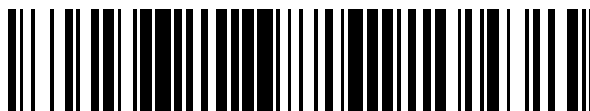


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 058**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07817382 .0**  
96 Fecha de presentación: **01.10.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2075004**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2009**

54 Título: **Uso del factor del crecimiento epidérmico para la restauración morfofuncional de nervios periféricos en la neuropatía diabética**

30 Prioridad:  
**03.10.2006 CU 20060192**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.08.2012**

73 Titular/es:  
**CENTRO DE INGENIERIA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGIA  
AVE. 31 ENTRE 158 Y 190 CUBANACAN, PLAYA CIUDAD DE LA HABANA10600, CU**

72 Inventor/es:  
**FERNÁNDEZ MONTEQUÍN, José, Ignacio;  
HERRERA MARTINEZ, Luis, Saturnino;  
BERLANGA ACOSTA, Jorge, Amador;  
GARCIA DEL BARCO HERRERA, Diana;  
CIBRIAN VERA, Danay;  
GUILLEN NIETO, Gerardo, Enrique;  
UBIETA GÓMEZ, Raimundo;  
GONZALEZ BLANCO, Sonia y  
SÁEZ MARTÍNEZ, Vivian María**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

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

ES 2 386 058 T3

## DESCRIPCIÓN

Uso del factor del crecimiento epidérmico para la restauración morfofuncional de nervios periféricos en la neuropatía diabética.

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a aplicaciones médicas o experimentales de una composición farmacéutica que comprende el factor del crecimiento epidérmico ("epidermal growth factor", EGF), preferiblemente administrada mediante infiltración en la periferia de troncos nerviosos y/o ganglios, para prevenir o corregir cualquiera de las manifestaciones clínicas de la neuropatía diabética. Dicha formulación también puede administrarse de forma local, en regiones distales de las extremidades o en la base de miembros amputados que sufren dolor neuropático.

10 **Técnica anterior**

Unos niveles insuficientes de glucosa en sangre y otros factores relacionados con la diabetes pueden alterar las fibras nerviosas en cualquier parte del cuerpo generando un grupo de trastornos con características específicas, dependiendo de los nervios afectados. Estos trastornos se denominan en conjunto neuropatía diabética, y se han descrito al menos tres tipos principales: (1) neuropatía sensitivomotora (la forma más típica y frecuente); (2) neuropatía autonómica; y (3) mononeuropatía (Sadikot S.M., Nigam A., Das S., et al. (2004), The burden of diabetes and impaired glucose tolerance in India using the WHO 1999 criteria: prevalence of diabetes in India study (PODIS), Diabetes Res. Clin. Pract., 66, 301-307).

15 Aunque los mecanismos precisos detrás de estos trastornos no son del todo comprendidos, se sabe que la fibra nerviosa se ve estructuralmente modificada por la acumulación de sustancias derivadas del metabolismo exacerbado de la glucosa, que conduce a la pérdida de la vaina de mielina en las fibras nerviosas. La pérdida de esta vaina protectora implica un retraso en la capacidad para transmitir el impulso nervioso, en la recepción, o en la transmisión de órdenes motoras o de cualquier otro tipo de señales. Además de este mecanismo directo, los vasos sanguíneos que irrigan los nervios pueden sufrir obstrucciones por acontecimientos que son comunes a otras complicaciones de la diabetes (Ashok S., Ramu M., Deepa R., et al. (2002), Prevalence of neuropathy in type 2 diabetes patients attending diabetes center in South India, J. Assoc. Physicians India, 50, 546-550).

20 Tal como resulta habitual en la diabetes, las fases iniciales de la neuropatía diabética en general son asintomáticas, incluso durante años, y hasta la fecha no hay manera de anticipar su insidioso desarrollo clínico. Cuando el médico sospecha de una neuropatía diabética sensitivomotora, puede confirmar el diagnóstico realizando un ensayo para evaluar la velocidad de la conducción nerviosa. Este ensayo consiste en determinar la velocidad de transmisión de pequeñas corrientes eléctricas a través del nervio seleccionado.

25 En la forma más frecuente de neuropatía diabética, la neuropatía sensitivomotora, los síntomas iniciales incluyen pérdida de sensibilidad, percepción incorrecta de sensaciones táctiles y, en ciertos casos, dolor muy intenso después de roces mínimos en la piel. Normalmente esto se produce primero en pies y manos y casi siempre durante la noche. Cuando los nervios afectados están a cargo de la motilidad digestiva, puede producirse un proceso digestivo lento o alteraciones del ritmo intestinal (diarrea y/o estreñimiento). A veces la neuropatía diabética afecta al control del sistema cardiovascular, produciendo un síncope o hipotensión si los pacientes se levantan bruscamente (Levitt N.S., Stansberry K.B., Wychanck S., et al. (1996). Natural progression of autonomic neuropathy and autonomic function tests in a cohort of IDDM. Diabetes Care, 19, 751-754).

30 La mononeuropatía diabética puede afectar a casi cualquier nervio aislado, originando parálisis en un lado de la cara, alteración de los movimientos oculares, parálisis y/o dolor en un emplazamiento anatómico concreto.

35 La neuropatía periférica puede afectar a los nervios craneales o a los de la médula espinal y sus ramificaciones, y es un tipo de neuropatía (lesión nerviosa) que tiende a desarrollarse por etapas. Al principio hay dolor y hormigueo intermitente en las extremidades, en particular en los pies; pero en etapas más avanzadas, el dolor es más intenso y constante. Por último, se desarrolla una neuropatía indolora cuando el deterioro nervioso es masivo (Oh S.J. (1993), Clinical electromyography: nerve conduction studies, en: Nerve conduction in polyneuropathies, Baltimore, Williams and Wilkins, p: 579-591).

40 Una de las consecuencias más graves de la neuropatía diabética es el dolor asociado, que a veces es de alta intensidad y no responde a los procedimientos terapéuticos convencionales. Se han utilizado tratamientos farmacológicos y clínicos sin gran éxito. Los primeros se aconsejan casi siempre en combinación con analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos, anticonvulsivos, tales como carbamazepina y fentolamina, antidepresivos tricíclicos, y anestésicos locales, que pueden penetrar incluso hasta alcanzar las fibras bloqueadas. Los anticonvulsivos se han empleado recientemente para tratar el dolor asociado a la neuropatía diabética. Entre estos, el que se ha introducido más recientemente es la gabapentina. Desde el punto de vista neuroquímico, la gabapentina aumenta la disponibilidad del ácido gamma-aminobutírico (GABA), inhibiendo el portador GAT-1, que a

