa de coloração com nNOS depois de lesão do nervo cavernoso por esmagamento (quadro B). A coloração com nNOS preservada nos terminais do nervo cavernoso no corpo do pênis demonstrou índices aumentados de sobrevivência dos nervos cavernosos subsequente à lesão por esmagamento com o tratamento com GGF2 (quadro C). A densidade da coloração indica preservação da coloração com nNOS com o tratamento com GGF2.

figura 6: Coloração representativa dos níveis de tirosina hidroxilase (TH). Os resultados nesta figura mostram no quadro A coloração de tecido normal e no quadro B uma perda significativa de coloração com TH depois de lesão do nervo cavernoso por esmagamento. O Quadro C mostra a coloração com TH preservada dos terminais do nervo cavernoso no corpo do pênis; esta descoberta corresponde a uma preservação geral ou restabelecimento da inervação do pênis subsequente à lesão por esmagamento sendo produzido pelo tratamento com GGF2. Portanto, a densidade de coloração indicou preservação da coloração com TH com o tratamento com GGF2.

figura 7: Coloração representativa do transportador de acetilcolina vesicular (VaChT). Os resultados mostram coloração de tecido normal

(quadro A), e uma perda significativa de coloração com VaChT depois de lesão do nervo cavernoso por esmagamento (quadro B). Em contraste, a coloração com VaChT preservada dos terminais do nervo cavernoso no corpo do pênis mostrado no (quadro C) demonstra índices aumentados de sobrevivência dos nervos cavernosos subsequente à lesão por esmagamento com o tratamento com GGF2 (C). A densidade da coloração mostra tendência à preservação da coloração com VaChT com o tratamento com GGF2.

#### Descrição Detalhada da Invenção

Lesão nervosa periférica é o resultado comum de vários eventos, compressão, contusão, operação, esmagamento ou distensão, causada, por exemplo, por trauma, acidente ou cirurgia. Embora os fatores externos que levam à lesão nervosa sejam variados, as manifestações no nível nervoso possuem aspectos em comum (para recapitulação vide, por exemplo, Lee & Wolfe, J Am Acad Orthop Surg, 8(4), pág. 243, 2008). Uma lesão traumática de qualquer etiologia normalmente causa danos na mielinização, no epineuro, no perineuro, no endoneuro e nos axônios. No mais brando dos casos, a lesão se dá principalmente na mielina e no epineuro e depois disso a recuperação completa ocorre espontaneamente dentro de vários dias ou semanas.

Muitas lesões nervosas, no entanto, resultam no rompimento do endoneuro e axônios e resultam no rompimento da função que é não totalmente recuperada ou leva um período de tempo prolongado para se recuperar.

Além disso, com uma lesão nervosa periférica que envolve danos a um axônio, ocorre degeneração local daquele axônio que acontece dentro de horas depois da lesão. Durante os poucos dias seguintes, o corpo celular do neurônio proximal e o axônio passam por um processo conhecido como degeneração de Wallerian. Subsequente à degeneração do axônio, a célula de Schwann produtora de mielina morre deixando detritos e inflamação. A morte da célula de Schwann e a inflamação relacionada exacerbam a lesão nervosa.

Ao contrário do sistema nervoso central, uma quantidade signifi-

cativa de regeneração pode ocorrer nos nervos periféricos. Os axônios crescem ao longo dos canais perineurais e re-energiam alvos distais e as células de Schwann remielinizam os axônios. Embora haja regeneração dos nervos periféricos, infelizmente, este processo não é perfeito; muitos neurônios que  
5 sofrem degeneração nunca regeneram ou nunca encontram seu alvo original, o que resulta em disfunções permanentes. Esta disfunção pode compreender perda da função motora, perda da função sensorial, parastesia, perda de reflexos, rigidez, contraturas ou alcance reduzido do movimento.

Qualquer terapia que consiga limitar a extensão da disfunção  
10 subsequente a uma lesão nervosa terá um impacto significativo nas atuais estratégias terapêuticas para o tratamento de lesões nos nervos periféricos.

Um texto literário demonstra que as neuregulinas aumentam a capacidade dos neurônios de se regenerarem através de condutos artificiais e funcionam como uma terapia adjuntiva com terapias celulares tais como  
15 enxertos de células de Schwann. Antes da presente invenção, não se sabia que as neuregulinas sozinhas poderiam tratar, tal como protegendo e/ou restaurando a função, lesões nos nervos periféricos.

O modelo empregado nestes estudos (modelo de disfunção erétil em ratos) é um modelo padrão, aceito e bastante divulgado de lesão em  
20 nervo periférico. Nesta abordagem específica, o nervo cavernoso é lesionado por compressão com um fórceps. A mesma lesão por compressão ou esmagamento pode ser usada como modelo em qualquer outro nervo periférico. No modelo de lesão no nervo cavernoso a deficiência funcional fica na função erétil. Tendo em vista a patofisiologia comum e consistente de lesões  
25 nervosas traumáticas, tal lesão no nervo cavernoso representa um modelo excelente para lesão induzida por prostatectomia, assim como um modelo genérico para todas as lesões traumáticas em nervos periféricos.

As lesões nervosas periféricas induzem alterações nos corpos celulares dos neurônios sensoriais localizados no gânglio da raiz dorsal  
30 (DRG); estas alterações promovem a sobrevivência e a regeneração axonal. Em condições favoráveis, por exemplo, subsequente a uma lesão por esmagamento, a maioria das fibras nervosas se regeneram com sucesso. No en-

tanto, em muitas circunstâncias clinicamente relevantes, uma lesão nervosa traumática ou induzida por doença tem um desfecho pobre com apenas uma recuperação limitada da função e frequentemente com uma demora considerável. Em tais casos, estados de dor neuropática ou crônica podem se desenvolver.

5 A dor normalmente é associada a uma lesão ou dano no nervo sensorial e resulta na proteção e imobilização da área afetada. Nocicepção (a sinalização neuronal secundária à sensação de dor) é, portanto, concomitante aos mecanismos para uma cicatrização rápida e à promoção de uma  
10 cicatrização rápida, apesar de desencadear uma experiência sensorial e emocional desagradável. No entanto, em muitas situações patológicas, entradas nociceptivas podem resultar em alterações funcionais que são ativamente prejudiciais ao organismo.

Lesão nervosa resulta na alteração de muitas das propriedades  
15 dos neurônios aferentes primários e suas conexões centrais no cordão espinal, levando à alodinia (a percepção de dor a partir de um estímulo normalmente inócuo), hiperalgesia (uma resposta exagerado a qualquer estímulo de dor dado) e uma expansão do campo receptivo (i.e., a área que é "dolorosa" quando um estímulo é aplicado). A maioria das condições de dor  
20 crônica surgem como resultado de lesão causada ao tecido nervoso central ou periférico.

#### Disfunção Erétil

Impotência, ou também chamada de disfunção erétil (ED), é um problema comum que afeta 20 milhões de homens só nos Estados Unidos.  
25 Ereção peniana é um fenômeno neurovascular que depende tanto da integridade neural quanto dos vasos sanguíneos funcionais. Com um estímulo sexual, neurotransmissores (especialmente óxido nítrico) são liberados dos terminais dos nervos cavernosos e das células endoteliais. O relaxamento resultante dos músculos lisos arterial e arteriolar aumenta o fluxo arterial. O  
30 sangue que fica preso no corpo cavernoso leva o pênis a um estado ereto.

Lesão no nervo cavernoso resultante de cirurgias pélvicas radicais, tais como câncer de próstata, de bexiga ou retal, é uma das causas

mais comuns de ED iatrogênica neste país. A ED é uma fonte importante de morbidez após prostatectomia radical. Por exemplo, apesar da introdução de técnicas cirúrgicas poupadoras dos nervos, os índices de potência pós-operatória variam entre 30% e 80% para homens que passaram por procedimentos bilaterais que poupam os nervos cavernosos para retirada de câncer de próstata confinado ao órgão (Wang, J Sex Med, 4: 1085-97, 2007).

