



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 38/18 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015156584, 14.10.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.10.2010

Дата регистрации:
15.06.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
14.10.2009 US 61/251,583;
16.10.2009 US 61/252,161

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2012119603 14.10.2009

(45) Опубликовано: 15.06.2018 Бюл. № 17

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

КАДЖАНО Энтони О. (US),
БЕЛЛА Энтони Дж. (СА),
АЙАСИ Дженнифер Ф. (US)

(73) Патентообладатель(и):

АКОРДА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 0126607, 19.04.2001. WO
0189568, 29.11.2001. Современная
медицинская энциклопедия. п/ред.
Г.Б.ФЕДОСЕЕВА. - С.-Пб: "НОРИТ", 2004.
- С.878. CHEN L.-E. et al. Recombinant human
glial growth factor 2 (rhGGF2) improves
functional recovery of crushed peripheral nerve
(a double-blind study)//Neurochemistry
international, vol. 33, no.4, 1 October 1998
(см. прод.)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ НЕЙРЕГУЛИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к неврологии, и может быть использовано при лечении повреждения кавернозных нервов. Применение по изобретению включает введение нейрегулина для лечения повреждения

кавернозных нервов. Использование изобретения позволяет улучшить функцию кавернозных нервов при их повреждении в результате травмы или хирургической процедуры. 17 з.п. ф-лы, 7 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):

(1998-10-01), pages 341-351, XP002262023, GB ISSN: 0197-0186.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A61K 38/18 (2006.01)

(21)(22) Application: **2015156584, 14.10.2010**

(24) Effective date for property rights:
14.10.2010

Registration date:
15.06.2018

Priority:

(30) Convention priority:
14.10.2009 US 61/251,583;
16.10.2009 US 61/252,161

Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:
2012119603 14.10.2009

(45) Date of publication: **15.06.2018** Bull. № 17

Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

KADZHANO Entoni O. (US),
BELLA Entoni Dzh. (CA),
AJASI Dzhennifer F. (US)

(73) Proprietor(s):

AKORDA TERAPYUTIKS, INK. (US)

(54) **APPLICATION OF NEUREGULIN FOR TREATMENT OF PERIPHERAL NERVE DAMAGE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely neurology, and can be used in the treatment of cavernous nerve damage. Use of the invention comprises administering neuregulin in order to treat

damage to the cavernous nerves.

EFFECT: use of the invention allows to improve the function of the cavernous nerves, when they are damaged as a result of trauma or surgical procedure.

18 cl, 7 dwg, 4 ex

RU 2 657 770 C1

RU 2 657 770 C1

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительных заявок США под серийными номерами 61/251,583, поданной 14 октября 2009 г., 61/252,161, поданной 16 октября, 2009 г., каждая из которых полностью включена в настоящее описание путем ссылки.

5 ОБЛАСТЬ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение относится к травме или повреждению нервов. Конкретнее, к применению нейрегулина или его функциональных сегментов для предотвращения, лечения или облегчения повреждения периферических нервов.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 Периферические нервы обычно повреждаются в результате травм, включая автомобильные дорожно-транспортные происшествия, мотоциклетные дорожно-транспортные происшествия, хирургические вмешательства, ножевые и огнестрельные раны и родовые травмы и у ребенка, и у матери. Обычные хирургические причины повреждения нервов включают простатэктомию и мастэктомию. Другие обычные
15 повреждения во время хирургических вмешательств являются результатом длительного позиционирования конечностей или неизбежной, или вызванной несчастным случаем компрессии нервов. После повреждения нервов, происходит потеря чувствительности и/или функции в областях организма, иннервируемых поврежденным нервом. Например, после повреждения нерва в результате простатэктомии обычно возникает эректильная
20 дисфункция. После мастэктомии часто происходит потеря должной функции верхней конечности и/или лопатки. Кроме того, после родовой травмы или другой травмы с повреждением плечевого сплетения возникает дисфункция конечности, расположенной на стороне повреждения.

Любое лечение, которое может предотвратить или ограничить степень дисфункции
25 после повреждения нерва, оказало бы существенное воздействие на современные терапевтические стратегии лечения повреждений периферических нервов. Существует потребность в дополнительных способах лечения по поводу повреждений периферических нервов.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 Нейрегулины были задействованы в качестве факторов, оказывающих нейропротективные и нейровосстановительные эффекты на разнообразных экспериментальных моделях заболеваний и повреждений центральной нервной системы. Однако до настоящего изобретения никогда не устанавливалось, что нейрегулины способны предотвращать и/или лечить повреждения периферических нервов.
35 Соответственно, определенные варианты осуществления настоящего изобретения направлены на способы лечения или облегчения повреждения периферических нервов введением нейрегулина (например, GGF2) или его функционального сегмента индивиду, у которого имеется повреждение периферических нервов или риск повреждения периферических нервов.

40 Настоящее изобретение демонстрирует, что лечение нейрегулином повреждения периферического нерва может ослабить потерю функции периферических нервов, облегчить или ослабить потерю функции периферических нервов при введении или до, или после повреждения нерва, и в некоторых случаях, восстановить функцию периферических нервов. В определенных вариантах осуществления удается избежать
45 повреждения периферического нерва. В определенных вариантах осуществления, устраняется существующее повреждение периферических нервов. В определенных вариантах осуществления повреждение периферических нервов полностью не исключается. В определенных вариантах осуществления, повреждение периферических

нервов полностью не устраняется.

Модель эректильной дисфункции у крыс используется в качестве системы *in vivo* для демонстрации эффективности нейрегулинов при лечении повреждения периферических нервов. В определенных аспектах, изобретение направлено на лечение эректильной дисфункции в результате повреждения периферических нервов, но настоящее изобретение не ограничивается только эректильной дисфункцией. Нейрегулин может быть эффективным в качестве монотерапии по поводу любого повреждения периферических нервов и не требует одновременного лечения натуральными или искусственными нервными каналами или одновременного лечения со способами клеточной терапии, такими как шванновские клетки.

Определенные варианты осуществления направлены на способы лечения повреждения периферических нервов, включающие введение эффективного количества нейрегулина индивиду, имеющему повреждение периферических нервов, или индивиду с риском возникновения повреждения периферических нервов. Определенные варианты осуществления направлены на способы профилактики или предотвращения повреждения периферических нервов, включающие введение эффективного количества нейрегулина индивиду с риском возникновения повреждения периферических нервов. Термин «индивид» включает млекопитающих и, в частности, людей.

В определенных вариантах осуществления повреждение периферического нерва является результатом травмы, включая без ограничения автомобильные дорожно-транспортные происшествия, мотоциклетные дорожно-транспортные происшествия, хирургические вмешательства, ножевые и огнестрельные раны и родовые травмы. В определенных вариантах осуществления, повреждение периферических нервов является результатом хирургического вмешательства, такого как простатэктомия, мастэктомия и тому подобные. В контексте по существу любого хирургического вмешательства, повреждение периферических нервов может являться прямым результатом рассечения ткани, резекции ткани и/или возникать вследствие позиционирования и/или компрессии конечностей. В конкретном варианте осуществления нейрегулин применяется для лечения или предотвращения повреждения периферических нервов, которые могут привести к эректильной дисфункции.

Другие варианты осуществления направлены на лечение эректильной дисфункции в результате хирургического повреждения периферических нервов, связанных с эректильной функцией, таких как нерв пещеристого тела и/или нерв пениса. Повреждение нерва пещеристого тела часто возникает в результате резекции рака предстательной железы; данное повреждение может вызвать эректильную дисфункцию (ED).

Современные фармацевтические вмешательства лечат итоговую функциональную недостаточность вследствие повреждения путем увеличения кровотока к пещеристым телам для содействия эрекции пениса. В настоящее время существуют вмешательства с использованием медицинских устройств, которые лечат итоговую функциональную недостаточность вследствие повреждения путем увеличения объема пениса, ведущего к состоянию, аналогичному нормальной эрекции полового члена. Все существующие вмешательства, используемые для лечения ED, имеют недостатки.

Настоящее изобретение обеспечивает высокую защиту нервов в период во время повреждения и/или способствует выздоровлению пациента путем уменьшения тяжести любой функциональной недостаточности.

Пептид нейрегулин 1 (GGF2) тестировали на модели двухстороннего раздавливания у крыс, которая представляет собой принятую модель повреждения кавернозного нерва; данная модель использовалась для тестирования силденифила и других

лекарственных средств для лечения ED. Как указано в настоящем описании, GGF2 улучшал функциональные исходы, когда нервы подвергали электростимуляции через 5 недель после повреждения и измеряли интракавернозное давление (ICP).