- 5 su vez reduce la recaptación de GABA; disminuye la síntesis y la liberación de aminas biogénicas, tales como noradrenalina, dopamina y 5-OH-triptamina; e induce la liberación de péptidos opiáceos del tipo de las encefalinas implicados en la modulación del dolor (Didangelos T.P., Karamitsos D.T., Athyros V.G., et al. (1998), Effect of Aldose reductase inhibition on cardiovascular reflex tests in patients with definite diabetic autonomic neuropathy, J. Diabetes Complications, 12, 201-207).
- En pacientes con neuropatía dolorosa y falta de respuesta al tratamiento, se ha empleado una estimulación electrónica transcutánea de forma que, mediante la aplicación de voltajes programados de baja intensidad, se ha evitado la transmisión del dolor a través de los nervios afectados.
- 10 La neuropatía diabética dolorosa se ha dividido en las formas crónica y aguda. La forma aguda se observa generalmente durante los primeros tres años después del diagnóstico; comienza y termina de modo espontáneo. La forma crónica está presente en personas que padecen la enfermedad durante 8 o 9 años de media. Comienza lentamente y persiste durante años con múltiples recaídas. Las neuropatías craneales pueden afectar a la visión y provocar dolor en el ojo.
- 15 Los síntomas de la enfermedad son, en general, somnolencia, hormigueos, pérdida de sensibilidad en algunas partes del cuerpo, diarrea o estreñimiento, pérdida de control de la vejiga, impotencia, ptosis de la cara, los párpados y/o la boca. También puede provocar cambios en la visión, mareos, dificultad para tragar, alteraciones del lenguaje y contracciones musculares. Estos síntomas varían dependiendo del nervio o nervios afectados y, en general, se desarrollan de modo gradual.
- 20 La pérdida de sensibilidad asociada con la neuropatía diabética aumenta el riesgo de lesiones. Pequeñas infecciones pueden avanzar hasta convertirse en úlceras y requerir la amputación. Además, los daños en los nervios motores pueden conducir a la descomposición y desequilibrio muscular. En otras palabras, la neuropatía es quizás la principal causa de amputación de piernas y pies en esta enfermedad.
- 25 Los objetivos del tratamiento de la neuropatía diabética son la prevención del avance y la reducción de los síntomas de la enfermedad. El control estricto de la glucosa es importante para evitar este avance. En la actualidad no hay ningún tratamiento específico disponible capaz de prevenir, retrasar o revertir la alteración en las fibras nerviosas en la neuropatía diabética. No se ha aprobado ningún fármaco capaz de reparar los daños nerviosos, pero en la actualidad varios están en estudio. Las vitaminas del complejo B son, probablemente, los fármacos más utilizados para todas las formas de neuropatía. Aunque estos fármacos alivian ciertos síntomas sólo son un paliativo. Otra alternativa terapéutica utilizada recientemente es la aplicación de ácido lipoico por vía intravenosa, basándose en sus propiedades antioxidantes (Ziegler D., Hanefeld M., Ruhnau K.J., et al. (1999), Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7 month multicenter randomized controlled trial (ALADIN III study), ALADIN III study group, Alpha-lipoic acid in diabetic neuropathy, Diabetes Care, 22, 1296-1301). Se han realizado otros ensayos para introducir un tratamiento oral con acetil-L-carnitina, un compuesto que muestra una influencia discreta sobre las fibras sensoriales pequeñas.
- 30 El único procedimiento terapéutico con una base patogénica para la neuropatía diabética periférica implica el uso de inhibidores de la aldosa-reductasa. Su actividad se basa en el papel de la aldosa-reductasa en los trastornos metabólicos estructurales y funcionales, inducidos por la hiperglucemia en los nervios del organismo diabético. Hasta la fecha se ha evaluado en ensayos clínicos el sorbinilo, que es eficaz para mejorar la velocidad de conducción motora en personas diabéticas con neuropatía, pero se retiró del mercado debido a los efectos tóxicos.
- 35 El estatilo mostró unos resultados alentadores en animales, pero estos resultados no pudieron corroborarse en seres humanos. En general, los inhibidores de la aldosa-reductasa son muy tóxicos.
- 40 La introducción del factor del crecimiento nervioso (NGF) y otros factores del crecimiento en el campo clínico generó un considerable optimismo. En un ensayo con 250 pacientes con neuropatía de fibras pequeñas (fibras C), se documentó un alivio del dolor y una mayor capacidad para detectar estímulos calientes. Sin embargo, en dos ensayos posteriores con un mayor número de pacientes, el tratamiento con NGF no mostró ningún beneficio (Vinik A.I. (1999), Treatment of diabetic polyneuropathy (DPN) with recombinant human nerve growth factor (rh NGF), Diabetes, 48, A54-55).
- 45 La terapia génica con el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF) se ha evaluado a fondo en animales, que muestran una mejora en la conducción de los impulsos nerviosos y en la densidad de vasos sanguíneos que irrigan el nervio. Sin embargo, estas y otras estrategias con otros agentes neurotróficos han sido incapaces de detener el avance hasta la neuropatía diabética en ensayos clínicos, a pesar de los resultados positivos previos en animales (Schratzberger P., Walter D.H., Rittig K., et al. (2001). Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer, J. Clin. Invest., 107, 1083-1092). Para reducir los síntomas se recomienda un tratamiento tópico con capsaicina o con fármacos orales, tales como amitriptilina, gabapentina y carbamazepina.
- 50 Los mecanismos patogénicos de la neuropatía diabética no se comprenden bien. El tratamiento actual alivia el dolor
- 55

y puede controlar parte de los síntomas asociados, pero el proceso en general es progresivo. Lo peor es que no parece que en un futuro cercano vaya a estar disponible un fármaco específico para esta enfermedad.

### **Sumario de la invención**

5 La presente invención contribuye a resolver el problema mencionado anteriormente mediante el uso del EGF en una composición farmacéutica que se administra a través de una infiltración en la periferia de los troncos nerviosos y/o ganglios, para la restauración morfofuncional de los nervios periféricos en la neuropatía sensitivomotora dolorosa.

10 Las alteraciones de los nervios periféricos asociadas con la diabetes son complejas y probablemente implican a una diversidad de causas. Los dos principales mecanismos patogénicos son: 1) la teoría de la acumulación de sorbitol que conduce a una serie de anomalías bioquímicas que, a largo plazo, provocan alteraciones estructurales en los nervios periféricos; 2) los daños estructurales y funcionales de los microvasos endoneuriales originan cambios en las fibras nerviosas activados por la hipoxia o la isquemia. Otros mecanismos de generación de neuropatía diabética son la modulación de la producción de enzimas, la activación del sistema del complemento, la acumulación de proteínas con alta afinidad por metales pesados, tales como hierro y cobre, y la disminución de factores neurotróficos. Otro elemento que se ha reivindicado con énfasis es la acumulación de productos de la peroxidación y la nitrosilación. Se ha observado una reducción en la tensión de oxígeno endoneurial en los nervios de pacientes diabéticos que padecen neuropatía. Todos estos acontecimientos conducen a un alto nivel de apoptosis y muerte celular en las estructuras neurales. Esta es la razón por la que la neuropatía diabética se caracteriza por la pérdida de unidades funcionales al nivel de las fibras nerviosas mielinizadas y por una reducción significativa en la velocidad de conducción nerviosa (NCV). La polineuropatía periférica se caracteriza por la presencia de dolor, que está relacionado con la disfunción de fibras alfa y C.

20 En general, la composición de la presente invención se aplica mediante infiltración local, colocándola cerca de troncos nerviosos y/o ganglios, de las zonas de dolor distales de las piernas antes o después de la amputación, y en los casos en que los expertos en la técnica aprecien daños en las fibras C. El tratamiento con la presente composición durante varias semanas ha demostrado ser capaz de eliminar el dolor neuropático; moderar los trastornos no autonómicos; y restablecer la sensibilidad periférica a la presión y a la temperatura.

Después de tres inyecciones sistémicas, o infiltraciones locales en la periferia de los troncos nerviosos, de la composición farmacéutica en animales diabéticos, los inventores han detectado:

- 1- Una mejora en la integridad de la vaina de mielina del nervio ciático.
- 30 2- Una reducción en el edema del axón.
- 3- La conservación de neurofilamentos axonales.
- 4- La integridad de los *vasa nervorum*.
- 5- Una disminución en la colagenización endoneurial.
- 6- La normalización de la velocidad de conducción de fibras motoras.

35 La composición se libera lentamente cerca de la estructura de interés en un volumen de 1 a 5 mililitros. La frecuencia de la infiltración en los troncos neurales y los ganglios puede fluctuar entre una y tres veces semanales. El tratamiento con la composición descrita en esta invención puede estar asociado o no con inhibidores de la aldosa-reductasa, aminoguanidina, hipoglucémicos orales o parenterales, insulina, estimulantes de la sensibilidad periférica a la insulina, péptidos de tipo glucagón, terapia de vitaminas, agonistas o amplificadores del sistema GABA, precursores de endorfinas, antioxidantes, ácidos grasos o sus precursores, terapia individual o combinada con analgésicos, antidepresivos tricíclicos y fármacos antiinflamatorios. El número de aplicaciones administradas a un paciente varía según la gravedad de los síntomas clínicos del paciente. Se requieren varios ciclos de tratamiento si los síntomas reaparecen.