Várias estratégias neuromoduladoras já foram investigadas até hoje; no entanto, não existem tratamentos disponíveis para neuroproteção dos nervos cavernosos antes da lesão ou no momento da lesão, nem tratamentos após a lesão para provocar a regeneração do nervo (Michl et al., J Urol 176:227-31, 2006; Burnett & Lue, J Urol 176:882-7, 2006). Apesar das modernas modificações poupadoras dos nervos introduzidas na terapia cirúrgica e na terapia radioativa para malignidades pélvicas continuam sendo necessários novos meios para preservar e restaurar a função erétil após o tratamento.

São vistos padrões bem definidos de alterações celulares distais do sítio da lesão, progredindo de degeneração axonal e degeneração da bainha de mielina, invasão de macrófagos, fagocitose, e desdiferenciação das células de Schwann para a formação de feixes de Bungner. Estas alterações modificam o ambiente do nervo lesionado e seu potencial de regeneração dos axônios. A sobrevivência neuronal é facilitada por fatores tróficos quando os axônios passam de um modo 'transmissor' para um modo de crescimento, expressando proteínas (GAP-43, tubulina, actina), novos neuropeptídeos, e citocinas. Novas estratégias que aumentem o potencial de crescimento fazem-se necessárias uma vez que o suporte do coto do nervo distal e a capacidade neuronal de regeneração não são indefinidos (Fu & Gordon, Mol Neurobiol. 14: 67-116, 1997).

#### Neuregulinas

Por "neuregulina", "neuregulina-1", "NRG-1", "heregulina" entende-se um polipeptídeo que se liga aos receptores de ErbB1, ErbB 3 ou ErbB 4 e por pareamento (dimerização) ao receptor de ErbB2. Por exemplo, a neuregulina pode ser codificada pelo gene ligando pl85erbB2 descrito nas

Patentes US 5.530.109, 5.716.930, e 7.037.888, todas aqui incorporadas em sua integridade a título de referência; a neuregulina também pode ser codificada pelos genes NRG-2, 3 e 4. A neuregulina pode ser GGF2 ou qualquer fragmento ativo da mesma; ela também pode ser uma variante conservativa de GGF2, ou uma molécula que compreende GGF2. Em alguns casos na literatura, o termo "neuregulina" indica apenas um domínio semelhante ao EGF de uma molécula completa de neuregulina; esta também é conhecida como uma proteína, peptídeo ou polipeptídeo "semelhante à neuregulina".

Por proteína, peptídeo ou polipeptídeo "semelhante à neuregulina" entende-se um polipeptídeo que possui um domínio semelhante ao EGF codificado por um gene de neuregulina. Em uma modalidade, uma proteína, peptídeo ou polipeptídeo "semelhante à neuregulina" produz um efeito terapêutico em um indivíduo tendo uma lesão nervosa periférica ou em um indivíduo com risco de sofrer uma lesão nervosa periférica (por exemplo, pacientes programados para cirurgia ou parto onde existe o risco de se sofrer uma lesão nervosa periférica relacionada).

A sequência aminoacídica de GGF2 (com uma região compreendendo seu domínio semelhante ao EGF estando sublinhada) é:

MRWRRAPRSGRPGPRAQRPGSAARSSPPLPLLPLLLLGTAAALAPGAAAG  
 20 NEAAPAGASVCYSSPPSVGSVQELAQRAAVVIEGKVHPQRRQQGALDRKA  
 AAAAGEAGAWGGDREPPAAGPRALGPPAEEPLLAANGTVPSWPTAPVPS  
 AGEPGEEAPYLVKVHQVWAVKAGGLKKDSSLTVRLGTWGHPAFPSCGRL  
 KEDSRYIFFMEPDANSTSRAPAAFRASFPPLETGRNLKEVSRVLCKRCALP  
 PQLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSLRFKWFKNELNRKKPQNIQ  
 25 KKPGKSELRINKASLADSGEYMCKVISKLGNDSASANITIVESNATSTSTTGT  
SHLVKCAEKETFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCCPNEFTGDRCQNYVMA  
SFYSTSTPFLSLPE (SEQ ID N°: 1) (número de acesso GenBank A-  
 AB59622, que está aqui incorporado a título de referência). Em certos aspectos da invenção, um polipeptídeo de neuregulina ou um segmento do  
 30 mesmo é 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou 100% idêntico ou homólogo à sequência aminoacídica de GGF2. Em certos aspectos da invenção, um polipeptídeo semelhante à neuregulina é 75, 80, 85, 86, 97, 88,

89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou 100% idêntico ou homólogo à sequência aminoacídica do domínio semelhante ao EGF de GGF2.

Conforme usado neste relatório, uma "proteína" ou "polipeptídeo" refere-se a uma molécula compreendendo pelo menos dez resíduos amino-  
5 acídicos. Em certas modalidades, a proteína compreende todo o polipeptídeo GGF2 ou parte do mesmo. Em algumas modalidades, uma versão do tipo selvagem de uma proteína ou polipeptídeo é empregada, no entanto, em algumas modalidades da invenção, uma proteína ou polipeptídeo modificado para tratar lesões nervosas periféricas. Os termos "peptídeo", "proteína" ou  
10 "polipeptídeo" são usados intercambiavelmente. A título de conveniência, o termo peptídeo é usado neste relatório para indicar sequências aminoacídicas de qualquer comprimento.

Um "peptídeo modificado" refere-se a um peptídeo cuja estrutura química, particularmente sua sequência aminoacídica, é alterada em relação  
15 ao respectivo peptídeo do tipo selvagem. Em algumas modalidades, um peptídeo modificado tem pelo menos um aminoácido modificado. Em algumas modalidades, um peptídeo modificado tem pelo menos um d-aminoácido. Em algumas modalidades, um peptídeo modificado tem pelo menos um aminoácido de ocorrência não natural.

20 Sem qualquer limitação, em certas modalidades o tamanho de um peptídeo (do tipo selvagem ou modificado) pode compreender qualquer um de (ou qualquer faixa derivável 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,  
25 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 aminoacídicas ou mais, e qualquer faixa derivável dentro desses valores, de uma sequência aminoacídica correspondente ou mencionada neste relatório; em  
30 uma modalidade, tal proteína, polipeptídeo ou faixa de tamanho é relativa à GGF2. Contempla-se que os polipeptídeos podem ser mutados por trunca-

mento amino terminal ou carbóxi terminal, deixando os mesmos mais curtos que sua forma correspondente do tipo selvagem, mas eles também podem ser alterados por fusão ou conjugação de uma sequência proteica heteróloga com uma função particular (por exemplo, para orientação ou localização, com fins de purificação, etc.).

Conforme usado neste relatório, uma "molécula aminoacídica" refere-se a qualquer aminoácido, derivado de aminoácido, ou mimético de aminoácido conhecido na literatura. Em certas modalidades, os resíduos da molécula peptídica são sequenciais, sem moléculas não-aminoacídicas interrompendo as sequências de resíduos de moléculas aminoacídicas. Em outras modalidades, a sequência pode compreender uma ou mais porções de moléculas não-aminoacídicas. Em modalidades particulares, a sequência dos resíduos da molécula peptídica pode ser interrompida por uma ou mais porções de moléculas não-aminoacídicas.

Por conseguinte, o termo composição "peptídica" compreende sequências aminoacídicas; esses aminoácidos podem ser qualquer um dos aminoácidos comuns nas proteínas sintetizadas naturalmente ou qualquer aminoácido modificado ou incomum.

Composições peptídicas podem ser feitas por qualquer técnica conhecida pelos especialistas na técnica, incluindo (i) a expressão de peptídeos através de técnicas tradicionais da biologia molecular, (ii) o isolamento de compostos peptídicos a partir de fontes naturais, ou (iii) síntese química. As sequências nucleotídicas assim como as sequências peptídicas para certos genes da neuregulina já foram divulgadas, e podem ser encontradas nos bancos de dados informatizados conhecidos. Um desses bancos de dados é o National Center for Biotechnology Information's Genbank and GenPept databases (na Internet no site [ncbi.nlm.nih.gov/](http://ncbi.nlm.nih.gov/)). As regiões codificadoras para esses genes podem ser amplificada e/ou expressa usando-se as técnicas divulgadas neste relatório ou técnicas já conhecidas pelos especialistas na técnica.