5 Определенные варианты осуществления направлены на лечение нейрегулином повреждения нервов после мастэктомии. Повреждение длинного грудного, межреберно-плечевого и грудоспинного нервов обычно происходит во время мастэктомии, хотя другие нервы могут также повреждаться, и нейрегулин может применяться для предотвращения или лечения такого повреждения. Нейрегулин может доставляться перед и/или после мастэктомии для защиты и восстановления функции нервов.

10 Существует много обычно используемых показателей функции верхних конечностей, включая силу, чувствительность, диапазон движения и рефлексы – все или любые из которых целесообразны для определения защиты или восстановления функции нервов. Настоящее изобретение в равной степени относится к любому поврежденному нерву при любой медицинской или хирургической процедуре.

15 Другие варианты осуществления включают лечение нейрегулином повреждения нервов после травмы плечевого сплетения. Повреждение плечевого сплетения является обычным результатом тупой травмы, родовой травмы, дорожно-транспортного происшествия и спортивных травм, приводящих к двигательным и сенсорным дефицитам пораженной конечности. Нейрегулин может вводиться индивиду с повреждением
20 плечевого сплетения для уменьшения повреждения и восстановления функции конечности. В ситуациях, которые предвидятся, таких как роды, композиция по изобретению может вводиться профилактически. Функция конечности может измеряться любым числом принятых неврологических показателей двигательной функции, силы, чувствительности, диапазона движений и/или рефлексов.

25 Определенные аспекты включают введение примерно 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 мкг или мг полипептида или пептида нейрегулина на основании активности
30 конкретного применяемого нейрегулина и медицинского контекста, как понятно специалисту в данной области. Определенные аспекты включают введение нейрегулина до и/или после хирургического вмешательства.

В определенных аспектах нейрегулин может представлять собой любой полноразмерный нейрегулин, кодируемый генами NRG1, 2, 3 или 4. В еще одном аспекте нейрегулин может представлять собой любой функциональный сегмент полипептида
35 нейрегулина. В определенных вариантах осуществления функциональный сегмент нейрегулина содержит EGF-подобный домен. В определенных вариантах осуществления, нейрегулин может представлять собой любой пептид из NRG1, 2, 3 или 4 генов, который связывается и активирует рецепторы erbB. В определенных вариантах осуществления нейрегулин может представлять собой любой пептид, полученный модифицированием
40 из пептида дикого типа, кодируемого генами NRG1, 2, 3 или 4, с тем, чтобы модифицированный пептид связывался с рецепторами erbB и активировал их.

Нейрегулины и полипептиды, содержащие EGF-подобные домены нейрегулинов, могут вводиться индивиду с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или эксципиентом, в стандартной лекарственной форме. Обычная фармацевтическая
45 практика может быть использована для получения подходящих препаративных форм или композиций для введения таких композиций пациентам или экспериментальным животным. Хотя предпочтительно внутривенное введение, может использоваться любой целесообразный путь введения, например, парентеральное, подкожное, внутримышечное,

внутричерепное, внутриорбитальное, глазное, внутрижелудочковое, внутрикапсулярное, интраспинальное, внутрицистернальное, внутрибрюшинное, интраназальное, аэрозольное, пероральное или трансдермальное или местное введение (например, применением устройства или адгезивной трансдермальной системы, несущей препаративную форму, способную проходить через дерму и поступать в поток крови).
Терапевтические препаративные формы могут быть представлены в виде жидких растворов или суспензий; для перорального введения препаративные формы могут быть представлены в виде таблеток или капсул; а для интраназальных препаративных форм - в виде порошков, носовых капель или аэрозолей.

Под терминами «нейрегулин-1», «NRG-1», «геререгулин» подразумевается полипептид, который связывается с ErbB рецепторами 1, 3 или 4, а также спариванием (димеризацией) с рецептором ErbB2. В одном варианте осуществления нейрегулин кодируется геном лиганда p185erbB2, описанным в патентах США №№ 5530109; 5716930 и 7037888, каждый из которых полностью включен в настоящее описание путем ссылки. В одном варианте осуществления, нейрегулин представляет собой GGF2 или любую его субпоследовательность, или любую молекулу, которая включает всю или активную часть последовательности GGF2.

Термин «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» предназначен для обозначения того количества нейрегулина, которое вызывает искомую исследователем, ветеринаром, врачом или другими клиницистом биологическую или медицинскую реакцию ткани, системы, животного или человека.

Терапевтическое изменение представляет собой изменение измеряемой биохимической или физиологической характеристики в направлении, которое облегчает течение подвергаемого лечению заболевания или состояния, например, повреждения периферических нервов. Конкретнее, «эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для уменьшения симптомов, связанных с медицинским состоянием или недомоганием, для нормализации функций организма при заболеваниях или расстройствах, которые приводят к нарушению определенных функций организма, или для обеспечения улучшения одного или более из клинически измеряемых параметров заболевания или состояния.

Пока нет ясного указания на отношение только к альтернативам, или где альтернативы являются взаимно исключаящими, употребление термина «или» в формуле изобретения используется для обозначения «и/или». Предусматривается также, что любое перечисление с использованием термина «или» может также быть определено исключено из других изложенных вариантов.

Во всей настоящей заявке термин «примерно» используется для указания на то, что величина, которая находится в пределах 85%, 90%, 95%, или стандартного отклонения ошибки для устройства или способа, используемого для определения величины.

В соответствии с длительно действующим патентным законодательством, пока нет определенных указаний, слова с неопределенным артиклем единственного числа «а» и «an» в формуле изобретения и описании обозначают один или более описываемых объектов.

В определенных вариантах осуществления в соответствии с изобретением, нейрегулин применяется профилактически, посредством этого предотвращая или уменьшая возможное повреждение. В определенных вариантах осуществления в соответствии с изобретением нейрегулин применяется прогностически для указания будущего состояния индивида. В определенных вариантах осуществления в соответствии с изобретением, нейрегулин применяется диагностически для указания присутствия или вероятного

наличия состояния или патологии. В определенных вариантах осуществления, в соответствии с изобретением, нейрегулин применяется терапевтически для воздействия на состояние некоторым образом, который уменьшает или устраняет симптом или признак состояния или заболевания, подвергаемого лечению.

5 Другие цели, признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидны из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что хотя подробное описание и определенные примеры указывают определенные варианты осуществления изобретения, они приведены только в качестве иллюстрации, поскольку для специалистов в данной области из данного подробного описания станут очевидными различные
10 изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Следующие чертежи составляют часть настоящего описания и включены для демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение можно лучше понять путем ссылки на один из данных чертежей в комбинации с подробным
15 описанием определенных вариантов осуществления, представленных в нем.

Фиг. 1: Данные изменения среднего ICP.

Фиг. 2: Данные, нормализованные к величинам аортального давления.

Фиг. 3: Репрезентативное мечение фтор-золотом основного тазового ганглия (MPG) от 3 животных на группу лечения ((панель A) нормальные, (panel B) раздавливание, (панель C) раздавливание + GGF2). Фтор-золото, инъецированное в ткань пениса, переносится ретроградно назад через интактные нервы в клеточные тела в MPG. Панель A: Нормальные животные демонстрируют количество ретроградного мечения, наблюдаемое в отсутствие повреждения нервов. Панель B: Животные с раздавливанием тканей демонстрируют резкое снижение количества нервных волокон в результате
20 повреждения, поскольку метка фтор-золота неспособна переноситься на все расстояние назад в MPG. Панель C: У животных из группы раздавливания + GGF2 проявляется увеличенное число клеток MPG, меченых фтор-золотом, указывая на то, что в результате лечения GGF2, имеется больше сохраненных нервных волокон, присутствующих после повреждения.

Фиг. 4: Количественное определение мечения фтор-золотом в MPG. Результаты показали, что у нормальных животных в MPG имеется большое число меченых клеточных тел. После повреждения раздавливанием, число меченых клеток резко снижается вследствие повреждения нервных волокон и возникшей в результате неспособности ретроградной транспортировки метки назад в MPG. Однако лечение
35 GGF2 увеличивало число интактных нервных волокон, доступных для транспортировки фтор-золота из ткани пениса в MPG ретроградным образом, приводя к большому числу меченых клеток.

Фиг. 5: Репрезентативное окрашивание уровней nNOS (нейронной синтазы оксида азота). Кавернозный nNOS представляет собой общепринятый маркер сохранения кавернозных нервов. Результаты настоящей работы включали нормальное окрашивание ткани (панель A). Для сравнения имелась значительная потеря окрашивания nNOS после повреждения кавернозного нерва раздавливанием (панель B). Сохраненное окрашивание nNOS окончаний кавернозных нервов в пещеристых телах пениса продемонстрировало увеличение выживаемости кавернозных нервов после повреждения
45 раздавливанием при лечении GGF2 (панель C). Плотность окрашивания указывает на сохранение окрашивания nNOS при лечении GGF2.