45 Una realización concreta de la presente invención es el uso de EGF para preparar formulaciones administradas mediante una infiltración en la periferia de troncos nerviosos y/o ganglios para la restauración morfofuncional de nervios periféricos en la neuropatía sensitivomotora, cuando las manifestaciones más importantes de esta neuropatía afecten a las piernas. En una realización preferida, el EGF utilizado para preparar la composición farmacéutica administrada mediante infiltración en la periferia de troncos nerviosos y/o ganglios para la restauración morfofuncional de nervios periféricos, es el EGF humano recombinante.

50 En otra realización concreta de la invención, la infiltración de la composición farmacéutica que contiene EGF se realiza en el nervio ciático.

Un objeto de la presente invención es una composición farmacéutica inyectable que contiene una combinación de EGF y al menos un anestésico local o un analgésico, administrada mediante infiltración en la periferia de troncos nerviosos y/o ganglios, para la restauración morfofuncional de nervios periféricos en la neuropatía diabética. En una realización concreta, dicho anestésico es lidocaína, que contribuye a aliviar el dolor provocado por la infiltración de EGF. Además, el anestésico acompañante presente en la composición puede ser bupivacaína o novocaína, entre otros.

También es parte de la presente invención una composición en la que se administra EGF mediante una infiltración en la periferia de troncos nerviosos y/o ganglios, con la ayuda de sistemas de liberación controlada. En una realización preferida, dicho sistema de liberación controlada son microesferas formadas por ácido láctico y ácido glicólico, o copolímeros de poli(ácido láctico), que portan el EGF.

Las microesferas pueden ofrecer varias ventajas, siendo la más habitual una reducción en la frecuencia de la administración. La presente invención proporciona una solución técnica a la falta de un fármaco específico disponible para el tratamiento de la neuropatía diabética. Sin embargo, el tratamiento con composiciones que contienen EGF, en las que esta molécula no esté unida a microesferas, requiere la aplicación de las correspondientes dosis del fármaco al menos dos veces semanales. Tomando en cuenta este inconveniente, el uso de una formulación para la liberación lenta y sostenida de EGF reduce la frecuencia de administración del producto, lo cual es beneficioso para el paciente. La formulación basada en microesferas tiene las siguientes ventajas:

- Disminución de la frecuencia de la administración, lo cual conduce a un mejor cumplimiento al tratamiento por parte del paciente.
- Aumento en el beneficio terapéutico debido a la eliminación de las fluctuaciones en los niveles de proteínas en el suero.
- Disminución potencial de la dosis total requerida para el tratamiento debido a una mejor actuación de la dosis administrada.
- Disminución potencial de los efectos adversos debido a una reducción en la cantidad de proteínas liberadas en el cuerpo en el momento de la aplicación.

### **Breve descripción de las figuras**

**Figura 1.** Microfotografía de una microesfera cargada con EGF. La barra debajo de la microfotografía representa una longitud de 10  $\mu\text{m}$ .

**Figura 2.** Perfil de liberación de EGF encapsulado en microesferas de PAL. El eje de abscisas muestra el tiempo en días, y el eje de ordenadas muestra la cantidad de EGF liberada, expresada en porcentaje de la cantidad total de EGF dentro de las microesferas utilizadas en el ensayo.

### **Descripción detallada de la invención/Ejemplos**

#### **Ejemplo 1. Efecto preventivo de la composición farmacéutica en la instauración de la neuropatía diabética.**

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto neuroprotector de la composición farmacéutica que contiene EGF en un modelo animal de diabetes mellitus. En primer lugar, fue necesario establecer la metodología de la inducción de la diabetes mellitus en ratas Wistar mediante la administración de estreptozotocina.

Ratas Wistar macho, con 200-250 gramos de peso corporal, recibieron una inyección subcutánea de estreptozotocina, a 75 mg/kg en tampón citrato de sodio. Entonces se substituyó el agua por una disolución de sacarosa al 10% durante las siguientes 24 h, para evitar muertes provocadas por la hipoglucemia. Los niveles de glucosa en sangre se controlaron cada mañana durante las siguientes 72 horas después de la inyección. Sólo se emplearon los animales con unos valores de glucosa sostenidos mayores que 15 mmol/l. Las ratas se alojaron en un número de 4 por jaula y se alimentaron del modo convencional. Un grupo concurrente de otras 80 ratas recibieron tampón citrato sin estreptozotocina y se trataron de un modo similar al grupo diabético. El valor medio de glicemia durante las 72 horas en este grupo fue de 5,87 mmol/l.

Para estudiar el efecto de la composición farmacéutica que contiene EGF en la prevención de la neuropatía diabética se empleó el siguiente diseño experimental con 10 ratas por cada uno de los grupos:

- *Grupo control:* Un grupo de ratas diabéticas reciben disolución salina tres veces semanales en 1 ml por vía intraperitoneal.
- *Grupo de tratamiento 1:* Un grupo de ratas diabéticas reciben la composición farmacéutica que contiene EGF una vez semanal en 1 ml por vía intraperitoneal.

- *Grupo de tratamiento 4:* Un grupo de ratas diabéticas reciben la composición farmacéutica que contiene EGF tres veces semanales en 1 ml por vía intraperitoneal.

Todos los tratamientos se realizaron durante 8 semanas, comenzando una semana después de la inyección de estreptozotocina. La composición utilizada contenía 75 µg de EGF recombinante humana/ml. Se realizaron varios tipos de observaciones en los animales del estudio:

(1) Determinación del umbral nociceptivo (NCT). Ensayo del dolor.

El ensayo del dolor, mediante la aplicación de una presión creciente a la cola, se realizó en los días 28 y 56 después del inicio del tratamiento, utilizando 10 animales por cada uno de los grupos experimentales. Se determinó el NCT, expresado en gramos, utilizando un analgesímetro de tipo Ugo Basile para aplicar una presión gradualmente creciente a la cola de los animales hasta que desarrollan un reflejo de retirada. En la neuropatía diabética humana, el umbral nociceptivo disminuye. La tabla 1 muestra los resultados del NCT medido en el día 28.

**Tabla 1.** Resultados del ensayo de NCT (28 días).

Grupo experimental	NCT* (gramos)
Control con disolución salina	120 ± 11
Grupo de tratamiento 1	125 ± 18
Grupo de tratamiento 3	123 ± 16
Ratas no diabéticas	128 ± 9
* Los datos se expresan como la media y la desviación estándar.	

No se detectaron cambios en el patrón nociceptivo de los animales después de 28 días de evolución de la enfermedad. Esto sugiere que la forma clínica de hiperestesia aún no se ha instalado. Por esta razón, el efecto del tratamiento todavía no puede apreciarse en este momento. Los resultados del examen en el día 56 se muestran en la tabla 2.

Tal como demuestran los resultados, dos meses después de la inducción de la diabetes es posible apreciar el efecto de la neuropatía diabética periférica en los animales. Se detectó una disminución en el umbral de sensibilidad al dolor en este momento experimental. También resulta notable la diferencia entre el grupo de ratas diabéticas que reciben disolución salina durante dos meses, y el grupo que recibe tratamiento con la composición que contiene EGF tres veces semanales.

**Tabla 2.** Resultados del ensayo de NCT (56 días).

Grupo experimental	NCT (gramos)
Control con disolución salina	80 ± 19**
Grupo de tratamiento 1	91 ± 14*
Grupo de tratamiento 3	121 ± 22
Ratas no diabéticas	123 ± 6

Se observaron diferencias significativas entre el grupo diabético tratado con disolución salina y el grupo que recibe el tratamiento 3, así como con el grupo de ratas no diabéticas (\*\*p<0,01 ANOVA con corrección de Bonferroni). También había diferencias significativas entre el grupo de tratamiento 1 y los grupos de tratamiento 3 y los animales sanos. El descubrimiento de que los animales tratados mostraban, en general, más tolerancia al dolor sugiere que el tratamiento con la composición que contiene EGF sí evita el deterioro de las fibras sensoriales.