Peptídeos modificados podem incluir variantes substitucionais, insercionais, ou delecionais. As variantes delecionais tipicamente não pos-



suem um ou mais resíduos da molécula nativa ou da molécula do tipo selvagem. Resíduos individuais podem ser deletados ou vários aminoácidos adjacentes podem ser deletados. Um códon de interrupção pode ser introduzido (por substituição ou inserção) em uma sequência de ácidos nucleicos codificadora para gerar uma proteína truncada. Mutantes insercionais tipicamente envolvem a adição de material em um ponto não-terminal no peptídeo. Esta pode incluir a inserção de um ou mais resíduos. Adições terminais, geralmente chamadas de proteínas de fusão ou peptídeos de fusão, também podem ser gerados. Variantes substitucionais tipicamente contêm a troca de um aminoácido por outro em um ou mais sítios no peptídeo, e podem ser desenhadas para modular uma ou mais propriedades do peptídeo, com ou sem a perda de outras funções ou propriedades, tais como ligação e ativação de receptores de neuregulina. As substituições podem ser conservativas, isto é, um aminoácido é substituído por outro de forma e carga semelhantes. Alternativamente, as substituições podem ser não-conservativas de modo que uma função ou atividade do peptídeo pode ser afetada. As alterações não-conservativas tipicamente envolvem a substituição de um resíduo por outro que seja quimicamente diferente, tal como um aminoácido polar ou carregado por um aminoácido não polar ou não carregado, e vice-versa.

As "substituições conservativas" são bastante conhecidas na literatura e incluem, sem limitação, por exemplo, as trocas de: alanina por serina; arginina por lisina; asparagina por glutamina ou histidina; aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparagina; glutamato por aspartato; glicina por prolina; histidina por asparagina ou glutamina; isoleucina por leucina ou valina; leucina por valina ou isoleucina; lisina por arginina; metionina por leucina ou isoleucina; fenilalanina por tirosina ou leucina ou metionina; serina por treonina; treonina por serina; triptofano por tirosina; tirosina por triptofano ou fenilalanina; e valina por isoleucina ou leucina.

Também deve ficar entendido que as sequências aminoacídicas e as sequências de ácidos nucleicos podem incluir resíduos adicionais, tais como aminoácidos N- ou C-terminais adicionais, ou sequências 5' ou 3', respectivamente, contanto que a sequência satisfaça os critérios funcionais es-

tabelecidos nesta invenção tais como manutenção da atividade biológica. A adição de sequências terminais aplica-se particularmente a sequências de ácidos nucleicos que podem, por exemplo, incluir várias sequências não-codificadoras flanqueando qualquer uma das porções 5' ou 3' da região codificadora.

#### Formulações Farmacêuticas

As formulações farmacêuticas da presente invenção compreendem uma quantidade eficaz de um peptídeo dissolvido ou dispersado em um veículo farmacêuticamente aceitável. As expressões "farmacêuticamente aceitável ou farmacologicamente aceitável" referem-se a composições que geralmente não produzem qualquer reação adversa, alérgica ou inconveniente quando administrada a um indivíduo, por exemplo, um ser humano, conforme apropriado. A preparação dessas composições farmacêuticas é conhecida pelos especialistas na técnica à luz da presente descrição, conforme exemplificado por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, aqui incorporado a título de referência. Além disso, para fins de administração a seres humanos, fica entendido que as preparações devem atender os padrões de esterilidade, pirogenicidade, segurança geral e pureza exigidos, por exemplo, pelo USFDA Office of Biological Standards.

Além disso, conforme usado neste relatório "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui substâncias tais como solventes, meios de dispersão, revestimentos, tensoativos, antioxidantes, preservativos (por exemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotônicos, agentes retardadores da absorção, sais, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármacos, géis, aglutinantes, excipientes, agentes desintegrantes, lubrificantes, agentes adoçantes, agentes flavorizantes, corantes, substâncias semelhantes e combinações dos mesmos, conhecidos pelo especialista na técnica à luz da presente descrição. Exceto quando um veículo convencional é incompatível com um princípio ativo, seu uso nas composições terapêuticas ou farmacêuticas é contemplado.

Os fármacos da presente invenção podem compreender diferen-

tes tipos de veículos dependendo do fato de eles serem administrados na forma sólida, líquida ou aerossol, e da necessidades de eles serem estéreis para vias de administração tais como por injeção. A presente invenção pode ser administrada por via intravenosa, intradérmica, intra-arterial, intraperitoneal, intralesional, intracraniana, intra-articular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarretal, intratumoral, intramuscular, subcutânea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericardial, intraumbilical, intraocularal, oral, tópica, local, por inalação (por exemplo, aerossol). Além disso, a presente invenção pode ser administrada por injeção, infusão, infusão contínua, perfusão localizada banhando as células alvo diretamente, via um cateter, via uma lavagem, ou por qualquer outro método ou qualquer combinação dos métodos acima conhecida pelo especialista na técnica.

A quantidade de dosagem efetiva de uma composição da presente invenção administrada a um indivíduo pode ser determinada por fatores físicos e fisiológicos tais como peso corporal, severidade da condição, o tipo de doença sendo tratada, intervenções terapêuticas anteriores ou concorrentes, idiopatia do paciente e da via de administração. O profissional responsável pela administração vai, em todos os casos, determinar a concentração dos princípios ativos em uma composição e as doses apropriadas para um indivíduo específico.

Em certas modalidades, as composições farmacêuticas podem compreender, por exemplo, pelo menos cerca de 0,1% de composto ativo. Em outras modalidades, o composto ativo pode representar entre cerca de 2% a cerca de 75% do peso da unidade, ou entre cerca de 25% a cerca de 60%, por exemplo, e qualquer faixa derivável destas. Em outros exemplos não limitativos, uma dose também pode compreender de cerca de 1 micrograma/kg/peso corporal, cerca de 5 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 10 microgramas/kg de peso corporal, cerca de 50 microgramas/kg de peso corporal, cerca de 100 microgramas/kg de peso corporal, cerca de 200 microgramas/kg de peso corporal, cerca de 350 microgramas/kg de peso corporal, cerca de 500 microgramas/kg de peso corporal, cerca de 1 miligrama

ma/kg de peso corporal, cerca de 5 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 10 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 50 miligramas kg de peso corporal, cerca de 100 miligramas kg de peso corporal, cerca de 200 miligramas kg de peso corporal, cerca de 350 miligramas kg de peso corporal, cerca de 500 miligramas kg de peso corporal, a cerca de 1000 mg/kg de peso corporal ou mais por administração, e qualquer faixa derivável destas. Em exemplos não limitativos de uma faixa derivável dos números relacionados neste relatório, uma faixa de cerca de 5 mg/kg/peso corporal a cerca de 100 mg/kg/peso corporal, cerca de 5 microgramas/kg/peso corporal a cerca de 500 miligramas/kg/peso corporal, etc., pode ser administrada, com base nos números descritos acima.

Em qualquer caso, a composição pode compreender vários antioxidantes para retardar a oxidação de um ou mais componentes. Adicionalmente, a prevenção da ação de micro-organismos pode ser efetuada por preservativos tais como vários agentes antibacterianos e antifúngicos, incluindo, porém sem limitação, parabenos (por exemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal ou combinações dos mesmos.