Фиг. 6: Репрезентативное окрашивание уровней тирозинкиназы (ТН). Результаты, представленные на данном чертеже, показывают на панели A нормальное окрашивание

ткани, а на панели В – значительную потерю окрашивания ТН окончаний кавернозного нерва в пещеристых телах пениса; эти данные соответствуют общему сохранению или восстановлению иннервации пениса лечением GGF2 после повреждения раздавливанием. Таким образом, плотность окрашивания указывала на сохранение окрашивания ТН при лечении GGF2.

Фиг. 7: Репрезентативное окрашивание транспортера везикулярного ацетилхолина (VaChT). Результаты показывают нормальное окрашивание ткани (панель А), и значительную потерю окрашивания VaChT после повреждения раздавливанием кавернозного нерва (панель В). Напротив, сохраненное окрашивание VaChT окончаний кавернозного нерва в пещеристых телах пениса, показанное на (панели С), демонстрирует увеличение выживания кавернозных нервов лечением GGF2 после повреждения раздавливанием (С). Плотность окрашивания показывает тенденции к сохранению окрашивания VaChT при лечении GGF2.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Повреждение периферических нервов представляет собой обычный результат различных явлений, сжатия, контузии, пересечения, раздавливания или растяжения, например, травмой, несчастным случаем или хирургическим вмешательством. Хотя внешние факторы, ведущие к повреждению нервов, варьируются, проявления на уровне нервов имеют общие признаки (их обзор можно найти, например, в публикации Lee and Wolfe, J Am Acad Orthop Surg, 8(4), p. 243, 2008). Травматическое повреждение любой этиологии часто вызывает повреждение миелинирования, эпинеурия, перинеурия, эндоневрия и аксонов. В самом легком из случаев, происходит повреждение в первую очередь миелина и эпинеурия, после которого спонтанно происходит полное восстановление в пределах нескольких дней или недель.

Однако многие повреждения нервов приводят к разрыву эндоневрия и аксонов и приводят к прерыванию функции, которая полностью не восстанавливается или восстанавливается в течение продолжительного периода времени.

Кроме того, при повреждении периферического нерва, которое вовлекает повреждение аксона, имеется местная дегенерация этого аксона, которая происходит в пределах нескольких часов после повреждения. В течение нескольких следующих дней, клеточное тело проксимальных нейронов и аксон подвергаются процессу, известному как валлериановская дегенерация. После дегенерации аксона, продуцирующая миелин шванновская клетка погибает, оставляя клеточные осколки и воспаление. Данная гибель шванновской клетки и связанное с ней воспаление усиливают повреждение нерва.

В отличие от центральной нервной системы, значительная степень восстановления может произойти в периферических нервах. Аксоны растут по каналам перинеурия и реиннервируют дистальные мишени, а шванновские клетки ремиелинируют аксоны. Хотя происходит регенерация периферических нервов, к сожалению, этот процесс не является совершенным; многие нейроны, которые подвергаются дегенерации, никогда не регенерируются или никогда не находят своей первоначальной мишени и приводят к постоянной дисфункции. Данная дисфункция может включать потерю двигательной функции, потерю сенсорной функции, парестезии, потерю рефлексов, ригидность, контрактуры или сниженный диапазон движения.

Любое лечение, которое может ограничить степень дисфункции после повреждения нерва, оказало бы значительное воздействие на современные терапевтические стратегии для лечения повреждений периферических нервов.

Большое количество данных литературы демонстрирует, что нейрегулины повышают

способность нейронов регенерироваться через искусственные каналы и функционировать в качестве вспомогательной терапии с клеточными способами лечения, такими как трансплантаты шванновских клеток. Перед настоящим изобретением, не было известно, что нейрегулины при отдельном применении могут оказывать лечебное воздействие, например, путем защиты и/или восстановления функции при повреждении периферических нервов.

Модель, использованная в этих исследованиях (модель эректильной дисфункции у крыс) является стандартной, принятой и широко известной моделью повреждения периферических нервов. В данном конкретном подходе, кавернозный нерв повреждается сжатием пинцетом. Такое же повреждение сжатием или раздавливанием может использоваться в качестве модели в любом другом периферическом нерве. На модели повреждения кавернозного нерва, функциональная недостаточность проявляется в эректильной функции. С точки зрения общепринятой и согласованной патофизиологии травматического повреждения нервов, такое повреждение кавернозного нерва представляет собой превосходную модель повреждения, вызванного простатэктомией, а также общей моделью всех травматических повреждений периферических нервов.

Повреждения периферических нервов вызывают изменения в клеточных телах сенсорных нейронов, локализующихся в дорзальном корневом ганглии (DRG); эти изменения содействуют выживанию и регенерации аксонов. В благоприятных условиях, например, после повреждения раздавливанием, большинство нервных волокон успешно регенерируются. Однако во многих клинически релевантных обстоятельствах, травматическое или вызванное заболеванием повреждение нервов имеет неблагоприятный исход лишь с ограниченным возвратом функции и часто со значительной задержкой. В таких случаях, могут развиваться состояния нейропатической или хронической боли.

Боль обычно связана с травмой или повреждением сенсорных нервов и приводит к охранию и иммобилизации пораженной области. Поэтому ноцицепция (передача нейронами сигналов, лежащая в основе болевого ощущения) сопутствует механизму содействия быстрому заживлению, даже хотя и запуская неприятные сенсорные и эмоциональные ощущения. Однако во многих патологических ситуациях, ноцицептивные входящие сигналы могут привести к функциональным изменениям, которые являются активно вредными для организма.

Повреждение нерва приводит к изменению многих свойств первичных афферентных нейронов и их центральных связей в спинном мозге, приводя к аллодинии (восприятие боли от обычно безвредного стимула), гипералгезии (преувеличенной реакции на любой данный болевой раздражитель) и расширению рецептивной области (т.е., зоны, которая является «болезненной» при приложении стимула). Большинство состояний хронической боли возникает как результат повреждения или центральной, или периферической нервной ткани.

Эректильная дисфункция

Импотенция, также именуемая эректильной дисфункцией (ED), представляет собой распространенную проблему, поражающую только в США 20 миллионов мужчин. Эрекция полового члена является нервно-сосудистым феноменом, зависимым и от целостности нервов, и от функциональных кровеносных сосудов. После сексуальной стимуляции, нейромедиаторы (в частности, оксид азота) высвобождаются из окончаний кавернозных нервов и эндотелиальных клеток. Итоговое расслабление артериальной и артериолярной гладкой мускулатуры увеличивает артериальный кровоток. Кровь, захваченная внутри пещеристых тел, приводит половой член в состояние эрекции.

Повреждение кавернозного нерва в результате радикальных хирургических вмешательств на тазовых органах, таких как по поводу рака предстательной железы, мочевого пузыря или прямой кишки, является одной из наиболее распространенных причин ятрогенной ED в США. ED является основным источником заболеваемости после радикальной простатэктомии. Например, несмотря на внедрение сохраняющих нервы хирургических методик, частота послеоперационной сексуальной потенции находится в диапазоне от 30% до 80% для мужчин, которые были подвергнуты двухсторонним процедурам, сохраняющим кавернозные нервы, по поводу ограничивающегося органом рака предстательной железы (Wang, J Sex Med, 4: 1085-97, 2007).

До настоящего времени были исследованы различные нейромодуляторные стратегии; однако нет способов лечения ни для защиты кавернозных нервов перед их повреждением или во время него, ни способов лечения после их повреждения для вызова регенерации нервов (Michl et al., J Urol 176:227-31, 2006; Burnett and Lue, J Urol 176:882-7, 2006). Несмотря на современные сохраняющие нервы модификации хирургического лечения и лучевой терапии по поводу злокачественных заболеваний тазовых органов, существует потребность в новых средствах для сохранения и восстановления эректильной функции после лечения.

Наблюдается достаточно определенный тип клеточных изменений дистальнее участка повреждения, прогрессирующих от дегенерации аксонов и миелинового влагалища, инвазии макрофагов, фагоцитов и дедифференциации шванновских клеток до образования полос Бунгнера. Данные изменения модифицируют среду поврежденного нерва и ее потенциальную способность регенерировать аксоны. Выживанию нейронов содействуют трофические факторы, когда аксоны переключаются с режима «передачи» на режим роста, экспрессируя белки (GAP-43, тубулин, актин), новые нейропептиды и цитокины. Требуется новые стратегии, усиливающие потенциал роста, поскольку поддержка культы дистальных нервов и способность нейронов регенерироваться не являются неограниченными (Fu and Gordon, Mol Neurobiol. 14: 67-116, 1997).