(2) Determinación de la velocidad de conducción del impulso por fibras sensoriales.

Para evaluar el efecto protector de la composición farmacéutica que contiene EGF sobre las fibras sensoriales y motoras, se midió la velocidad de la conducción de un impulso eléctrico en el día 60 después del inicio del tratamiento. Se emplearon 15 animales en cada grupo experimental. En la neuropatía diabética, la velocidad de

conducción en general disminuye.

Se empleó una estimulación supramáxima distal en la vía ciática-tibial utilizando electrodos bipolares para estudiar la conducción motora. La determinación de la velocidad de conducción en las vías sensoriales se realizó aplicando un estímulo en un punto proximal en la cola y midiéndolo a una distancia de 3 cm. Los resultados de este estudio en el día 80 se muestran en la tabla 3.

5

**Tabla 3.** Velocidad de conducción motora (MCV) en el día 60.

Grupo experimental	MCV (m/s)
Control con disolución salina	34 ± 18**
Grupo de tratamiento 1	45 ± 13*
Grupo de tratamiento 3	56 ± 11
Ratas no diabéticas	60 ± 8

Se observaron diferencias significativas entre el grupo diabético tratado con disolución salina y el grupo que recibe el tratamiento 3, así como con el grupo de ratas no diabéticas (\*\*p<0,01 ANOVA con corrección de Bonferroni). También había diferencias significativas entre el grupo de tratamiento 1 y los grupos de tratamiento 3 y los animales sanos (\*p<0,05), y entre el grupo de tratamiento 1 y los animales diabéticos control que reciben disolución salina.

10

Nótese el efecto positivo de la composición, en particular en el grupo que recibe tres aplicaciones semanales. Los valores de conducción en fibras motoras son muy similares a los de animales sanos. Aunque existe diferencia estadística con el grupo de animales no diabéticos, las ratas en el grupo que recibe el tratamiento 1 también mejoraron la velocidad de conducción. Los resultados del estudio de la velocidad de conducción sensorial (SCV) en el día 60 se muestran en la tabla 4.

15

**Tabla 4.** Velocidad de conducción sensorial (SCV) en el día 60.

Grupo experimental	SCV (m/s)
Control con disolución salina	31 ± 7**
Grupo de tratamiento 1	38 ± 6*
Grupo de tratamiento 3	44 ± 9
Ratas no diabéticas	56 ± 3

Se observaron diferencias significativas entre el grupo diabético tratado con disolución salina y el grupo que recibe el tratamiento 3, así como con el grupo de ratas no diabéticas (\*\*p<0,01 ANOVA con corrección de Bonferroni). También había diferencias significativas entre el grupo de tratamiento 1 y los grupos de tratamiento 3 y los animales sanos (\*p<0,05). No se detectaron diferencias estadísticas entre el grupo de tratamiento 1 y los animales diabéticos control que reciben disolución salina. Este estudio demuestra el efecto de la composición farmacéutica que contiene EGF para conservar la integridad funcional de los animales cuando se administra tres veces semanales.

20

25 (3) Influencia de la composición sobre la integridad de la perfusión sanguínea de un nervio periférico.

Se empleó el nervio ciático derecho de las ratas como modelo. Se incluyeron 10 animales en cada uno de los grupos experimentales. Se empleó un número similar de ratas no diabéticas para calcular los valores de referencia. Se utilizó un sistema de formación de imágenes de perfusión de láser Doppler (LDPI). Los datos de perfusión en tejidos periféricos al nervio se programaron como los valores cero. Los animales control recibieron disolución salina durante dos meses antes de la medición. Todas las determinaciones se realizaron bajo las mismas condiciones de anestesia y condiciones ambientales. Se reflejan en la tabla 5.

30

**Tabla 5.** Resultados del estudio realizado con el sistema de formación de imágenes de perfusión de láser Doppler.

Grupo experimental	SCV (m/s)
Control con disolución salina	525,5 ± 88,8**
Grupo de tratamiento 1	653,4 ± 41,9*
Grupo de tratamiento 3	988,7 ± 80,3
Ratas no diabéticas	1301,7 ± 112,2

5 Se observaron diferencias significativas entre el grupo diabético tratado con disolución salina y el grupo que recibe la composición terapéutica una vez semanal, ambos tratamientos durante dos meses, y también con los que reciben la composición terapéutica tres veces semanales (\*\*p<0,01 ANOVA con corrección de Bonferroni). No se detectaron diferencias estadísticas entre este último grupo y los valores de ratas no diabéticas sanas.

(4) Determinaciones y caracterizaciones post-mortem.

Estudio histomorfométrico

10 Cuando finalizó el tratamiento, los animales se sacrificaron en el día 70 después de la inducción de la diabetes, 10 días después de administrar la última dosis, y los análisis descritos anteriormente se completaron. Los animales se sacrificaron mediante una sobredosis de anestesia y se perfusionaron con tampón de disolución salina a pH 7,4. Un total de diez animales por grupo experimental se incluyeron en los estudios histomorfométricos, y se empleó un número equivalente de ratas para las determinaciones bioquímicas. En ambos sistemas, los nervios ciáticos de ambas extremidades se diseccionaron; los fragmentos se mantuvieron a -70 °C hasta el procesamiento.

15 Las muestras tomadas para los estudios histológicos y/o histomorfométricos se tiñeron con hematoxilina/eosina y azul de toluidina. Al menos cinco fragmentos del mismo nervio se estudiaron cuantitativamente utilizando el programa MADIP. Los fragmentos se introdujeron en bloques de celoidina y gelatina, y estos bloques se cortaron en sentido horizontal y transversal. Se evaluaron los siguientes indicadores histológicos:

20 - Número total de vasos sanguíneos (en la epineura/perineura) en 10 campos microscópicos utilizando 10X como constante de aumento en cortes longitudinales del nervio.

- Porcentaje de fibras desmielinizadas. Se evalúa promediando los valores por campo microscópico (x20, al menos cinco campos).

- Porcentaje de fibras con mielina o sin mielina, con lesiones (dilatadas o distorsionadas) por campo microscópico (x20, al menos cinco campos).

25 - Porcentaje de colagenización endoneurial (moderada: del 25% al 50%; grave: más del 50% del área endoneurial en cortes transversales, y al menos tres secciones diferentes).

Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6.** Estudio morfométrico realizado sobre fragmentos del nervio ciático.

Grupo experimental	nº de vasos sanguíneos	% de fibras desmielinizadas	% de fibras con lesiones	% de área colagenizada
Control de disolución salina	87,65 ± 17,8	64,77 ± 19,72	81,5 ± 9,73	58,93 ± 28
Grupo de tratamiento 1	111,33 ± 14,5	51,2 ± 17,94	60,12 ± 11	42,69 ± 14,71
Grupo de tratamiento 3	158,6 ± 26,12	35,56 ± 12,18	41,38 ± 10,26	13,45 ± 11,82
Ratas no diabéticas	194,42 ± 43,81	0	0	0

30 Se documentaron diferencias estadísticamente significativas en el número de vasos sanguíneos entre el grupo de



animales diabéticos tratados con disolución salina y las ratas control sanas ( $p = 0,0023$ ). Además, también se encontraron diferencias estadísticas cuando se comparan el grupo con disolución salina y el grupo que recibe el tratamiento 1 ( $p = 0,031$ ). También había diferencias significativas ( $p = 0,014$ ) cuando se comparan el grupo con disolución salina y el grupo que recibe el tratamiento 3. Los resultados se analizaron mediante ANOVA con corrección de Bonferroni. Los porcentajes se comparan con el ensayo exacto de Fisher.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento para los tres parámetros: porcentaje de fibras desmielinizadas, porcentaje de fibras con lesiones, y porcentaje de áreas colagenizadas. Se detectó una diferencia estadística entre el grupo de ratones diabéticos tratados con insulina y los animales que reciben el tratamiento 3 ( $p < 0,05$ ).