Os fármacos podem ser formulados como uma composição na forma de uma base livre, na forma neutra ou na forma de um sal. Sais farmacologicamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido, por exemplo, aqueles formados com grupos amino livres de uma composição peptídica, ou aqueles que são formados com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, ácido clorídrico ou ácido fosfórico, ou com ácidos orgânicos tais como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico ou ácido mandélico. Os sais formados com os grupos carboxila livres também podem ser derivados de bases inorgânicas tais como, por exemplo, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônio, hidróxido de cálcio ou hidróxido férrico; ou com bases orgânicas tais como isopropilamina, trimetilamina, histidina ou procaína.

Nas modalidades em que a composição está em uma forma líquida, o veículo pode ser um solvente ou um meio de dispersão compreen-

dendo, porém sem limitação, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido, etc.), lipídios (por exemplo, triglicérides, óleos vegetais, lipossomas) e combinações dos mesmos. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, tal como lecitina; pela manutenção do tamanho de partícula requerido por dispersão em veículos tais como, por exemplo, poliol líquido ou lipídios; pelo uso de tensoativos tais como, por exemplo, hidroxipropilcelulose; ou combinações destes métodos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, tais como, por exemplo, açúcares, cloreto de sódio ou combinações dos mesmos.

Em certas modalidades, as composições são preparadas para administração por vias tais como ingestão oral. Nessas modalidades, a composição sólida pode compreender, por exemplo, soluções, suspensões, emulsões, comprimidos, pílulas, cápsulas (por exemplo, cápsulas de gelatina dura ou mole envernizada), formulações de liberação sistemática, composições bucais, trociscos, elixires, suspensões, xaropes, wafers, ou combinações dos mesmos. As composições orais podem ser incorporadas diretamente no alimento da dieta. Veículos preferidos para administração oral compreendem diluentes inertes, veículos comestíveis assimiláveis ou combinações dos mesmos. Em outros aspectos da invenção, a composição oral pode ser preparada como um xarope ou um elixir. Um xarope ou elixir, e pode compreender, por exemplo, pelo menos um agente ativo, um agente adoçante, um conservante, um agente flavorizante, um corante, um conservante, ou combinações dos mesmos.

Em certas modalidades preferidas, uma composição oral pode compreender um ou mais aglutinantes, excipientes, agentes desintegrantes, lubrificantes, agentes flavorizantes, e combinações dos mesmos. Em certas modalidades, a composição pode compreender um ou mais dos seguintes componentes: um aglutinante, tal como, por exemplo, goma tragacanto, acácia, amido de milho, gelatina ou combinações dos mesmos; um excipiente, tal como, por exemplo, fosfato dicálcico, manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio ou combi-

nações dos mesmos; um agente desintegrante, tal como, por exemplo, amido de milho, amido de batata, ácido algínico ou combinações dos mesmos; um lubrificante, tal como, por exemplo, estearato de magnésio; um agente adoçante, tal como, por exemplo, sacarose, lactose, sacarina ou combinações dos mesmos; um agente flavorizante, tal como, por exemplo, hortelã-pimenta, óleo de gualtéria, sabor cereja, sabor laranja, etc.; ou combinações dos componentes precedentes. Quando a forma unitária de dosagem é uma cápsula, ela pode conter, além das substâncias do tipo acima, veículos tal como um veículo líquido. Várias outras substâncias podem estar presentes como revestimentos ou para modificar a forma física da unidade de dosagem. Por exemplo, comprimidos, pílulas, ou cápsulas podem ser revestidos com goma-laca, açúcar ou ambos.

Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas por incorporação dos compostos ativos da invenção na quantidade necessitada no solvente apropriado opcionalmente com vários dos outros componentes enumerados acima, conforme necessário, seguida por esterilização filtrada. Geralmente, as dispersões são preparadas por incorporação dos vários princípios ativos esterilizados em um veículo estéril que contém o meio de dispersão básico e/ou os outros componentes. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções, suspensões ou emulsões injetáveis estéreis, os métodos de preparação preferidos são técnicas de secagem a vácuo ou de secagem por congelamento que resultam em um pó do princípio ativo mais qualquer componente desejado adicional proveniente de um meio líquido previamente filtrado estéril do mesmo. O meio líquido deve ser tamponado de forma apropriada se necessário e o diluente líquido deve ser primeiro deixado isotônico antes de injeção com solução salina ou glicose suficiente. Também é contemplada a preparação de composições altamente concentradas para injeção direta, onde é considerado o uso de DMSO como solvente para resultar em penetração extremamente rápida, distribuindo grandes concentrações dos agentes ativos para uma área pequena.

De preferência, uma composição da invenção é estável em condições normais de produção e armazenamento, e preservada contra a ação

contaminante de micro-organismos, tais como bactérias e fungos. Será apreciado que a contaminação por endotoxinas deve ser mantida no mínimo em um nível seguro, por exemplo, inferior a 0,5 ng/mg de proteína.

5 Em modalidades particulares, a absorção prolongada de uma composição injetável pode ser feita por composições da invenção que compreendem agentes que retardam a absorção, tal como, por exemplo, monoestearato de alumínio, gelatina ou combinações dos mesmos.

### EXEMPLOS

#### Exemplo 1: Modelo de lesão do nervo cavernoso em rato

10 O modelo de lesão do nervo cavernoso em rato usa tipicamente a seguinte metodologia. Os ratos são anestesiados com isoflurano. Os animais são colocados sobre uma almofada térmica para manter a temperatura do corpo em 37°C. O abdômen é depilado e esfregado com uma solução antisséptica de clinidina (povidona-iodo). É feita uma incisão inferior na linha  
15 média abdominal da cavidade peritoneal, expondo os nervos cavernosos e os gânglios pélvicos maiores (MPGs). A lesão do nervo cavernoso é induzida por esmagamento do nervo cavernoso com um hemostato por dois minutos por lado. Nos estudos referentes à neuregulina, dois grupos foram tratados com neuregulina durante 48 horas antes da lesão.

20 O modelo de esmagamento em rato proporciona uma redução simples, reproduzível e extremamente confiável da função erétil. Esta técnica é bastante usada e já foram publicados diversos estudos utilizando esta técnica. Não é necessário testar a função erétil depois da lesão por esmagamento, a função erétil reduzida é previsível, e tipicamente, um teste funcional é realizada cerca de 5 semanas após a lesão por esmagamento.  
25

Depois de causada a lesão no nervo cavernoso, a cavidade abdominal é fechada em duas camadas com reaproximação dos músculos abdominais e fascias (sutura absorvível) via 2-3 suturas interrompidas. A pele é fechada usando uma sutura subcuticular (oculta) para a pele com um material de sutura não trançado (PDS ou revestido com vicrila). Buprenorfina analgésica foi dada preventivamente (10 minutos antes de terminar o procedimento) e a cada 6-12 horas por 48 horas durante o pós-operatório para  
30

controlar a dor.

Cerca de 5 semanas depois da cirurgia, os ratos foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg IP) e xilazina (5 mg/kg). Os pilares cavernosos são expostos pela mesma incisão e estudos funcionais foram realizados usando uma agulha 23 G inserida no pilar esquerdo e conectada a um programa de software especificamente criado para medir pressões intracavernosas. Antes da medição, os nervos cavernosos são estimulados com um eletrodo a 1,4 mA. A duração do procedimento de medição é de 15 minutos. Os ratos foram sacrificados por eutanásia com eutanil intercardíaco antes de se recuperarem da anestesia e os tecidos (nervos cavernosos, MPG, pênis, próstata) foram coletados para serem analisados por microscopia ótica e para análises molecular e histológica.

Como apresentado nos dados das pressões intracavernosas (ICP) mostrados na figura 1, a eletroestimulação dos nervos cavernosos 5 semanas após a lesão demonstrou preservação significativa do nervo e da função no órgão terminal nos dois grupos tratados com neuregulina e isto foi ainda mais significativo com doses mais altas. Os dados foram primeiro analisados por medidas ANOVA não repetidas com o teste t de Bonferroni e a significância foi considerada a  $p < 0,05$ . Todos os resultados estão expressos como a média  $\pm$  SEM. As alterações também foram significativamente melhoradas quando normalizadas para pressões aórticas, como mostrado na figura 2.