Нейрегулины

Под терминами «нейрегулин», «нейрегулин-1», «NRG-1», «геререгулин» подразумевается полипептид, который связывается с рецепторами ErbB1, ErbB 3 или ErbB 4 и путем спаривания (димеризации) с рецептором ErbB2. Например, нейрегулин может кодироваться геном лиганда p185erbB2, описанным в патентах США №№ 5530109; 5716930 и 7,037,888, каждый из которых полностью включен в настоящее описание путем ссылки; нейрегулин может также кодироваться генами NRG-2, 3 и 4. Нейрегулин может представлять собой GGF2 или любой его активный фрагмент; он может также представлять собой консервативный вариант GGF2 или молекулу, которая включает GGF2. При некоторых видах использования в данной области, термин «нейрегулин» предназначен для указания только подобного EGF домена полной молекулы нейрегулина; он также известен как «подобный нейрегулину» белок, пептид или полипептид.

Под «подобным нейрегулину» белком, пептидом или полипептидом подразумевается полипептид, который обладает EGF-подобным доменом, кодируемым геном нейрегулина. В одном варианте осуществления «подобный нейрегулину» белок, пептид или полипептид вызывает терапевтический эффект у индивида, имеющего повреждение периферических нервов, или у индивида, имеющего риск повреждения периферических нервов (например, у пациентов, которые подлежат плановому хирургическому лечению, или рожениц, у которых имеется риск связанного с ними повреждения периферических

нервов).

Аминокислотная последовательность GGF2 (с подчеркнутой областью, включающей EGF-подобный домен) представляет собой:

MRWRRAPRSGRPGPRAQRPGSAARSSPPLPLLPLLLLLGTAALAPGAAAGNEAAPA
 5 GASVCYSSPPSVGQVQELAQRAAVVIEGKVHPQRRQQGALDRKAAAAAGEAGAWG G
 DREPPAAGPRALGPPAEPLLAANGTVPSWPTAPVPSAGEPGEEAPYLVKVHQVW AVK
 AGGLKKSLLTVRLGTWGHPAFPCGRLKEDSRYIFFMEPDANSTSRAPAAAFRA
 SFPPLETGRNLK EVSRVLCRRCALPPQLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSLRF
 10 KWFKGNELNRKKPQNIQKPKGKSELRINKASLADSGEYMCKVISKLGNDSSASA
 NITIVESNATSTSTTGTSHLVCAEKETFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCCPNE

FTGDRCQNYVMASFYSTSTPFLSLPE (SEQ ID NO:1) (номер доступа в Gen Bank AAB59622, которая включена в настоящее описание путем ссылки). В определенных аспектах изобретения полипептид нейрегулина или его сегмент на 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичен или гомологичен аминокислотной последовательности
 15 GGF2. В определенных аспектах изобретения подобный нейрегулину полипептид на 75, 80, 85, 86, 97, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичен или гомологичен аминокислотной последовательности подобного EGF домена GGF2.

Используемый в настоящем описании термин «белок» или «полипептид» относится к молекуле, включающей по меньшей мере десять аминокислотных остатков. В
 20 определенных вариантах осуществления белок включает весь полипептид GGF2 или его часть. В некоторых вариантах осуществления используется вариант дикого типа белка или полипептида, однако, в некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированный белок или полипептид используется для лечения повреждения периферического нерва. В настоящем описании термины «пептид», «белок» или
 25 «полипептид» используются взаимозаменяемо. Для удобства, термин «пептид» используется в настоящем описании для обозначения аминокислотных последовательностей любой длины.

«Модифицированный пептид» относится к пептиду, химическая структура которого, в частности, его аминокислотная последовательность, изменена в отношении
 30 соответствующего пептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления модифицированный пептид имеет по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный пептид имеет по меньшей мере одну d-аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный пептид имеет по меньшей мере одну естественно не встречающуюся
 35 аминокислоту.

Без ограничения, в определенных вариантах осуществления размер пептида (дикого типа или модифицированного) может включать любую из (или любой диапазон, который может быть дериватизирован из): 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,
 40 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 молекул аминокислот или больше, и любой диапазон, дериватируемый из них, соответствующей аминокислотной последовательности,
 45 описанной или указанной в качестве ссылки в настоящем описании; в одном варианте осуществления, такой белок, полипептид или диапазон размера относится к GGF2. Предусматривается, что полипептиды могут мутировать аминоконцевым или карбокси-концевым усечением, делающими их короче, чем их соответствующая форма

дикого типа, но они также могут изменяться слиянием или конъюгацией последовательности гетерологического белка с конкретной функцией (например, для нацеливания или определения локализации в целях очистки и т.д.).

Используемый в настоящем описании термин «молекула аминокислоты» относится к любой аминокислоте, производному аминокислоты или имитации аминокислоты, известным в данной области. В определенных вариантах осуществления, остатки молекулы пептида являются последовательными, без какой-либо не аминокислотной молекулы, прерывающей последовательность аминокислотных остатков молекулы. В других вариантах осуществления, последовательность может включать одну или более не аминокислотных частей молекулы. В конкретных вариантах осуществления, последовательность остатков молекулы пептида могут прерываться одной или более не аминокислотными частями молекулы.

Соответственно, термин «пептидная» композиция включает аминокислотные последовательности; эти аминокислотные могут представлять собой любую из 20 обычных аминокислот в естественно синтезированных белках или любую модифицированную или необычную аминокислоту.

Пептидные композиции могут быть получены любой технологией, известной специалистам в данной области, включая (i) экспрессию пептидов посредством стандартных молекулярно-биологических методик, (ii) выделение пептидных соединений из натуральных источников или (iii) химический синтез. Нуклеотидные, а также пептидные последовательности для определенных генов нейрегулина были ранее описаны и могут быть найдены в признанных компьютеризированных базах данных. Одной такой базой данных является National Center for Biotechnology Information's Genbank (Генетический банк Национального центра биотехнологической информации) и базы данных GenPept (в интернете на сайте ncbi.nlm.nih.gov/). Области кодирования для этих генов могут быть амплифицированы и/или экспрессированы с использованием методик, раскрытых в настоящем описании, или таких методик, которые известны среднему специалисту в данной области.

Модифицированные пептиды могут включать заместительные, вставочные или делеционные варианты. В делеционных вариантах обычно отсутствует один или более остатков нативной молекулы или молекулы дикого типа. Могут быть делетированы отдельные остатки или может быть делетирован ряд смежных аминокислот. Стоповый кодон может быть введен (путем замещения или вставки) в кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты для генерирования усеченного белка. Вставочные мутанты обычно вовлекают добавление материала в не концевой точке в пептиде. Это может включать вставку одного или более остатков. Могут также создаваться концевые добавления, часто называемые слитыми белками или слитыми пептидами. Заместительные варианты обычно содержат обмен аминокислоты на другую в одном или более сайтов внутри пептида, и могут быть предназначены для модуляции одного или более свойств пептида с потерей и без потери других функций или свойств, таких как связывание и активация рецепторов нейрегулина. Замещения могут быть консервативными, то есть, одна аминокислота замещается аминокислотой подобной формы и заряда. Альтернативно, замещения могут быть не консервативными с тем, чтобы могла подвергнуться воздействию функция или активность пептида. Не консервативные изменения обычно вовлекают замещение остатка остатком, который химически отличен, такое как замещение полярной или заряженной аминокислоты неполярной или незаряженной аминокислотой и наоборот.

«Консервативные замещения» хорошо известны в данной области и включают без

ограничения, например, замещения: аланина серином; аргинина лизином, аспарагина глутамином или гистидином; аспартата глутаматом; цистеина серином; глутамина аспарагином; глутамата аспартатом; глицина пролином; гистидина аспарагином или глутамином; изолейцина лейцином или валином; лейцина валином или изолейцином; лизина аргинином; метонина лейцином или изолейцином; фенилаланина тирозином или лейцином или метионином; серина треонином; треонина серином; триптофана тирозином; тирозина триптофаном или фенилаланином и валина изолейцином или лейцином.

Следует также понимать, что последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот могут включать дополнительные остатки, такие как дополнительные N- или C-концевые аминокислоты или соответственно 5' или 3' последовательности, пока последовательность соответствует функциональным критериям, изложенным в настоящем описании, таким как сохранение биологической активности. Добавление концевых последовательностей, в частности, относится к последовательностям нуклеиновых кислот, например, включает различные не кодирующие последовательности, фланкирующие или 5', или 3' части кодирующей области.