**Conclusiones parciales:** El tratamiento con la composición que contiene EGF, tres veces semanales, durante dos meses, fue capaz de prevenir el proceso de desmielinización, de reducir significativamente el deterioro morfológico de las fibras del nervio ciático y, en consecuencia, de prevenir la colagenización endoneurial. De una manera similar, el tratamiento sostenido con esta composición evita significativamente la atrofia y la degeneración de los vasos sanguíneos que nutren el nervio. Todos estos descubrimientos están de acuerdo con los ensayos funcionales realizados con respecto a la conducción de estímulos sensoriales y motores, y el estudio de perfusión con el sistema de láser Doppler.

(5) Caracterización bioquímica de fragmentos de nervios.

Se emplearon 10 animales por grupo experimental para realizar las determinaciones bioquímicas en los fragmentos del nervio ciático recogidos. Se estudiaron los siguientes parámetros bioquímicos:

Perfil redox:

- Actividad de la enzima superóxido dismutasa total (tSOD).
- Actividad de la enzima catalasa.
- Acumulación intraaxonal de hidroxiperóxidos totales (HPT).
- Acumulación intraaxonal de malonildialdehído (MDA).

Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Caracterización del estado redox en fragmentos del nervio ciático.

Grupos experimentales	tSOD <sup>a,b</sup>	Catalasa	HPT <sup>c</sup>	MDA
Ratas no diabéticas	2267,05 ± 202,9	26,40 ± 5,95	18,66 ± 1,43	0,06 ± 0,01
Grupo de disolución salina	433,5 ± 95,21**	440,26 ± 52,19**	208,62 ± 11,3**	0,32 ± 0,02**
Grupo de tratamiento 1	958,17 ± 244,61*	274,60 ± 52,3*	143,05 ± 1,98*	0,24 ± 0,04*
Grupo de tratamiento 3	2102,83 ± 112,67	37,62 ± 8,13	25,15 ± 1,81	0,08 ± 0,02

<sup>a</sup> Los valores se expresan como la media y la desviación estándar. <sup>b</sup> Las enzimas se expresan como unidades por miligramo de proteína por minuto. <sup>c</sup> HPT y MDA en nmol/mg de proteína.

Se observaron diferencias significativas entre los animales diabéticos tratados con placebo y los tratados tres veces semanales con la composición que contiene EGF (\*\* $p = 0,0001$ ). También se apreciaron diferencias entre los grupos tratados con la formulación que contiene EGF una vez semanal y tres veces semanales, y también cuando se compara con animales no diabéticos (\* $p = 0,003$ ). No se encontraron diferencias entre los animales sanos y los tratados tres veces semanales, según un ensayo de la t de Student de dos colas.

Debido a que la acumulación de glucosa contribuye, a través de varios mecanismos bioquímicos, a aumentar el nivel de peroxidación de lípidos y, a su vez, a la acumulación dentro de tejidos de productos finales de la glicosilación avanzada (AGE), es indispensable evaluar marcadores relacionados con este proceso. Según se demuestra mediante los resultados de la tabla 7, el tratamiento con la composición farmacéutica ensayada reduce significativamente la acumulación de metabolitos indicativa de procesos de peroxidación, y depende de la frecuencia de aplicación. En paralelo, el tratamiento es capaz de prevenir la disminución de la superóxido dismutasa.

(6) Actividad enzimática de la lipoproteína lipasa (LPL) en fragmentos de nervio ciático.

Se incubaron fragmentos del nervio de cada animal junto con heparina 3 µg/ml en tampón de Krebs-Ringer a 37 °C durante 50 minutos. Después se incubaron partes alícuotas de estas muestras en presencia de [<sup>14</sup>C]-trioleinfosfatidilcolina. Los ácidos grasos marcados con <sup>14</sup>C se cuantificaron mediante los procedimientos clásicos. La actividad LPL se expresa en nanomoles de ácidos grasos liberados (RFA) por minuto y gramo de tejido. Los resultados se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8.** Actividad LPL en el nervio ciático.

Grupos experimentales	LPL (nmoles RFA/min/g)
Ratas no diabéticas	6,18 ± 1,05
Control de disolución salina	2,24 ± 0,97**
Grupo de tratamiento 1	3,75 ± 2,2*
Grupo de tratamiento 3	5,41 ± 1,83

Se descubrieron diferencias significativas entre las ratas diabéticas tratadas con disolución salina y el grupo que recibe el tratamiento 3, así como con el grupo de ratas no diabéticas (\*\*p<0,01, ANOVA y ensayo de Tukey). También se apreciaron diferencias (\*p<0,05) entre el grupo de tratamiento 1 y los animales control. No se descubrieron diferencias estadísticamente significativas entre los animales del tratamiento 3 y los animales no diabéticos.

El presente análisis demuestra que el tratamiento con la composición que contiene EGF garantiza la conservación de la actividad enzimática de LPL, que a su vez mejora la capacidad del nervio para sintetizar mielina, debido a la importante contribución de los fosfolípidos a esta función.

**Ejemplo 2. Efecto de la composición farmacéutica sobre la reversión de una neuropatía diabética establecida.**

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de neurorestauración de la composición farmacéutica. Ratas Wistar macho, con 200-250 gramos de peso corporal, recibieron una inyección subcutánea de estreptozotocina, a 75 mg/kg en tampón citrato de sodio, y se dejaron evolucionar durante 120 días después de la inducción de la enfermedad. Todas las ratas utilizadas en este experimento mostraron unos niveles de glucosa sostenidos mayores que 15 mmol/l. Los animales se manipularon y se alimentaron como se ha descrito previamente. Se estableció un grupo control concurrente, en el que los animales recibieron disolución salina en lugar de estreptozotocina. Los animales se observaron durante tres meses después de la exposición a estreptozotocina. Después de este periodo se realizó una caracterización electrofisiológica de todas las ratas y los animales se dividieron en dos grupos de tratamiento aleatorios:

Grupo I. Los animales recibieron disolución salina (1 ml), 3 días semanales, por vía intraperitoneal.

Grupo II. Los animales recibieron la composición farmacéutica con 100 µg de EGF en 1 ml, 3 días semanales, por vía intraperitoneal.

Se incluyó un grupo de al menos 10 ratas no diabéticas sanas de la misma camada como referencia para los valores fisiológicos en animales no diabéticos. Los resultados de la caracterización neurofisiológica de los animales antes del inicio del tratamiento se muestran en la tabla 9. La metodología empleada en estas exploraciones ha sido descrita previamente.

**Tabla 9.** Caracterización neurofisiológica de los animales antes del inicio del tratamiento.

Parámetro estudiado	Diabéticos	No diabéticos
Umbral nociceptivo	55 ± 5 gramos	115 ± 15 gramos
Velocidad de conducción motora	20,53 ± 8,44 m/s	66,18 ± 4,32 m/s
Velocidad de conducción sensorial	26,88 ± 13,27 m/s	69,94 ± 11,8 m/s
Irrigación sanguínea al nervio	480,61 ± 65-92 LDPI	1413,8 ± 73,41 LDPI

(1) Determinación del umbral nociceptivo (NCT). Ensayo del dolor.

5 El ensayo del dolor, que consiste en la aplicación de una presión gradualmente creciente a la cola, y el resto de las exploraciones descritas a continuación, se realizaron en el día 120 después de la inducción de la diabetes y después de un mes de tratamiento. Se utilizaron al menos 10 animales por cada uno de los grupos experimentales. La determinación del NCT se realizó como se ha descrito previamente, y los resultados se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10.** Resultados del ensayo de NCT.

Grupo experimental	UNC (gramos)
Ratas diabéticas + disolución salina	55 ± 10**
Ratas diabéticas + tratamiento	80 ± 5*
Ratas no diabéticas	115 ± 10

10 Se observaron diferencias significativas entre el grupo de ratas diabéticas tratado con disolución salina y el grupo de ratas que recibe el tratamiento, así como con el grupo de ratas no diabéticas (\*\*p<0,01 ANOVA con corrección de Bonferroni). También había diferencias significativas entre el grupo de tratamiento y los animales intactos (\*p<0,05).