Do ponto de vista histológico, os dados indicam que o tratamento com NRG aumentou o número de fibras nervosas intactas com base na marcação com flúor-ouro transportada retrogradamente no MPG, e preservação aumentada do óxido nítrico sintase neuronal e do VaChT de tecidos nervosos e de tecidos do músculo liso do pênis. Isto indica que existe um mecanismo de ação neuroprotetor e/ou neuroregenerativo. A apoptose do músculo liso também é diminuída em relação aos animais com lesão por esmagamento que não receberam neuregulina.

#### Exemplo 2: Métodos histológicos de flúor-ouro

Para realizar este protocolo, foi feita uma injeção intracorporal de



flúor-ouro a 4%, e em uma semana, tecidos dos gânglios pélvicos maiores (MPG) foram coletados e fixados em paraformaldeído a 4%, tampão fosfato 0,1 M, fixados por uma noite e então colocados em sacarose a 20%. O criosseccionamento foi a 20  $\mu$ m de espessura. As imagens foram feitas usando uma câmera e um sistema de imagem Infinity, seguidas por análises cegas da contagem de células melhoradas pelo flúor-ouro. Em seguida, lâminas com espécimes de MPG foram aleatoriamente selecionadas (10 per animal) e foi efetuada contagem de células para determinar o número de neurônios intactos. (Vide, por exemplo, Dail, W. G., Trujillo, D., de la Rosa, D. & 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.)

Portanto, este foi um protocolo de traçamento retrógrado usando flúor-ouro. Os resultados deste protocolo ofereceram informações indicando que o tratamento com neuregulina ajudou na regeneração e reprojeção para seu alvo (os corpos cavernosos do pênis) e/ou neuroproteção dos nervos cavernosos.

Por conseguinte, flúor-ouro foi injetado em um órgão alvo, neste caso os corpos do pênis. Em seguida, ocorreu absorção dos terminais nervosos no órgão terminal. Esta absorção indicou que as fibras nervosas foram preservadas e/ou voltaram a crescer na área injetada. Desde que haja absorção de flúor-ouro, o flúor-ouro é transportado de forma retrógrada no axônio nervoso e o marcador fica acumulado nos neurônios original do MPG (gânglio pélvico maior).

A figura 3 mostra uma marcação representativa com flúor-ouro de gânglios pélvicos maiores (MPG) de 3 animais por grupo de tratamento ((quadro A) normal, (quadro B) com esmagamento, (quadro C) com esmagamento + GGF2). Animais normais (Quadro A) demonstram a quantidade de marcação retrógrada observada na ausência de lesão nervosa. Animais

com esmagamento (Quadro B) demonstram uma redução drástica nas fibras nervosas intactas da lesão, já que o marcador flúor-ouro não consegue ser transportado de volta para os MPG. Animais com esmagamento + GGF2 (Quadro C) apresentam um número aumentado de células de MPG marca-  
 5 das com flúor-ouro, indicando que há mais fibras nervosas preservadas presentes depois da lesão como resultado do tratamento com GGF2.

A figura 4 oferece uma quantificação da marcação com flúor-ouro no MPG. Os animais normais têm um grande número de corpos celulares marcados no MPG. Subsequente a uma lesão por esmagamento o nú-  
 10 mero de células marcadas é drasticamente reduzido, decorrente de lesão da fibra nervosa e da incapacidade resultante de transportar retrogradamente o marcador de volta para o MPG. O tratamento com GGF2 aumentou o número de fibras nervosas intactas disponíveis para transportar o flúor-ouro do tecido peniano para o MPG de forma retrógrada, resultando em um maior  
 15 número de células marcadas.

### Exemplo 3: Imuno-histoquímica

Crioseções longitudinais da porção proximal do corpo do pênis foram coloridas para verificação de nNos, VaChT. Todas as lavagens foram feitas com tampão Tris contendo 1% de triton-X. O tecido foi bloqueado por 1  
 20 hora com 5% de soro de cabra normal e em seguida incubado por uma noite a 5°C, respectivamente, com:

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

Depois de vários enxagues, as seções foram incubadas por 1  
 25 hora em HRP de cabra antiovelho e asno anticabra (1/1000) e em seguida em uma solução de DAB contendo 0,2% de sulfato misto de amônio e níquel e 0,03% de peróxido de hidrogênio por 10 minutos. Depois da última lavagem, as seções foram desidratadas, purificadas em xileno e colocadas sobre  
 30 lamínulas em Permout (Fisher Scientific).

### Coloração com nNos:

O óxido nítrico (NO) liberado das placas terminais axonais dos

nervos cavernosos no corpo cavernoso, junto com o NO endotelial, provoca o relaxamento do músculo liso, dando início às alterações hemodinâmicas da ereção peniana assim como contribuindo para uma tumescência mantida. Sabe-se atualmente que um retorno à potência subsequente a uma lesão nos nervos cavernosos depende, pelo menos em parte, da regeneração axonal nos tecidos neurais remanescentes e do sucesso da re-enervação funcional do órgão terminal (possibilitando a ativação de NO neuronal). Alterações patobiológicas bem definidas são observados em estudos do pênis subsequente ao comprometimento do nervo cavernoso em modelos animais.

5 Estas alterações patobiológicas podem variar de neuropraxia a dano axonal letal, e podem incluir apoptose do músculo liso, apoptose do endotélio, densidade reduzida do óxido nítrico sintase (NOS) no nervo, suprarregulação de citocinas fibroproliferativas tais como fator-beta de transformação de crescimento (TGF- $\beta$ ), fibrose ou perda de músculo liso, ou respostas sinalizadoras patobiológicas tais como proteína hedgehog sônica alterada.

10

15

Adicionalmente, acredita-se que a ausência crônica de ereção secundária à neuropraxia do nervo cavernoso

Durante a fase de recuperação prolongada exacerba o potencial para nova deterioração estrutural do músculo liso cavernoso devido a uma falha da ciclização cavernosa normal entre os estados flácido e ereto (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.

20

A nNOS cavernosa é um marcador bem estabelecido da preservação do nervo cavernoso. (Vide, por exemplo, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-410X.2010.09364.x/full>). Os resultados deste protocolo indicaram um efeito neuroprotetor e/ou neuroregenerativo subsequente a uma lesão bilateral do nervo cavernoso no rato produzida de acordo com o protocolo do Exemplo 1.

25

A densidade dos resultados da coloração (seções corporais proximais representativas, 5 lâminas selecionadas aleatoriamente, observador cego - baseado em 5 animais por grupo) indicou preservação da coloração

30

com nNOS nos indivíduos tratados com neuregulina.

A figura 5 mostra uma coloração representativa para os níveis de nNos. A densidade da coloração indica a presença de nNOS. Os resultados deste trabalho incluíram a coloração de tecido normal (quadro A). Comparativamente, houve uma perda significativa de coloração com nNOS depois de lesão do nervo cavernoso por esmagamento (quadro B). A coloração com nNOS preservada nos terminais do nervo cavernoso no corpo do pênis demonstrou índices aumentados de sobrevivência e/ou regeneração dos nervos cavernosos subsequente à lesão por esmagamento com o tratamento com GGF2 (quadro C). A densidade da coloração indica preservação da coloração com nNOS com o tratamento com GGF2.

#### Coloração com o transportador de acetilcolina vesicular (VaChT):

Os neurônios do gânglio pélvico que enervam o pênis expressam nNOS e marcadores colinérgicos, ao passo que a enervação noradrenergica simpática do pênis aparece abundantemente via a cadeia simpática e não atravessa os nervos penianos ou o gânglio pélvico. Os resultados deste protocolo forneceram informações indicando que o tratamento com neuregulina ajudou na regeneração e reprojeção para seu alvo (o corpo cavernoso do pênis) e/ou na neuroproteção dos nervos cavernosos com base na coloração intracorporal para o transportador de acetilcolina vesicular (VaChT). Embora a principal etiologia da ED pós-cirúrgica seja neurogênica, estudos em roedores revelaram quantidade alterações morfológicas e funcionais também ocorrem no tecido cavernoso depois de uma lesão nervosa no pênis. (Vide, por exemplo, 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).