Фармацевтические препаративные формы

Фармацевтические препаративные формы по настоящему изобретению включают эффективное количество пептида, растворенного или диспергированного в фармацевтически приемлемом носителе. Фразы «фармацевтически или фармакологически приемлемые» относятся к композициям, которые в целом не вызывают неблагоприятную, аллергическую или другую нежелательную реакцию при введении, по мере необходимости, индивиду, например, человеку. Получение таких фармацевтических композиций известно специалистам в данной области в свете настоящего описания, как иллюстрируется в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, включенном в настоящее описание путем ссылки. Кроме того, в целях введения людям, следует понимать, что препараты должны соответствовать стандартам стерильности, апиrogenности, общей безопасности и чистоты, требуемым, например, Ведомством Биологических Стандартов Администрации пищевых продуктов и лекарственных средств США.

Кроме того, используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает материалы, такие как растворители, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные средства, противогрибковые средства), изотонические агенты, агенты, задерживающие абсорбцию, соли, консерванты, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, гели, связывающие агенты, эксципиенты, разрыхляющие агенты, смазывающие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители, такие как материалы и их комбинации, как известно среднему специалисту в данной области в свете настоящего описания. За исключением случаев несовместимости любого обычного носителя с активным ингредиентом, предусмотрено его применение в терапевтических или фармацевтических композициях.

Композиции по настоящему изобретению могут включать различные типы носителей, в зависимости от того, предстоит ли их вводить в твердой, жидкой или аэрозольной форме, и от того, должны ли они быть стерильными для таких путей введения как инъекция. Фармацевтические препараты по настоящему изобретению могут вводиться внутривенно, интрадермально, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутрь очага поражения, интракраниально, внутрь сустава, в предстательную железу, внутриплеврально, внутритрахеально, интраназально, в стекловидное тело,

интравагинально, интраректально, внутрь опухоли, внутримышечно, подкожно, подконъюнктивально, в мочевого пузыря, через слизистые оболочки, интраперикардially, интраумбиликально, интраокулярно, перорально, местно, локально, путем ингаляции (например, аэрозоля). Кроме того, композиции по
5 настоящему изобретению могут вводиться путем инъекции, инфузии, непрерывной инфузии, локализованной перфузии, непосредственно омывающей клетки-мишени, через катетер, посредством лаважа или другим способом или любой комбинацией указанных выше способов, как известно среднему специалисту в данной области.

Действительное количество дозировки композиции по настоящему изобретению,
10 вводимое индивиду, может определяться такими физическими и физиологическими факторами как масса тела, тяжесть состояния, тип подвергаемого лечению заболевания, предшествующие или одновременные терапевтические вмешательства, заболевание неясного происхождения у пациента и путь введения. Лечащий врач, ответственный за введение композиции, в любом случае определит концентрацию активного ингредиента
15 (ингредиентов) в композиции и соответствующую дозу (дозы) для отдельного индивида.

В определенных вариантах осуществления, фармацевтические композиции могут включать, например, по меньшей мере, примерно 0,1% активного соединения. В других вариантах осуществления, активное соединение может включать, например, от примерно 2% до примерно 75% массы стандартной дозы, или от примерно 25% до примерно 60%
20 и любой диапазон, получаемый в указанных интервалах. В других не ограничивающих примерах, доза может также содержать от примерно 1 микрограмма/кг массы тела, примерно 5 микрограммов/кг массы тела, примерно 10 микрограммов/кг массы тела, примерно 50 микрограммов/кг массы тела, примерно 100 микрограммов/кг массы тела, примерно 200 микрограммов/кг массы тела, примерно 350 микрограммов/кг массы
25 тела, примерно 500 микрограммов/кг массы тела, примерно 1 миллиграмма/кг массы тела, примерно 5 миллиграммов/кг массы тела, примерно 10 миллиграммов/кг массы тела, примерно 50 миллиграммов/кг массы тела, примерно 100 миллиграммов/кг массы тела, примерно 200 миллиграммов/кг массы тела, примерно 350 миллиграммов/кг массы тела, примерно 500 миллиграммов/кг массы тела до примерно 1000 миллиграммов/кг
30 массы тела или более на введение, и любой диапазон, получаемый в указанных интервалах. В не ограничивающих примерах диапазона, выводимого из ряда диапазонов, перечисленных в настоящем описании, может вводиться доза в диапазоне от примерно 5 мг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 5 микрограммов/кг массы тела от примерно 500 миллиграммов/кг массы тела и т.д., на основании чисел,
35 представленных выше.

В любом случае, композиция может содержать различные антиоксиданты для задержки окисления одного или более компонентов. Кроме того, предотвращение действие микроорганизмов может быть обеспечено консервантами, такими как различные антибактериальные и противогрибковые средства, включая без ограничения
40 парабены (например, метилпарабены, пропилпарабены), хлорбутанол, фенол, сорбиновую кислоту, тимеросал или их комбинации.

Фармацевтические средства могут включаться в состав композиции в форме свободного основания, нейтрального вещества или соли. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотно-аддитивные соли, например, соли, образованные со свободной
45 аминокислотой композиции пептида, или которые образованы с неорганическими кислотами, такими как, например, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами как уксусная, щавелевая, винная или миндальная кислота. Соли, образованные со свободными карбоновыми группами, могут быть

также получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или трехвалентного железа; или такие органические основания как изопропиламин, триметиламин, гистидин или прокаин.

В вариантах осуществления, где композиция представлена в жидкой форме, носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую без ограничения воду, этанол, полиол (например, глицерол, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.д.), липиды (например, триглицериды, растительные масла, липосомы) и их комбинации. Должная текучесть может поддерживаться, например, использованием покрытия, такого как лецитин; поддержанием требуемого размера частиц дисперсией в носителях, таких как, например, жидкий полиол или липиды; путем использования поверхностно-активных веществ, таких как, например, гидроксипропилцеллюлозы; или комбинациями таких способов. Во многих случаях, предпочтительно включение изотонических агентов, таких как, например, сахара, хлорид натрия или их комбинации.

В определенных вариантах осуществления, композиции получают для введения такими путями как прием внутрь. В этих вариантах осуществления, твердая композиция может содержать, например, растворы, суспензии, эмульсии, таблетки, пилюли, капсулы (например, твердые или мягкие имеющие оболочку желатиновые капсулы), препаративные формы длительного высвобождения, буккальные композиции, пастилки, эликсиры, суспензии, сиропы, облатки или их комбинации. Пероральные композиции могут быть включены в пищу рациона. Предпочтительные носители для перорального введения включают инертные разбавители, ассимилируемые съедобные носители или их комбинации. В других аспектах изобретения, пероральная композиция может быть получена в виде сиропа или эликсира. Сироп или эликсир может содержать, например, по меньшей мере одно активное средство, подсластитель, консервант, ароматизатор, краситель или их комбинации.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления, пероральные композиции могут включать один или более связывающих агентов, эксципиентов, разрыхлителей, смазывающих агентов, ароматизаторов и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления, композиция может включать один или более из следующих ингредиентов: связывающий агент, такой как, например, смола трагаканта, акация, кукурузный крахмал, желатин или их комбинации; эксципиент, такой как, например, дикальций фосфат, манит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния или их комбинации; разрыхлитель, такой как, например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота или их комбинации; смазывающий агент, такой как, например, стеарат магния; подсластитель, такой как, например, сахароза, лактоза, сахарин или их комбинации; ароматизатор, такой как, например, мята перечная, масло грушанки, вишневая отдушка, апельсиновая отдушка и т.д.; или комбинации перечисленных выше ингредиентов. Когда стандартная лекарственная форма представляет собой капсулу, то она может содержать, в дополнение к материалам указанного выше типа, носители, такие как жидкий носитель. Различные другие материалы могут присутствовать в качестве покрытий или для модификации физической формы стандартной лекарственной формы. Например, таблетки, пилюли или капсулы могут быть покрыты шеллаком, сахаром или ими обоими.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены включением активных соединений по изобретению в требуемом количестве в соответствующий растворитель, необязательно, с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, как это

предусмотрено, с последующей фильтрационной стерилизацией. В целом, дисперсии получают включением различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и/или другие ингредиенты. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, суспензий или эмульсий, предпочтительными способами получения являются технологии вакуумной сушки или сублимации, которые обеспечивают выход порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный желательный ингредиент из предварительно подвергнутой фильтрационной стерилизации его среды. Жидкая среда должна быть при необходимости подходяще забуферена, жидкому разбавителю сначала была придана изотоничность перед инъекцией достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Предусматривается также получение высококонцентрированных композиций для прямой инъекции, где предполагается, что использование диметилсульфоксида в качестве растворителя приведет к крайне быстрому проникновению, доставляющему высокие концентрации активных агентов в небольшую область.