15 Los resultados demuestran que tres meses después de la inducción de la diabetes, existe un incremento en el avance de la neuropatía periférica, una reducción en el umbral de sensibilidad al dolor en más del 50% comparado con animales sanos. También resulta notable la diferencia observada entre el grupo de ratas diabéticas y el grupo tratado tres veces semanales, durante un mes, con la composición farmacéutica.

Los animales tratados, en general, mostraron una mayor tolerancia al dolor, un descubrimiento que sugiere que el tratamiento con la composición farmacéutica corrige o restaura de alguna manera las fibras sensoriales.

(2) Determinación de la velocidad de conducción de un impulso a través de fibras motoras.

20 Para comprobar el efecto de la composición farmacéutica sobre la restauración de fibras sensoriales y motoras, se midió la velocidad de conducción de un impulso eléctrico en el día 120 después de la inducción de la diabetes, después de tratar a los animales con la composición farmacéutica o con disolución salina. Se emplearon 15 animales por grupo experimental. El procedimiento seguido ya se ha descrito en los estudios previos, y los resultados se muestran en la tabla 11.

**Tabla 11.** Exploración de la velocidad de conducción de fibras motoras.

Grupo experimental	Velocidad m/s
Ratas diabéticas + disolución salina	23,62 ± 18,7**
Ratas diabéticas + tratamiento	54,8 ± 1,66*
Ratas no diabéticas	64,72 ± 10,55

25 Se observaron diferencias significativas entre el grupo de ratas diabéticas tratado con disolución salina y el grupo de ratas que recibe la composición de la invención, así como con el grupo de ratas no diabéticas (\*\*p<0,01 ANOVA con corrección de Bonferroni). También había diferencias entre el grupo tratado con la composición que contiene EGF y los animales no diabéticos intactos (\*p<0,05).

30 Los resultados demuestran que tres meses después de la inducción de la diabetes, existe un incremento en el avance de la neuropatía periférica, y una reducción de la velocidad de conducción de estímulos a lo largo de fibras motoras, en particular cuando se compara con animales sanos. Sin embargo, es importante apreciar que el tratamiento con la composición farmacéutica produce una gran diferencia, comparado con el grupo de ratas diabéticas que reciben disolución salina tres veces semanales durante un mes. En general, el tratamiento con la  
35 composición farmacéutica restaura las fibras nerviosas motoras, mejorando su capacidad de conducción.

Otro aspecto estudiado es la velocidad de conducción sensorial (SCV), que se refleja en la tabla 12.

**Tabla 12.** Estudio de la velocidad de conducción sensorial (SCV).

Grupo experimental	Velocidad m/s
Ratas diabéticas + disolución salina	31,27 ± 10,6**
Ratas diabéticas + tratamiento	59,42 ± 3,35*
Ratas no diabéticas	68,9 ± 11,27

5 Se observaron diferencias significativas entre el grupo de ratas diabéticas tratado con disolución salina y el grupo de ratas que recibe la composición que contiene EGF, así como con el grupo de ratas no diabéticas (\*\*p<0,01 ANOVA y corrección de Bonferroni). También había diferencias entre el grupo tratado con la composición de la invención y los animales no diabéticos intactos (\*p<0,05).

10 Los resultados demuestran que tres meses después de la inducción de la diabetes, existe un incremento en el avance de la neuropatía periférica, y una reducción de la velocidad de conducción de estímulos a lo largo de fibras sensoriales, en particular cuando se compara con animales sanos. El deterioro de los parámetros está por encima del 50%. Sin embargo, es importante apreciar que el tratamiento con la composición farmacéutica produce una gran diferencia, comparado con el grupo de ratas diabéticas que reciben disolución salina tres veces semanales durante un mes. En general, el tratamiento con la composición farmacéutica restaura las fibras nerviosas sensoriales, lo cual está de acuerdo con el ensayo del umbral nociceptivo.

(3) Influencia de la composición farmacéutica sobre la integridad de la perfusión sanguínea de un nervio periférico.

15 De nuevo, se empleó el nervio ciático derecho de las ratas como modelo. Se incluyeron 10 animales en cada uno de los grupos experimentales. Los valores de las ratas no diabéticas se incluyeron como referencia. El experimento se realizó como se ha descrito previamente, aunque en este contexto los animales ya habían sufrido diabetes durante tres meses y habían recibido un tratamiento sostenido durante un mes con la composición que contiene EGF o disolución salina, según el grupo experimental. Los resultados se indican en la tabla 13.

20 **Tabla 13.** Resultados del estudio realizado con el sistema de formación de imágenes de perfusión de láser Doppler.

Grupo experimental	Unidades LDPI
Control con disolución salina	418,5 ± 66,9**
Grupo de tratamiento	934 ± 60,18*
Ratas no diabéticas	1397,3 ± 101,55

25 Se observaron diferencias significativas entre el grupo diabético tratado con disolución salina y el grupo que recibe la composición que contiene EGF, así como con el grupo control de ratas sanas (\*\*p<0,01 ANOVA con corrección de Bonferroni). También se encontraron diferencias significativas (\*p<0,05) entre el grupo tratado con la composición de la invención y los animales no diabéticos intactos.

El tratamiento con la composición de la invención claramente mejora el nivel de perfusión sanguínea al nervio. Aunque los valores no son comparables aún con los de animales sanos, son mucho más altos comparados con los de las ratas diabéticas que reciben disolución salina. El mecanismo molecular detrás de este efecto todavía no se ha aclarado.

30 (4) Determinaciones y caracterizaciones post-mortem.

Estudio histomorfométrico

35 Un mes después de la finalización del tratamiento con la composición que contiene EGF o con disolución salina, y 120 días después de la inducción de la enfermedad, los animales se sacrificaron mediante una sobredosis de anestesia y se perfusionaron con tampón de disolución salina a pH 7,4. Un total de diez animales por grupo experimental se incluyeron en los estudios histomorfométricos, y se empleó un número equivalente de ratas para las determinaciones bioquímicas. En ambos sistemas, los nervios ciáticos de ambas extremidades se diseccionaron. Los procedimientos fueron similares a los descritos para el ensayo de prevención de daños neuropáticos. Las muestras tomadas para los estudios histológicos y/o histomorfométricos se tiñeron con

hematoxilina/eosina y azul de toluidina. Al menos cinco fragmentos del mismo nervio se estudiaron cuantitativamente utilizando el programa MADIP. Los fragmentos se introdujeron en bloques de OCT, se postfijaron con glutaraldehído, y se cortaron en sentido horizontal y transversal. Los indicadores histológicos evaluados se han descrito anteriormente, así como los procedimientos utilizados para el procesamiento y la evaluación:

- 5 - Número total de vasos sanguíneos (en la epineura/perineura) en 10 campos microscópicos utilizando 10X como constante de aumento en cortes longitudinales del nervio.
- Porcentaje de fibras desmielinizadas. Se evalúa promediando los valores por campo microscópico (x20, al menos cinco campos).
- 10 - Porcentaje de fibras con mielina o sin mielina, con lesiones (dilatadas o distorsionadas) por campo microscópico (x20, al menos cinco campos).
- Porcentaje de colagenización endoneurial (moderada: del 25% al 50%; grave: más del 50% del área endoneurial en cortes transversales, y al menos tres secciones diferentes).

Los resultados se muestran en la tabla 14. Se documentaron diferencias estadísticamente significativas en el número de vasos sanguíneos entre ambos grupos de ratas diabéticas y ratas intactas ( $p < 0,001$ ). También se descubrieron diferencias significativas entre las ratas tratadas con la composición que contiene EGF y los animales que recibieron disolución salina ( $p < 0,05$ , ANOVA con corrección de Bonferroni).