A densidade dos resultados da coloração (seções corporais proximais representativas, 5 lâminas selecionadas aleatoriamente, observador cego - baseado em 5 animais por grupo) indicou preservação da coloração

com VaChT nos ratos que receberam o GGF2.

A figura 7 mostra uma coloração imuno-histoquímica representativa do transportador de acetilcolina vesicular (VaChT). A densidade da coloração indica a presença de VaChT. Os resultados incluem coloração de tecido normal (quadro A), e uma perda significativa de coloração com VaChT 5 depois de lesão do nervo cavernoso por esmagamento (quadro B). Em contraste, a coloração com VaChT preservada dos terminais do nervo cavernoso no corpo do pênis mostrado no Quadro C demonstrou índices aumentados de sobrevivência e/ou regeneração dos nervos cavernosos subsequente 10 à lesão por esmagamento tratada com o tratamento com GGF2 (quadro C). A densidade da coloração indica preservação da coloração com VaChT com o tratamento com GGF2.

#### Coloração com TH:

TH é um marcador de fibras nervosas adrenérgicas e é usado 15 para suportar a preservação dos nervos no corpo do pênis. A porção proximal do corpo foi crio-seccionada longitudinalmente e colorida com anticorpos primários produzidos contra o marcador da síntese de catecolamine, tirosina hidroxilase (Impaired Cavernous Reinnervation after Penile Nerve Injury in Rats with Features of the Metabolic Syndrome Matthew R. Nangle, 20 BSc, PhD, Joseph Proietto, MBBS, PhD,† & Janet R. Keast, BSc, PhD J Sex Med 2009;6:3032-3044).

A densidade dos resultados da coloração indica a presença de TH. A densidade dos resultados da coloração efetivamente obtida (seções corporais proximais representativas, 5 lâminas selecionadas aleatoriamente, 25 observador cego - baseado em 5 animais por grupo) indicou preservação da coloração com TH nos animais tratados com GGF2. A figura 6 mostra uma coloração representativa dos níveis de tirosina hidroxilase (TH). Os resultados incluem coloração de tecido normal (quadro A), e uma perda significativa de coloração com TH depois de lesão do nervo cavernoso por esmagamento 30 (quadro B). O Quadro C mostra a coloração com TH preservada dos terminais do nervo cavernoso no corpo do pênis que melhor corresponde a um aumento geral na preservação da enervação do pênis subsequente à lesão

por esmagamento com o tratamento com GGF2 (quadro C). A densidade de coloração mostra tendências à preservação da coloração com TH com o tratamento com GGF2.

5 A figura 6 mostra uma coloração representativa dos níveis de tirosina hidroxilase (TH). Os resultados incluem coloração de tecido normal (quadro A), e uma perda significativa de coloração com TH depois de lesão do nervo cavernoso por esmagamento (quadro B). O Quadro C mostra a coloração com TH preservada dos terminais do nervo cavernoso no corpo do pênis que melhor corresponde a um aumento geral na preservação da enervação do pênis subsequente à lesão por esmagamento com o tratamento com GGF2 (quadro C). A densidade de coloração mostra tendências à preservação da coloração com TH com o tratamento com GGF2.

#### Exemplo 4: Modalidades Alternativas

15 Lesão nervosa periférica pode ocorrer em praticamente qualquer contexto cirúrgico. A probabilidade de ocorrer uma lesão nervosa está correlacionada com a localização e a extensão da dissecação dos tecidos em qualquer cirurgia. Por exemplo, uma cirurgia para mastectomia tem complicações frequentes resultantes de lesão nervosa periférica que incluem adormecimento da axila e do braço (por exemplo, danos causados por lesão do nervo intercostobraquial), escápula alada (danos causados por lesão do nervo torácico longo), paralisia do latissimus dorsi (danos causados por lesão do nervo toracodorsal). (Vide Watt-Boolsen et al., 1988; Aitken & Minton, 1983).

25 Por conseguinte, a neuregulina é antes, depois ou antes e depois da mastectomia para limitar os danos aos nervos e/ou para aumentar a recuperação da função nervosa periférica. Pacientes com mastectomia programada são tratadas cerca de 24 horas antes da cirurgia com uma quantidade apropriada de neuregulina. Opcionalmente, as pacientes também são tratadas por um período de até cerca de 6 semanas ou mais subsequente à  
30 cirurgia para aumentar a recuperação neural. Em modalidades alternativas, as pacientes são tratadas somente antes ou somente depois da cirurgia. Como observado neste relatório, a neuregulina é usada para prevenir lesão

nervosa decorrente de cirurgias de ressecção de tumor (prostatectomia, mastectomia, tireoidectomia, etc). Foi observado que as neuregulinas estão envolvidas como promotores e como supressores da formação e do crescimento de células tumorosas (Atlas et al., 2003; Chua et al., 2009). O tratamento com neuregulina pode ser contraindicado ou não em pacientes com certos tumores. As neuregulinas são usadas em pacientes com tumores positivos para erbB somente quando estudos de segurança suficiente demonstram que as neuregulinas não aumentam o crescimento de tal tumor.

Além disso, o tratamento de lesão nervosa decorrente de cirurgia não está limitado à mastectomia e à prostatectomia. Lesões nervosas frequentemente ocorrem em qualquer cirurgia envolvendo dissecação e/ou ressecção significativas. Essas cirurgias podem incluir, porém sem limitação, cirurgia dos membros superiores, cirurgia das mãos, cirurgia/substituição de joelho, cirurgia/substituição de quadril cirurgia/substituição cotovelo dissecação do pescoço para cirurgia arterial e venosa, cirurgia da tireoide, tonsilectomia, cirurgia da mão e do pé. Lesão nervosa periférico é comum em cirurgia pélvica, cirurgia abdominal e cirurgia colorretal. Lesões nervosas também ocorrem em cirurgias orais e faciais.

Além de lesões diretas nos nervos através da dissecação e ressecção em cirurgias, lesões nervosas frequentemente resultam de compressão ou distensão dos nervos durante uma cirurgia devido ao posicionamento do paciente, compressão em pontos de contato ou de campos cirúrgicos, restrições, grampos, fitas ou qualquer outro objeto que possa comprimir o tecido. Essas lesões podem ser resultados inevitáveis da cirurgia ou o resultado do uso de uma técnica inadequada. Não importa qual seja o cenário ou a etiologia da lesão nervosa periférica, foi constatado que as neuregulinas previnem e/ou tratam tal lesão.

Nos seres humanos, experiências clínicas demonstraram a eficácia da NRG na prevenção e no tratamento de lesão nervosa periférica com dados da avaliação da função sensorial e/ou motora de regiões nervosas frequentemente afetadas em pacientes que são tratados com neuregulina ou com um placebo de controle. Por exemplo, o adormecimento da axila

- pode ser testado por métodos neurológicos tradicionais da função sensorial incluindo testes de alodinia, hiperalgesia, limiar ou acuidade sensorial (discriminação de dois pontos). Esses métodos são tradicionais nesta área. Os pacientes são acompanhados por um período de vários meses após a cirurgia e comparações estatísticas são feitas entre grupos de pacientes com neuregulina e aqueles tratados com um controle. Segundo essas experiências, foi constatado que o tratamento com NRG antes e/ou depois de um evento cirúrgico preveniu e/ou tratou as lesões nervosas periféricas avaliadas.
- 10                   Experiências análogas às experiências precedentes também avaliam de maneira similar a resistência motora, o alcance do movimento e a coordenação. Segundo essas experiências, foi constatado que o tratamento com NRG antes e/ou depois de um evento cirúrgico previne e/ou trata lesões nervosas periféricas que resultam na deterioração de um ou mais dentre re-
- 15                   sistência motora, alcance do movimento ou coordenação.