Предпочтительно композиция по изобретению устойчива в стандартных условиях изготовления и хранения и защищена от против заражающего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Следует понимать, что должно поддерживаться минимальное заражение эндотоксином на безопасном уровне, например, менее чем 0,5 нг/мг белка.

В конкретных вариантах осуществления, продолжительная абсорбция инъекционной композиции может быть обеспечена композициями по изобретению, которые содержат агенты, задерживающие абсорбцию, такие как, например, моностеарат алюминия, желатин или их комбинации.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Модель повреждения кавернозных нервов у крыс

В модели повреждения кавернозных нервов у крыс обычно используется следующая методология. Крыс наркотизируют изофлюраном. Животных помещают на подогреваемую подстилку для поддержания температуры тела на уровне 37°C. Животные бреют и обрабатывают антисептиком раствором клинидина (повидон йод). Брюшную полость вскрывают по средней линии в нижней части живота, обнажая оба кавернозных нерва и основной тазовый ганглий (MPG). Повреждение кавернозного нерва вызывают раздавливанием кавернозного нерва кровоостанавливающим зажимом в течение двух минут с каждой стороны. В исследованиях, связанных с нейрегулином, две группы нейрегулина лечили за 48 часов до повреждения.

Модель раздавливания нервов у крыс обеспечивает простое получение воспроизводимого и крайне надежного уменьшения эректильной функции. Данная методика широко используется, и были опубликованы несколько исследований, в которых использовалась данная методика. Нет необходимости в тестировании эректильной функции после повреждения раздавливанием, сниженная эректильная функция является прогнозируемой и обычно, функциональное тестирование выполняется примерно через 5 недель после повреждения раздавливанием.

После повреждения кавернозного нерва брюшную полость закрывают в два слоя, сближая брюшные мышцы и фасцию (рассасываемым швом) 2-3 прерывистыми швами. Кожу ушивают с использованием субкутикулярным (погружным) непрерывным швом для кожи не смачиваемым шовным материалом (PDS (полидиоксаноном) или покрытым викрилом). Анальгетик бупренорфен вводили превентивно (за 10 минут до окончания процедуры) и через каждые 6-12 часов после операции в течение 48 часов для

обезболивания.

Примерно через 5 недель после операции, крыс наркотизировали кетамин (100 мг/кг внутривенно) и ксилазином (5 мг/кг). Ножки пещеристых тел обнажали через тот же разрез, и функциональные исследования выполняли, используя иглу калибра 23G, введенную в левую ножку, и соединяли с программным обеспечением, специально предназначенным для измерения величин внутрикавернозного давления. Перед измерением, кавернозные нервы стимулируют электродом при 1,5 мА. Длительность процедуры измерения составляет приблизительно 15 минут. Крыс подвергали эвтаназии введением эвтанала внутрисердечно до выхода из наркоза и ткани (кавернозные нервы, МРГ, пенис, предстательную железу) извлекали для световой микроскопии и молекулярной и биологической оценки.

Как представлено данными величин внутрикавернозного давления (ICP), показанными на фиг. 1, электростимуляция кавернозных нервов через 5 недель после повреждения продемонстрировала значительное сохранение нерва и конечной функции органа в обеих группах лечения нейрегулином, и это было еще более значимым при более высоких дозах. Данные сначала анализировали не повторяемыми показателями ANOVA (вариационного анализа) с t-критерием Бонферрони, и различия считали значимыми при $p < 0,05$. Все результаты выражены в виде средней величины \pm SEM (стандартная ошибка средней). Изменения были также значительно уменьшены при нормализации к величинам аортального давления, как показано на фиг. 2.

С гистологической точки зрения, данные указывают на то, что лечение нейрегулином увеличивало число интактных нервных волокон на основании метки фтор-золота, ретроградно переносимой в МРГ, и улучшало сохранение нейронной синтазы оксида азота и VaChT из нервной и гладкомышечной тканей пениса. Это указывает на то, что имеется нейропротективный и/или нейрорегенеративный механизм действия. Апоптоз гладких мышц также уменьшен, по сравнению с животными с травмой раздавливанием, которые совсем не получают нейрегулин.

Пример 2: Способы гистологического исследования с использованием фтор-золота

Для выполнения данного протокола, выполняли инъекцию 4% фтор-золота в пещеристые тела, и через одну неделю брали ткани Основных тазовых ганглиев (МРГ) и в течение ночи фиксировали в 4% параформальдегиде и 0,1 М фосфатном буфере и затем помещали в 20% сахарозу. Делали криосрезы толщиной 20 мкм. Изображения получали с использованием камеры и визуализирующей системы с последующими анализами слепым методом для определения количества клеток с увеличенным содержанием фтор-золота. Затем, предметные стекла с образцами МРГ выбирали случайным методом (10 на животное), и выполняли подсчет клеток для определения числа интактных нейронов. (См., например, публикации 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.)

Таким образом, это был протокол ретроградного прослеживания с использованием фтор-золота. Результаты выполнения данного протокола обеспечили информацию, указывающую на то, что лечение нейрегулином содействовало регенерации и перепроцессированию на его мишень (пещеристые тела пениса) и/или нейропротекции кавернозных нервов.

Соответственно, фтор-золото инъецировали в орган-мишень, в данном случае

пещеристые тела пениса. Затем, происходил захват из нервных окончаний органа-мишени. Данный захват указывал на то, что нервные волокна были сохранены и/или вновь вросли в область инъекции. Если имеется захват фтор-золота, то оно переносится ретроградным образом в аксон нерва, и метка накапливается в первоначальных нейронах MPG (основного тазового ганглия).

На фиг. 3 показано репрезентативное мечение фтор-золотом основного тазового ганглия (MPG) от 3 животных на группу лечения ((панель А) нормальные, (панель В) раздавливание, (панель С) раздавливание + GGF2). Нормальные животные (панель А) демонстрируют количество ретроградного мечения, наблюдаемое в отсутствие повреждения нервов. Животные из группы раздавливания нерва (панель В) демонстрируют резкое уменьшение количества интактных нервных волокон в результате повреждения, поскольку метка фтор-золота неспособна переноситься на все расстояние назад к MPG. У животных из группы раздавливания нерва + GGF2 (панель С) проявляется увеличенное число меченых фтор-золотом клеток MPG, указывая на то, что в результате лечения GGF2, после повреждения присутствует большее количество сохраненных нервных волокон.

На фиг. 4 представлена количественная характеристика мечения фтор-золотом в MPG. После повреждения раздавливанием, число меченых клеток резко снижается вследствие повреждения нервных волокон и итоговой неспособности ретроградно переносить метку назад к MPG. Лечение GGF2 увеличивало число интактных нервных волокон, доступных для транспорта фтор-золота от ткани пениса в MPG ретроградным образом, приводя к большему числу меченых клеток.

Пример 3: Иммуногистохимия

Продольные криосрезы проксимальной части пещеристых тел окрашивали VaChT для выявления nNos. Все смывы делали Tris буфером, содержащим 1% Triton-X. Ткань блокировали в течение 1 ч 5% нормальной козьей сывороткой, затем инкубировали в течение ночи при 4°C соответственно с:

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

После нескольких промываний, срезы инкубировали в течение 1 ч в козьей-антикроличьей иммуноглобулиновой сыворотке, конъюгированной пероксидазой хрена (HRP) и ослиной анти-козьей иммуноглобулиновой сыворотке (1/1000), затем помещали в раствор DAB (диаминобензидина), содержащий 0,2% сульфат аммония никеля и 0,03% пероксид водорода в течение 10 мин. После последнего промывания, срезы дегидратировали, очищали в ксилоле и накрывали покровным стеклом в среде Permount (Fisher Scientific).

Окрашивание nNos:

Оксид азота (NO), высвобождаемый из аксонных концевых пластин кавернозных нервов внутри пещеристых тел, наряду с эндотелиальным NO, вызывает расслабление гладких мышц, инициируя гемодинамические изменения, приводящие к эрекции пениса, а также содействуя поддержанию его набухшего состояния. В настоящее время достигнуто понимание того, что возврат к потенции после повреждения кавернозных нервов зависит, по меньшей мере, частично, от аксонной регенерации в остающейся нервной ткани и успешной функциональной реиннервации органа-мишени (что обеспечивает возможность активации нейронов NO). Хорошо установленные патофизиологические изменения наблюдаются при исследованиях на экспериментальной модели пениса после повреждения кавернозного нерва. Эти патобиологические

изменения могут быть в диапазоне от нейропраксии до летального повреждения аксонов и могут включать апоптоз гладких мышц, апоптоз эндотелия, сниженную плотность синтазы оксида азота (NOS) в нервах, стимуляцию фибропролиферативных цитокинов, таких как трансформирующий фактор роста-бета (TGF- β), фиброз или потерю гладких мышц или патобиологических реакций передачи сигналов, таких как измененный сигнальный белок «sonic hedgehog».