**Tabla 14.** Estudio morfométrico realizado sobre fragmentos del nervio ciático. Evaluación después de 30 días.

Grupo experimental	nº de vasos sanguíneos	% de fibras desmielinizadas	% de fibras con lesiones	% de área colagenizada
Control de disolución salina	43,2 ± 9,8	71,5 ± 22,7	83 ± 7,5	64,1 ± 16,4
Grupo de tratamiento	86,5 ± 14,6	50,6 ± 12,3	52,6 ± 8,3	46,3 ± 9,5
Ratas no diabéticas	178,1 ± 44,2	0	0	0

Los porcentajes de fibras desmielinizadas, fibras con lesiones, y área colagenizada endoneurial en animales diabéticos eran significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ) que los valores observados en animales no diabéticos. Aunque se detectan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los animales sanos y los tratados con la composición que contiene EGF, el efecto de atenuación del daño es obvio. Los porcentajes se compararon utilizando el ensayo exacto de Fisher.

**Conclusiones parciales:** El tratamiento con la composición de la invención, tres veces semanales, durante un mes, y después del establecimiento de una neuropatía diabética, reduce significativamente el deterioro morfológico de las fibras del nervio ciático. El tratamiento con la composición también fue capaz de reducir la atrofia y la degeneración de los vasos sanguíneos. De nuevo, todos estos descubrimientos están de acuerdo con los ensayos funcionales realizados.

(5) Caracterización bioquímica de fragmentos de nervios.

Se emplearon 10 animales por grupo experimental para realizar las determinaciones bioquímicas en los fragmentos del nervio ciático recogidos. Se estudiaron los siguientes parámetros bioquímicos:

Perfil redox:

- Actividad enzimática total de la superóxido dismutasa total (tSOD).
- Actividad de la enzima catalasa.
- 35 - Acumulación intraaxonal de hidroxiperoxidos totales (HPT).
- Acumulación intraaxonal de malonildialdehído (MDA).

Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 15.

**Tabla 15.** Caracterización del estado redox en fragmentos del nervio ciático.

Grupos experimentales	tSOD <sup>a,b</sup>	Catalasa	THP <sup>c</sup>	MDA
Ratas no diabéticas	2108,3 ± 109,7	31,8 ± 3,22	21,1 ± 1,11	0,08 ± 0,005
Ratas diabéticas + disolución salina	375,8 ± 88,2	603,6 ± 99,4	317,5 ± 12,2	0,87 ± 0,1
Ratas diabéticas + tratamiento	1988,4 ± 101,6	86,1 ± 6,5	55,8 ± 12,7	0,1 ± 0,03

Los valores se expresan como la media<sup>a</sup> y la desviación estándar<sup>b</sup>. Las enzimas se expresan como unidades por miligramo de proteína por minuto. <sup>c</sup> THP y MDA en nmol/mg de proteína.

5 Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales diabéticos tratados y tratados con placebo, y el grupo de ratas tratado con la composición que contiene EGF ( $p < 0,01$ , ensayo de la t de Student de dos colas). Tal como se muestra en la tabla 15, el tratamiento con la composición farmacéutica reduce significativamente la presencia de metabolitos indicativa de procesos de peroxidación en el tejido nervioso estudiado. En paralelo, se demuestra que el tratamiento atenúa la disfunción de la enzima superóxido dismutasa.

(6) Actividad enzimática de la lipoproteína lipasa (LPL) en fragmentos de nervio ciático.

10 El objetivo de este estudio es comparar la actividad enzimática de LPL después de un mes de tratamiento con la composición que contiene EGF, comparado con los animales diabéticos tratados con disolución salina. Los resultados se muestran en la tabla 16. Se observaron diferencias significativas entre el grupo diabético tratado con disolución salina y el grupo tratado con la composición de la invención (\*\* $p < 0,01$ , ensayos ANOVA y de Tukey).

**Tabla 16.** Actividad LPL en el nervio ciático.

Grupos experimentales	LPL (nmoles AGL/min/g)
Ratas no diabéticas	7,02 ± 1,24
Ratas diabéticas + disolución salina	2,18 ± 0,73**
Ratas diabéticas + tratamiento	6,29 ± 1,67

15 Este análisis demuestra que el tratamiento con la composición que contiene EGF restablece la actividad enzimática de LPL, que a su vez mejora la capacidad del nervio para sintetizar mielina.

**Ejemplo 3. Demostración del efecto terapéutico de la composición que contiene EGF en el tratamiento de pacientes con neuropatía diabética.**

20 Un total de cinco pacientes fueron tratados con la composición que contiene EGF. Estos pacientes tenían manifestaciones de neuropatía sensitivomotora y dolorosa, sin respuesta a tratamientos previos. La dosis de EGF administrada varía entre 20 y 25  $\mu\text{g}$ . La aplicación de la composición que contiene este ingrediente farmacéutico activo se realizó mediante infiltración. Los casos tratados fueron los siguientes:

25 Paciente PCM. Una mujer de 50 años, con más de 20 años con un diagnóstico de diabetes de tipo 1, con manifestaciones de cardiopatía isquémica, hipertensión y nefropatía. Una historia de neuropatía sensitivomotora y manifestaciones de neuropatía dolorosa, con más de 10 años de evolución y sin respuesta clínica a tratamientos previos. Una composición que contenía 25  $\mu\text{g}$  de EGF y 100 mg de lidocaína por dosis se infiltró en el nervio ciático mayor. Este procedimiento se repitió 5 veces más durante un total de seis aplicaciones, siempre en el nervio ciático, dos veces semanales. Después de la tercera infiltración el dolor desapareció. Ocho semanas después del inicio del tratamiento las manifestaciones sensitivomotoras cesaron y permanecieron así a lo largo de los tres meses del periodo de seguimiento.

30 Paciente OZD. Una mujer de 72 años que padece diabetes, con graves oclusiones arteriales y dolor en reposo. No puede andar y tiene un entumecimiento total en las piernas. Se realizaron tres aplicaciones de la misma composición, en el mismo emplazamiento anatómico (nervio ciático mayor). El paciente indica que el entumecimiento en las piernas no cesó después de la administración de la composición que contiene EGF, pero  
35 que el dolor en reposo sí desapareció después de las tres aplicaciones de esta composición, y el paciente podía andar más rápido.

5 Paciente BCB. Una mujer de 60 años, con más de 10 años con un diagnóstico de diabetes de tipo 1, dolor en reposo y entumecimiento en las extremidades. Recibió seis aplicaciones de la misma composición mediante infiltración en el nervio ciático mayor. Después de la tercera aplicación el dolor desapareció y se redujeron las parestesias. Tres semanas después de la aplicación de la última dosis el dolor volvió a aparecer, y por tanto se realizó un nuevo ciclo de tratamiento.

Paciente GTC. Un hombre de 57 años que padece diabetes, con entumecimiento en las extremidades. Se realizaron seis aplicaciones de la misma composición en el mismo emplazamiento anatómico, en intervalos de 4 días. Cuando finalizó el tratamiento mencionado, los síntomas de entumecimiento en las piernas desaparecieron y así permaneció a lo largo de los tres meses del periodo de seguimiento.

10 Paciente STL. Un hombre de 68 años que ha padecido diabetes de tipo 1 durante más de 10 años. Muestra manifestaciones de entumecimiento en las extremidades inferiores. Se realizaron seis aplicaciones de la misma composición, en el mismo emplazamiento anatómico, a una tasa de 2 aplicaciones semanales. Después de la primera ronda de tratamiento (6 dosis), el entumecimiento en las extremidades inferiores desapareció para reaparecer después de 6 meses. Por tanto se aplicó un nuevo ciclo de tratamiento, siguiendo los mismos procedimientos, y las manifestaciones de entumecimiento disminuyeron después de la tercera infiltración.

En general se observó una mejora sustancial en las funciones neurológicas de los pacientes, con la eliminación del dolor espontáneo en reposo y de las sensaciones parestésicas.

#### **Ejemplo 4. Preparación de la composición farmacéutica que contiene microesferas de PLGA con EGF.**

##### *Preparación y caracterización de las microesferas cargadas con EGF.*

20 Se preparó una disolución de poli(ácido láctico) al 5% (en p/v) (Sigma, St. Louis, Missouri, EEUU) disolviendo 1 g del polímero en diclorometano (DCM).