## REIVINDICAÇÕES

1. Método de prevenção ou tratamento de uma lesão nervosa periférica compreendendo administrar uma quantidade eficaz de uma neuregulina a um indivíduo com risco de sofrer uma lesão nervosa periférica ou a um indivíduo com uma lesão existente no nervo periférico.  
5
2. Método de acordo com a reivindicação 1, onde a neuregulina é administrada antes de um procedimento cirúrgico.
3. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o procedimento cirúrgico é uma cirurgia de câncer próstata.
- 10 4. Método de acordo com a reivindicação 3, onde a cirurgia de câncer próstata é uma prostatectomia.
5. Método de acordo com a reivindicação 1, onde neuregulina é administrada a uma mulher grávida antes do parto do bebê.
6. Método de acordo com a reivindicação 1, onde neuregulina é  
15 administrada a um paciente antes de um tratamento para câncer de mama.
7. Método de acordo com a reivindicação 4, onde o tratamento para câncer de mama é uma mastectomia total ou parcial.
8. Método de tratamento ou profilaxia de uma disfunção erétil resultante de uma lesão nervosa periférica, compreendendo administrar uma  
20 quantidade eficaz de neuregulina a um indivíduo com uma lesão nervosa periférica resultando em disfunção erétil ou a um indivíduo com risco de sofrer tal uma lesão nervosa periférica, respectivamente.
9. Método para diagnosticar a etiologia da disfunção erétil em um paciente, o referido compreendendo as etapas de:  
25 administrar uma quantidade eficaz de neuregulina a um paciente com insuficiência erétil; e subsequentemente,  
identificar se a disfunção erétil diminuiu;  
e com isso, se houver uma diminuição da disfunção erétil subsequente à etapa de administração, então o paciente é diagnosticado como  
30 tendo disfunção erétil resultante de lesão nervosa periférica.