Кроме того, считается, что хроническое отсутствие эрекции, вызванное невропраксией кавернозных нервов во время продолжительной фазы восстановления усугубляет возможность дальнейшего структурного нарушения кавернозных гладких мышц вследствие несостоятельности нормальных кавернозных циклических изменений между расслабленным состоянием и эрекцией (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).

Кавернозная nNOS является признанным маркером сохранения кавернозных нервов. (См., например, сайт интернета <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-410X.2010.09364.x/full>) Результаты данного протокола указали на нейропротективный и/или регенерирующий эффект после двухстороннего повреждения кавернозных нервов у крыс, полученное в соответствии с протоколом примера 1.

Результаты плотности окрашивания (репрезентативные срезы проксимальной части пещеристых тел, 5 выбранных случайным методом предметных стекол, вслепую изученных наблюдателями – на основании 5 животных на группу) указали на сохранение окрашивания nNOS у индивидов, получавших лечение нейрегулином.

На фиг. 5 представлено репрезентативное окрашивание для выявления уровней nNos. Плотность окрашивания указывает на присутствие nNOS. Результаты этой работы включают нормальное окрашивание ткани (панель A).

Для сравнения, имеется значительная потеря окрашивания nNOS после повреждения кавернозных нервов раздавливанием (панель B). Сохранение окрашивания nNOS окончаний кавернозных нервов в пещеристых телах пениса демонстрирует увеличение выживания и/или регенерации кавернозных нервов после повреждения раздавливанием с лечением GGF2 (панель C). Плотность окрашивания указывает на сохранение окрашивания nNOS при лечении GGF2.

Окрашивание сосудистого транспортера ацетилхолина (VaChT):

Нейроны тазового ганглия, которые иннервируют пенис, экспрессируют nNOS и холинергические маркеры, тогда как симпатическая норадренергическая иннервация пениса в значительной степени происходит через симпатическую цепь и проходит через нервы полового члена или тазовый ганглий. Результаты данного протокола дали информацию, указывающую на то, что лечение нейрегулином содействовало регенерации и восстановлению проекции на его мишень (пещеристые тела пениса) и/или нейропротекции кавернозных нервов на основании окрашивания внутри пещеристых тел для выявления везикулярного транспортера ацетилхолина (VaChT). Хотя первичная этиология эректильной дисфункции после хирургических вмешательств является нейрогенной, исследования на грызунах выявили, что морфологические и функциональные изменения также возникают внутри пещеристой ткани после повреждения нервов пениса (См., например, публикации 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).

Результаты плотности окрашивания (репрезентативные срезы проксимальной части пещеристых тел, 5 выбранных случайным методом предметных стекол, вслепую изученных наблюдателями – на основании 5 животных на группу) указали на сохранение окрашивания VaChT у крыс, которые получали GGF2.

5 На фиг. 7 представлено репрезентативное иммуногистохимическое окрашивание везикулярного транспортера ацетилхолина (VaChT). Плотность окрашивания указывает на присутствие VaChT. Результаты включают нормальное окрашивание ткани (панель А), и значительную потерю окрашивания VaChT после повреждения раздавливанием кавернозных нервов (панель В). Напротив, сохраненное окрашивание VaChT окончаний
10 кавернозных нервов в пещеристых телах пениса, показанное на панели С, продемонстрировало увеличение выживания и/или регенерации кавернозных нервов после повреждения раздавливанием при лечении GGF2 (панель С). Плотность окрашивания указывает на сохранение окрашивания VaChT при лечении GGF2.

Окрашивание ТН:

15 ТН (тирозингидроксилаза) представляет собой маркер адренергических нервных волокон, и она используется для поддержания сохранения нервов в пещеристых телах. Получали продольные криосрезы проксимальной части пещеристых тел и окрашивали первичными антителами, выработанными против маркера синтеза катехоламина, тирозингидроксилазы (Impaired Cavernous Reinnervation after Penile Nerve Injury in Rats
20 with Features of the Metabolic Syndrome Matthew R. Nangle, BSc, PhD, Joseph Proietto, MBBS, PhD,† and Janet R. Keast, BSc, PhD J Sex Med 2009;6:3032-3044).

Результаты плотности окрашивания указывают на присутствие ТН. Действительно достигнутые результаты плотности окрашивания (репрезентативные срезы
25 проксимальной части пещеристых тел, 5 выбранных случайным методом предметных стекол, вслепую изученных наблюдателями – на основании 5 животных на группу) указали на сохранение окрашивания ТН у животных, получавших лечение GGF2. На фиг. 6 представлено репрезентативное окрашивание уровней тирозингидроксилазы (ТН). Результаты включают нормальное окрашивание ткани (панель А), и значительную потерю окрашивания ТН после повреждения раздавливанием кавернозных нервов
30 (панель В). На панели С показано, что сохранное окрашивание ТН кавернозных нервных окончаний в пещеристых телах пениса лучше всего соответствует общему увеличению сохранения иннервации пениса после повреждения раздавливанием при лечении GGF2 (панель С). Плотность окрашивания показывает тенденции к сохранению окрашивания ТН при лечении GGF2.

35 На фиг. 6 представлено репрезентативное окрашивание уровней тирозинкиназы (ТН). Результаты включают нормальное окрашивание ткани (панель А) и значительную потерю окрашивания ТН после повреждения раздавливанием кавернозных нервов (панель В). Панель С показывает, что сохраненное окрашивание ТН окончаний кавернозных нервов в пещеристых телах члена лучше всего соответствует общему
40 увеличению сохранения иннервации члена после повреждения раздавливанием при лечении GGF2 (панель С). Плотность окрашивания показывает тенденции к сохранению окрашивания ТН при лечении GGF2.

Пример 4: Альтернативные варианты осуществления

Повреждение периферических нервов может происходить почти при всех
45 хирургических вмешательствах. Вероятность повреждения нервов коррелируется с локализацией и степенью рассечения ткани при любом хирургическом вмешательстве. Например, операция мастэктомии имеет частые осложнения в результате повреждения периферических нервов, включая онемение подмышечной области и верхней конечности

(например, повреждение межреберно-плечевого нерва), крыловидная лопатка (повреждение длинного грудного нерва), паралич широчайшей мышцы спины (повреждение грудоспинного нерва). (См. Публикации Watt-Boolsen et al., 1988; Aitken and Minton, 1983).

5 Соответственно, нейрегулин используется или до, или после или и до, и после мастэктомии для ограничения повреждения нервов и/или усиления восстановления функции периферических нервов. Пациенток, у которых предстоит плановая
10 мастэктомия, лечат примерно за 24 часа до операции соответствующим количеством нейрегулина. Возможно также лечение пациенток в течение периода времени примерно до 6 недель или более после операции для усиления восстановления нервов. В
альтернативных вариантах осуществления, пациенток лечат только перед или лечат только после операции. Как отмечено в настоящем описании, нейрегулин применяется для предотвращения повреждения нервов после хирургических вмешательств резекции
15 опухолей (простатэктомии, мастэктомии, тироекттомии и т.д.). Следует отметить, что, как считалось, нейрегулины вовлечены в качестве промотеров и супрессоров в процессы образования и роста опухолевых клеток (Atlas et al., 2003; Chua et al., 2009). Лечение нейрегулином может быть или не быть противопоказанным у пациентов с
определенными опухолями. Нейрегулины применяются у пациентов с erbB-положительными опухолями только, когда достаточное количество исследований
20 безопасности демонстрируют, что нейрегулины не усиливают рост такой опухоли.

Кроме того, лечение повреждения нервов в результате хирургических вмешательств не ограничивается мастэктомией и простатэктомией. Повреждение нервов часто
происходит при любом хирургическом вмешательстве, связанном со значительным рассечением и/или резекцией. Эти хирургические вмешательства могут включать без
25 ограничения операции на верхних конечностях, операции на кистях рук, операции/протезирование коленного сустава, операции/протезирование тазобедренного сустава, операции/протезирование локтевого сустава, рассечение тканей шеи для операций на
артериях и венах, операции на щитовидной железе, тонзилэктомию, операции на кистях рук и стопах. Повреждение периферических нервов обычно происходит при операциях
30 на тазовых органах, брюшной полости и ободочной и прямой кишке. Повреждение нервов также происходит в челюстно-лицевой хирургии.