Se depositaron 3 mililitros de la disolución de PLGA en un recipiente de vidrio y se añadieron 100 µl de una disolución acuosa de EGF a 30 mg/ml.

25 Esta mezcla se agitó durante 2 minutos a 14.000 rpm mediante un homogeneizador Ultraturax T8 (IKA Labortechnik, Alemania). La emulsión resultante se vertió en 30 ml de poli(alcohol vinílico) al 1% y se obtuvo una segunda emulsión (de agua/aceite/agua) mediante la agitación vigorosa de las dos fases a 14.000 rpm utilizando un homogeneizador Ultraturax T8 (IKA Labortechnik, Alemania). La emulsión doble se vertió en 270 ml de poli(alcohol vinílico) al 1% 30.000-70.000 (Sigma, St. Louis, Missouri, EEUU), y se agitó en un homogeneizador de IKA Labortechnik, Alemania, a 300 rpm durante 1 h para evaporar el diclorometano. Por último, las microesferas se recogieron mediante filtración, se lavaron 5 veces con 50 ml de agua destilada y se liofilizaron en un liofilizador (Edwards, Reino Unido). Las microesferas secadas se conservaron a 4 °C hasta su uso.

30 Las micropartículas cargadas con EGF resultantes eran esféricas y mostraban una superficie porosa regular (figura 1). El rendimiento del proceso es del 85%, con una eficacia de encapsulación que varía entre 68% y 71%. La carga de las microesferas varía entre 0,82% y 0,85%. Las partículas eran menores que 30 µm.

35 *Liberación in vitro del EGF encapsulado.*

Se suspendieron 50 mg de las microesferas cargadas con EGF en 1 ml de fluido receptor (Tween 80 al 0,001% y azida de sodio al 0,1% en PBS, pH 7,2). La suspensión se incubó a 37 °C con una agitación suave. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 5000 rpm en una microcentrífuga Hettich (Tuttlingen, Alemania) en los días 1, 3, 7 y 14. El sobrenadante se recogió y se añadió el mismo volumen de fluido receptor. La concentración de EGF en cada muestra se evaluó mediante el método del ácido bicinconínico en un formato de microensayo (ensayo de microBCA).

40 El perfil de liberación de EGF de las microesferas mostró una etapa de liberación repentina durante el primer día y una segunda etapa de liberación de EGF continua y gradual hasta el día 14. Aproximadamente se liberó 30% de las proteínas totales durante la primera etapa, mientras que hasta 50% del EGF contenido en las partículas se liberó durante el resto del periodo de evaluación, a una velocidad aproximada de 7 µg diarios (figura 2).

#### **Ejemplo 5. Demostración del efecto terapéutico de una composición que contiene EGF encapsulada en microesferas, en pacientes con neuropatía diabética.**

A continuación se resumen algunas de las características de tres pacientes tratados con la composición que contiene EGF encapsulado en microesferas y la información acerca del tratamiento que se les aplicó:

50 Paciente LNP. Una mujer de 47 años, con más de 10 años con un diagnóstico de diabetes de tipo 1, con manifestaciones de neuropatía sensitivomotora y dolorosa. El nervio ciático mayor se infiltró con una composición

que contenía 20 µg de EGF por dosis. Este procedimiento se repitió tres veces durante para un total de cuatro aplicaciones a una frecuencia de dos dosis semanales. El dolor se redujo después de la tercera infiltración, y desapareció después de la cuarta aplicación. Las manifestaciones sensitivomotoras desaparecieron dos semanas después y permanecieron así a lo largo de los tres meses del periodo de seguimiento.

- 5 Paciente JVR. Una mujer de 63 años con diabetes de tipo I. Mostraba dolor en reposo y entumecimiento de las extremidades. Recibió seis aplicaciones de una composición que contenía 25 µg de EGF por dosis, cada 12 días. La aplicación de la composición se realizó mediante infiltración del nervio ciático mayor. El dolor desapareció y las parestesias se redujeron después de la tercera aplicación. Seis meses después de la última aplicación de la composición el dolor reapareció y, por tanto, se inició una nueva ronda de tratamiento.
- 10 Paciente DGR. Un hombre de 52 años con diabetes, que padece entumecimiento en las extremidades. Recibió cinco dosis de la composición descrita anteriormente que contenía EGF encapsulado en microesferas para la liberación lenta, en el mismo sitio anatómico, y a intervalos de 14 días. Cuando finalizó el tratamiento con EGF, el entumecimiento en las piernas ya había desaparecido y permaneció así durante los cuatro meses del periodo de seguimiento.

15



**REIVINDICACIONES**

- 1.- El uso del factor del crecimiento epidérmico (EGF) para la preparación de una composición farmacéutica para la restauración morfofuncional de los nervios periféricos afectados por una neuropatía diabética, administrada mediante infiltración en la periferia de troncos nerviosos y/o ganglios.
- 5 2.- El uso del factor del crecimiento epidérmico (EGF) según la reivindicación 1, en el que la neuropatía diabética se refiere a la neuropatía sensitivomotora y dolorosa, que afecta preferiblemente a las extremidades inferiores.
- 3.- El uso del EGF según la reivindicación 1, en el que dicho EGF es el EGF humano recombinante.
- 4.- El uso del EGF según las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho EGF está encapsulado en microesferas.
- 10 5.- El uso del EGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición farmacéutica es líquida, preferiblemente una composición acuosa, opcionalmente tamponada, o una composición liofilizada para ser reconstituida antes de su uso, preferiblemente para ser reconstituida con agua, o con una disolución tampón acuosa.
- 6.- El uso del EGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición farmacéutica contiene de 10 a 1000 microgramos de EGF/mililitro.
- 15 7.- El uso del EGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición farmacéutica que contiene EGF contiene además de 10 microgramos a 500 miligramos de al menos un anestésico local o un analgésico seleccionado del grupo de la lidocaína, bupivacaína o novocaína, preferiblemente en el que dicho anestésico local es lidocaína al 2%.
- 20 8.- Una composición farmacéutica que contiene EGF en combinación con un anestésico local o un analgésico, para su uso en la restauración morfofuncional de los nervios periféricos en el tratamiento de la neuropatía diabética sensitivomotora y dolorosa, administrada mediante infiltración en la periferia de troncos nerviosos y/o ganglios, preferiblemente en el nervio ciático.
- 9.- Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, en la que el EGF está encapsulado en microesferas.
- 25 10.- Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, en la que el anestésico es un anestésico local seleccionado del grupo de la lidocaína, bupivacaína o novocaína.
- 11.- Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, en la que el EGF está en el intervalo de 10 a 1000 microgramos/mililitro.
- 30 12.- Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, en la que el tratamiento de la neuropatía diabética sensitivomotora y dolorosa consiste en el tratamiento de los daños en las fibras motoras asociados con la neuropatía diabética.

Figura 1

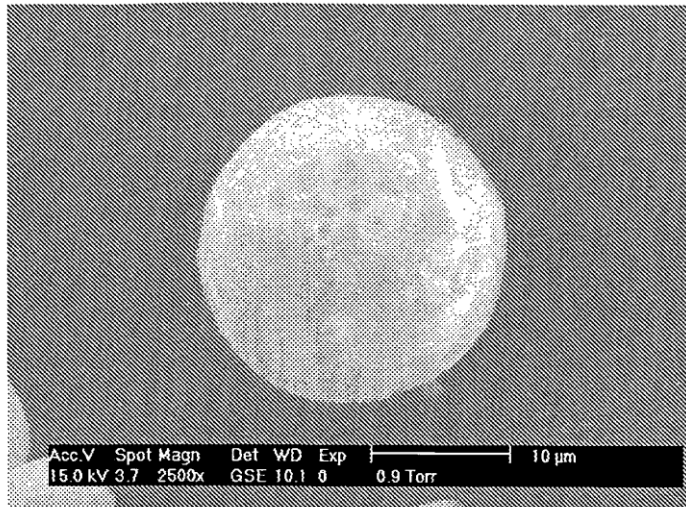


Figura 2