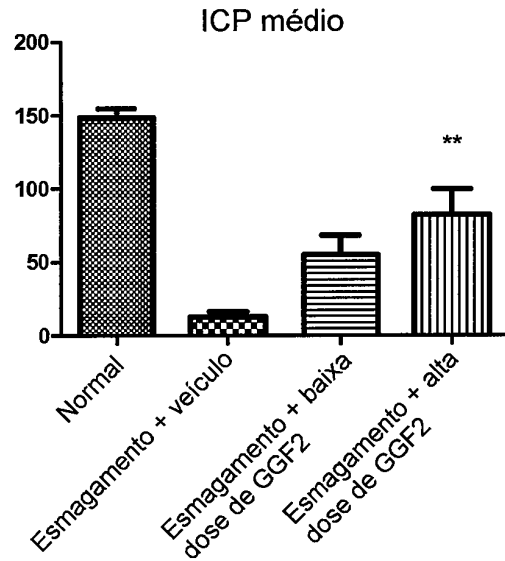


FIG. 1

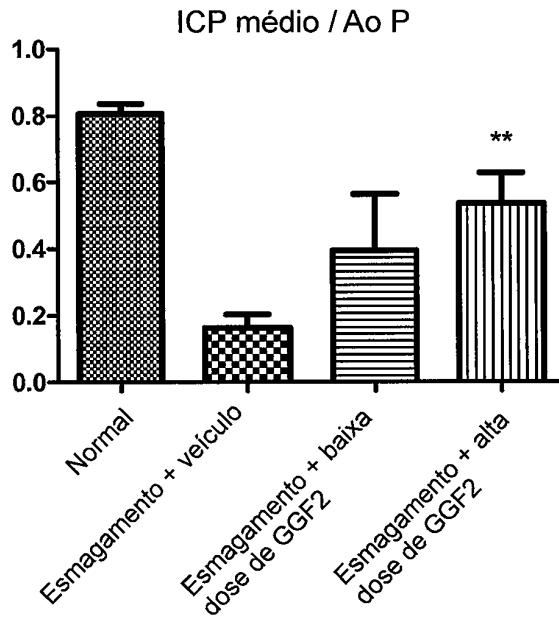


FIG. 2

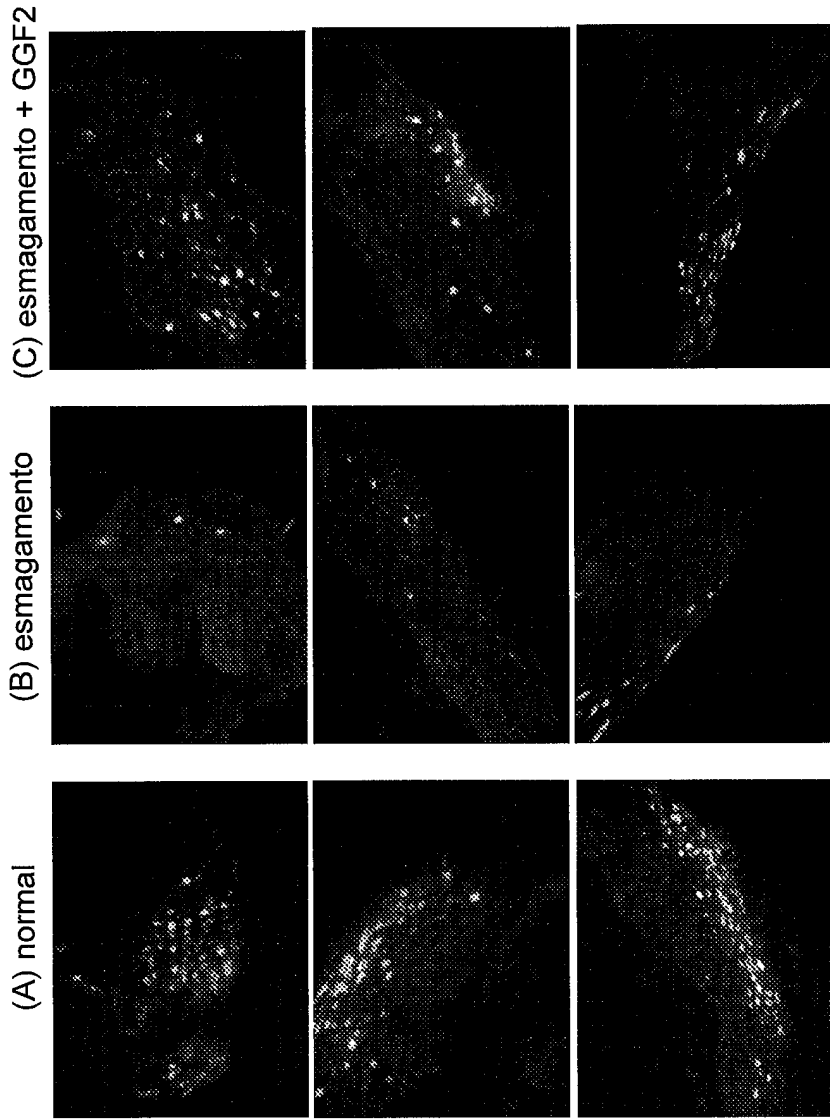


FIG. 3

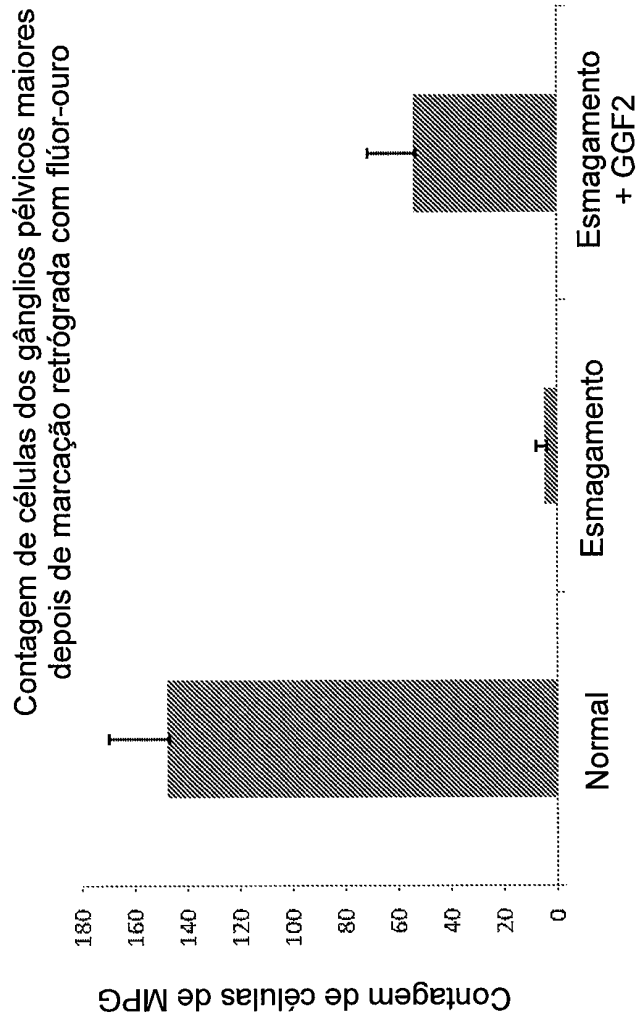
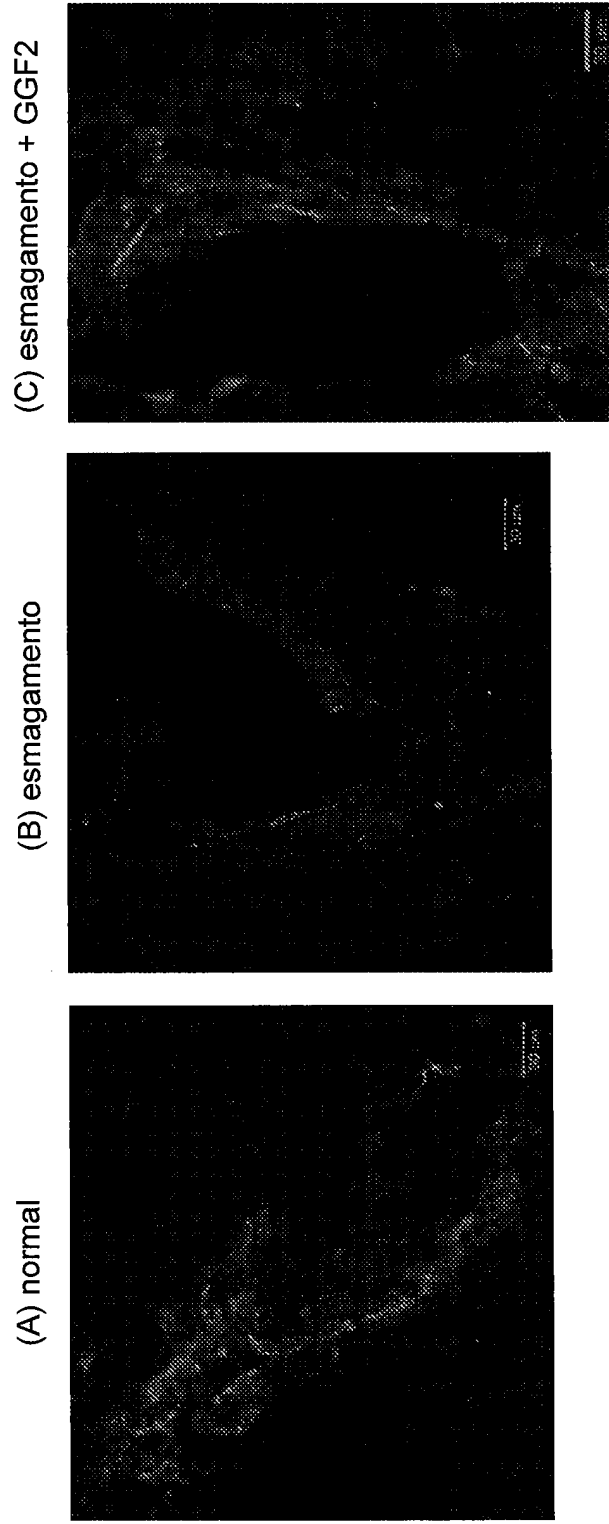
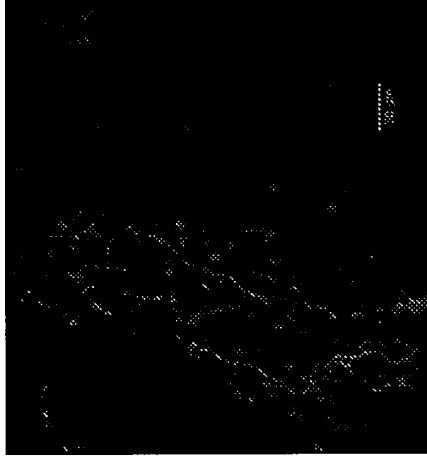


FIG. 4

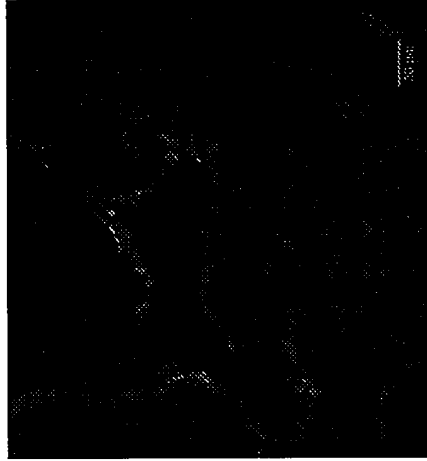


**FIG. 5**

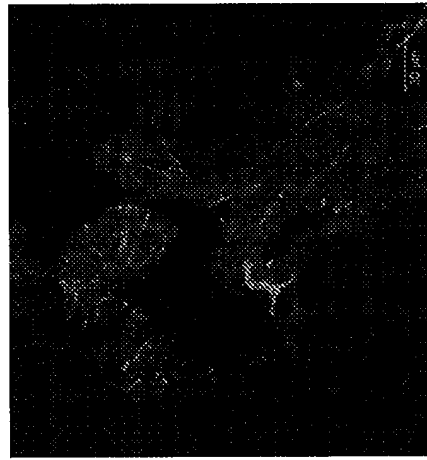
(C) esmagamento + GGF2



(B) esmagamento



(A) normal

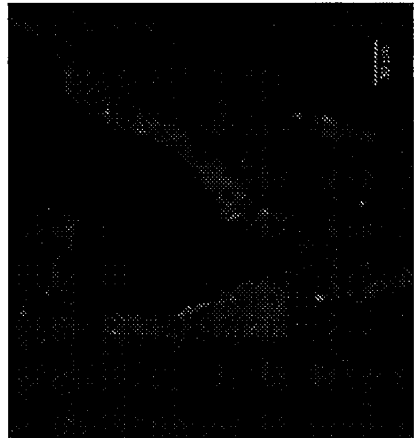


**FIG. 6**

(A) normal



(B) esmagamento



(C) esmagamento + GGF2

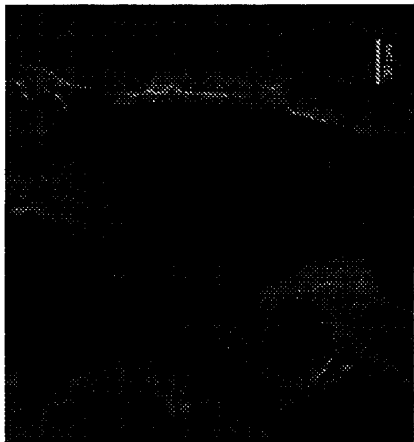


FIG. 7

**RESUMO**

Patente de Invenção: **"USO DE NEUREGULINA PARA TRATAR LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS"**.

5 A presente invenção refere-se às modalidades da invenção que referem-se ao uso de neuregulinas para prevenir ou tratar lesões nervosas periféricas, atenuar, melhorar ou evitar a perda de função dos nervos periféricos.