В дополнение к непосредственному повреждению посредством рассечения и резекции при хирургических вмешательствах, повреждение нервов часто происходит в результате
сдавливания или растяжения нервов во время хирургических вмешательств вследствие
35 расположения пациента, сдавливания тканей в точках контакта или вызванного хирургическим бельем, фиксаторами, зажимами, лентами или другими объектами, которые могут сдавливать ткань. Указанные повреждения нервов могут быть неизбежными результатами хирургического вмешательства или результатом нарушений
хирургической техники. Обнаружено, что вне зависимости от типа и этиологии
40 повреждения периферических нервов, нейрегулины предотвращают и/или лечат такое повреждение.

Клинические испытания у людей демонстрируют эффективность нейрегулинов для предотвращения и лечения повреждения периферических нервов данными оценки
сенсорной и/или двигательной функции часто поражаемых нервных областей у
45 пациентов, которых лечили нейрегулином или контролем плацебо. Например, онемение в подмышечной области может тестироваться стандартными неврологическими способами оценки сенсорной функции, включающими тесты аллодинии, гиперальгезии, сенсорного порога или четкости тактильного восприятия (различения двух точек).

Данные способы являются стандартными в данной области. Пациентов наблюдали в течение периода нескольких месяцев после хирургического вмешательства, и проводили статистические сравнения между группами пациентов, получавших лечение нейрегулином и контрольной группой пациентов. В соответствии с данными указанных испытаний, было обнаружено, что лечение нейрегулином до и/или после хирургического вмешательства предотвращает и/или лечит оцениваемое повреждение периферических нервов.

В испытаниях, аналогичных указанным выше, также оценивают подобным образом силу движений, диапазон и координацию движений. В соответствии с данными указанных испытаний, было обнаружено, что лечение нейрегулином до и/или после хирургического вмешательства предотвращает и/или лечит повреждение периферических нервов, которое приводит к нарушению одного или более показателей из силы движений, диапазона или координации движений.

(57) Формула изобретения

1. Применение нейрегулина для лечения повреждения кавернозных нервов у субъекта.
2. Применение по п. 1, где субъект имеет существующее повреждение кавернозных нервов и где нейрегулин вводится субъекту после повреждения кавернозных нервов.
3. Применение по п. 1, где повреждение кавернозных нервов возникает вследствие травмы или медицинской процедуры.
4. Применение по п. 3, где травма представляет собой повреждение раздавливанием.
5. Применение по п. 3, где травма возникает вследствие хирургической процедуры.
6. Применение по п. 5, где хирургическая процедура представляет собой радикальное хирургическое вмешательство на тазовых органах.
7. Применение по п. 6, где радикальное хирургическое вмешательство на тазовых органах предназначено для рака предстательной железы, рака мочевого пузыря или рака прямой кишки.
8. Применение по п. 5, где хирургическая процедура представляет собой хирургическое вмешательство, связанное с резекцией опухоли.
9. Применение по п. 8, где хирургическое вмешательство, связанное с резекцией опухоли, представляет собой простатэктомию.
10. Применение по п. 1, где повреждения кавернозных нервов вызывает эректильную дисфункцию у субъекта.
11. Применение по п. 1, где нейрегулин вводят в дозе от 100 микрограммов/кг массы тела до 10 миллиграммов/кг массы тела на введение.
12. Применение по п. 1, где нейрегулин вводят в дозе от 500 микрограммов/кг массы тела до 5 миллиграммов/кг массы тела на введение.
13. Применение по п. 1, где нейрегулин вводят в дозе от 500 микрограммов/кг массы тела до 1 миллиграмма/кг массы тела на введение.
14. Применение по п. 1, где нейрегулин представляет собой GGF2 или его фрагмент, содержащий домен, подобный эпидермальному фактору роста (EGF-подобный домен).
15. Применение по п. 1, где нейрегулин содержит домен, подобный эпидермальному фактору роста (EGF-подобный домен).
16. Применение по п. 1, где нейрегулин вводят в дозе от 50 микрограммов/кг массы тела до 500 микрограммов/кг массы тела на введение.
17. Применение по п. 1, где нейрегулин вводят в дозе от 350 микрограммов/кг массы тела до 500 микрограммов/кг массы тела на введение.
18. Применение по п. 1, где нейрегулин вводят в дозе от 50 микрограммов/кг массы

тела до 1000 микрограммов/кг массы тела на введение.

5

10

15

20

25

30

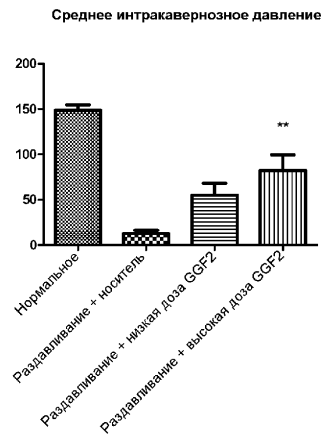
35

40

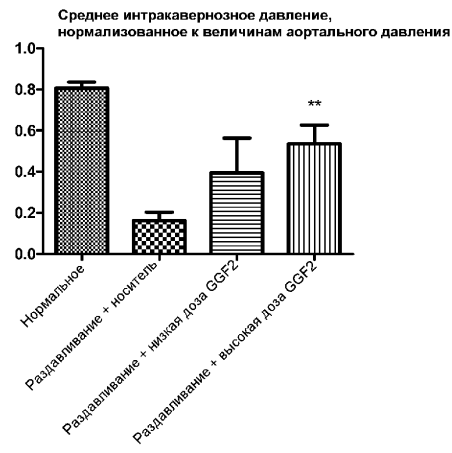
45

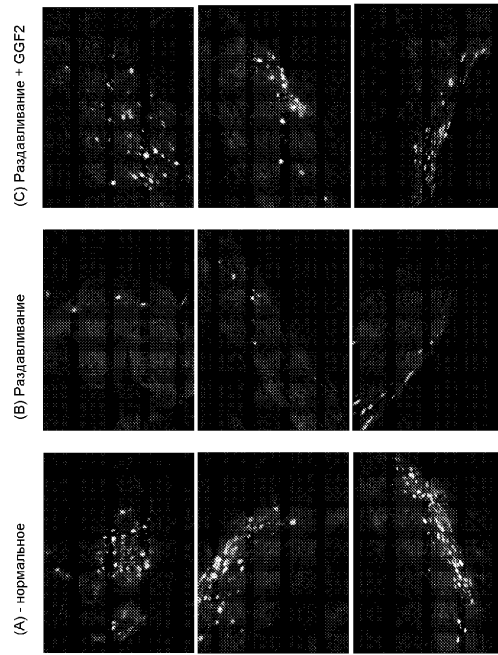
1/6

ФИГ. 1



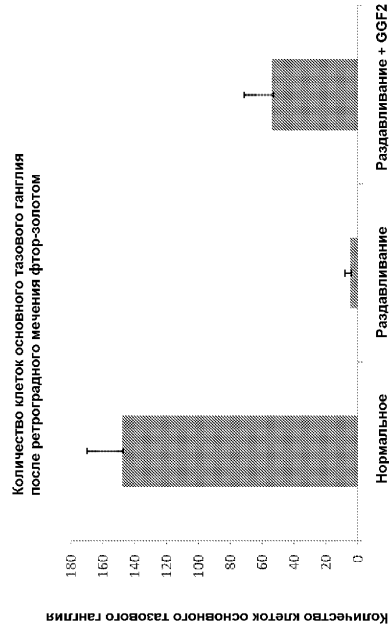
ФИГ. 2





ФИГ. 3

3/6



Фиг. 4

4/6

(A) - нормальное (B) Раздавливание (C) Раздавливание + GGF2



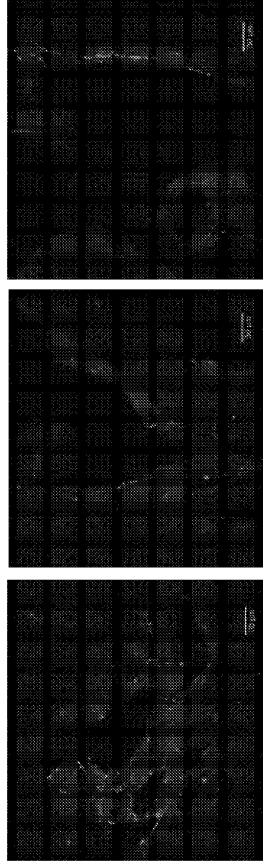
ФИГ. 5

(А) - нормальное (В) Раздавливание (С) Раздавливание + GGF2



ФИГ. 6

(A) - нормальное (B) Раздавливание (C) Раздавливание + GGF2



ФИГ. 7